

## 4 Diskussion

Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC) ist der erste cytosolische Faktor, der in Eukaryonten mit der naszierenden Polypeptidkette am Ribosom interagiert. Wegen des Fehlens jeglicher Homologien zu anderen Proteinen (strukturell und auf Aminosäuresequenzebene) ist die genaue Funktion von NAC als Ribosomen-assoziiertes Faktor trotz intensiver Studien nur wenig verstanden. Es wurde gezeigt, dass NAC durch die Bindung an die naszierende Polypeptidkette in der Lage ist, sie vor unspezifischen Interaktionen und frühzeitigem proteolytischem Abbau abzusichern. Des Weiteren kommt NAC wohl auch eine Rolle im Zusammenhang mit der Proteintranslokation zu, bei der NAC, neben SRP und dem SRP Rezeptor, als weiterer cytosolischer Faktor für die korrekte Zielsteuerung von Proteinen zum endoplasmatischen Retikulum (ER) erforderlich ist. So zeigten *in vitro* Studien, dass NAC die Bindung von Ribosomen wie auch von RNCs an das Translokon verhindert, unabhängig davon ob die naszierende Polypeptidkette eine Signalsequenz trägt oder nicht. Dies könnte eine unspezifische Translokation in das Lumen des ERs verhindern. Die beschriebenen Funktionen legen nahe, dass die Bindungsstelle für NAC am Ribosom in der Nähe des Tunnelausgangs auf der großen ribosomalen Untereinheit liegen muss. Offen bleiben jedoch unter anderem die Fragen, wie und wo NAC mit dem Ribosom assoziiert, um diese Funktionen zu erfüllen.

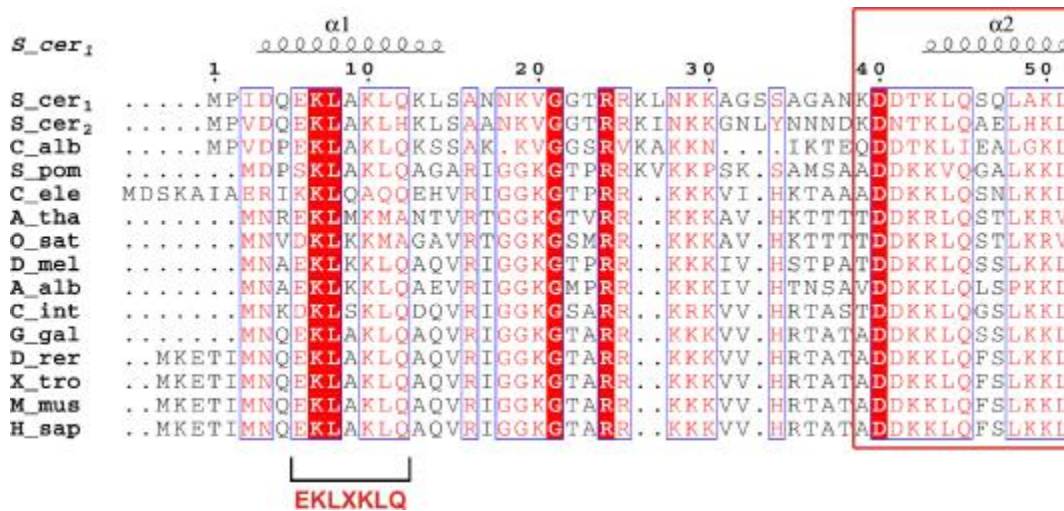
Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war noch für keinen der Ribosomen-assoziierten Faktoren (TF, SRP, RAC/Ssb und NAC) die genaue Lokalisation am Ribosom bekannt. Die ersten identifizierten Kontakte zeigten Pool *et al.* für SRP54 in Eukaryonten und Kramer *et al.* für TF in Eubakterien (Pool *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2002). Für beide Faktoren wurden die Homologe der ribosomalen Proteinfamilien L23p und L29p identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in biochemischen Studien der Bindungsmechanismus und die Lokalisation von NAC am Ribosom näher charakterisiert. Da Mutationen in den NAC-Genen bei allen bisher betrachteten höheren eukaryontischen Organismen embryonal letal sind, wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als eukaryontischer Modellorganismus ausgewählt. Die Deletion der für die NAC-Untereinheiten kodierenden Gene (*egd2* –  $\alpha$ -NAC;

*egd1* –  $\beta$ -NAC) zeigt hier nur einen schwachen Phänotyp (Franke *et al.*, 2001; Reimann *et al.*, 1999). Außerdem lässt sich, aufgrund der relativ problemlosen Kultivierung der Hefe und der recht unkomplizierten molekularbiologischen Manipulierbarkeit, gut der Einfluss von einzelnen Sequenzbereichen auf die Assoziation von NAC mit Ribosomen studieren.

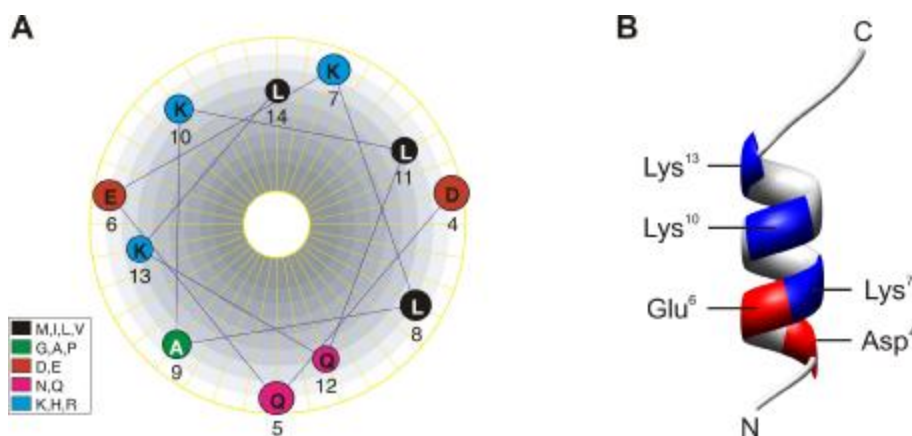
### **Für die stabile Assoziation mit Ribosomen ist ein konserviertes Sequenzmotiv von $\beta$ -NAC verantwortlich**

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass die Deletion der ersten 11 Aminosäuren am N-Terminus von EGD1 ( $\beta$ -NAC) die Assoziation von NAC mit Ribosomen stark verringert bzw. ganz verhindert (Franke *et al.*, 2001). Gleichzeitig war in der Arbeit bereits ein konserviertes Sequenzmotiv – <sup>7</sup>KLXKL<sup>11</sup> – hervorgehoben worden, dass bei allen  $\beta$ -NAC Homologen als N-terminale  $\alpha$ -Helix vorhergesagt wird (Franke *et al.*, 2001). Aufgrund des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzvergleichs kann dieses Motiv auf <sup>6</sup>EKLXKLQ<sup>12</sup> erweitert werden (siehe Abbildung 43). Das Sequenzmotiv wurde wegen des hohen Konservierungsgrades in dieser Arbeit für die nähere Charakterisierung ausgewählt. Zum einen wurden die Aminosäuren <sup>6</sup>EKL<sup>8</sup> und zum anderen die Aminosäuren <sup>10</sup>KLQ<sup>12</sup> gegen Alanine ausgetauscht. Die so konstruierten Varianten wurden in Kombination mit *egd2* ( $\alpha$ -NAC) in dem Hefe-Stamm YJF24 ( $\Delta$ *egd2*,  $\Delta$ *egd1*,  $\Delta$ *btt1*) exprimiert. Die Auswirkung der Mutationen auf die Assoziation von NAC mit Ribosomen wurde in Sedimentationsstudien analysiert. Für beide EGD1-Alanin-Mutanten wurde in den Analysen eine deutlich verringerte Bindung von NAC ans Ribosom beobachtet. Die beiden ausgetauschten Motive hatten dabei einen unterschiedlich starken Einfluss auf NACs Assoziation mit dem Ribosom. Während der Austausch von <sup>6</sup>EKL<sup>8</sup> gegen AAA eine ca. 40 %ige Reduktion der NAC-Bindung ans Ribosom bewirkte, wurde im Falle von EGD1-<sup>10</sup>KLQ<sup>12</sup>/AAA NAC nach der Sedimentation fast ausschließlich nur noch im Ribosomen-freien Überstand nachgewiesen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die extrem wichtige Bedeutung der N-terminalen Helix von  $\beta$ -NAC bei der Assoziation mit Ribosomen und zeigen darüber hinaus, dass das evolutionär konservierte Sequenzmotiv – <sup>6</sup>EKLXKLQ<sup>12</sup> – maßgeblich an der stabilen Bindung von NAC ans Ribosom beteiligt ist.



**Abbildung 43** N-terminaler Sequenzvergleich der  $\beta$ -NAC Homologen. Über alle Organismen konservierte Aminosäuren sind mit rotem Hintergrund, konservierte Aminosäureaustausche sind in Rot auf Weiß dargestellt. Repräsentativ ist die mit dem Programm PHD (Rost and Sander, 1993) vorhergesagte Sekundärstruktur der ersten Sequenz illustriert. Das konservierte Sequenzmotiv –  $^6\text{EKLXKLQ}^{12}$  – ist unter dem Sequenzvergleich hervorgehoben. Der zur hoch konservierten NAC-Domäne gehörende Sequenzbereich ist mit einem roten Kasten umrahmt. Für die Zugangsnummern der Sequenzen und Bezeichnung der Organismen siehe Abb. 6B.

Die Darstellung der Aminosäuresequenz der N-terminalen Helix als *helical wheel* zeigt keine auffälligen Charakteristika (Abbildung 44A), wie z.B. die einer amphipatischen Helix. Ebenfalls lässt sich nur eine recht gleichmäßige Verteilung der positiv bzw. negativ geladenen Aminosäurereste feststellen. In der Darstellung einer modellierten  $\alpha$ -helikalen Struktur mit entsprechender Aminosäuresequenz zeigt sich jedoch, dass sich die zum Teil hoch konservierten Lysinreste wie ein positiv geladenes Band über die Helix ziehen (Abbildung 44B).



**Abbildung 44** Darstellung der Aminosäuresequenz der vorhergesagten N-terminalen Helix von EGD1 ( $\beta$ -NAC) als **A** *helical wheel* und **B** modellierte Struktur.

Um zu überprüfen, inwiefern diese kurze Helix die Assoziation mit Ribosomen allein vermitteln kann, wurden drei N-terminale Peptidsequenzen von EGD1 ( $\beta$ -NAC) mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) aus *E. coli* fusioniert (MBP ist normalerweise überhaupt nicht Ribosomen-assoziiert). In den Sedi-mentations-Studien mit den Fusionsproteinen zeigte sich, dass die ersten 14 Aminosäuren (EGD1<sup>1-14</sup>-MBP) nicht ausreichen, um MBP an Ribosomen zu binden. Erst die Fusion etwas längerer Peptidsequenzen (EGD1<sup>1-23</sup>-MBP; EGD1<sup>1-39</sup>-MBP) ermöglichten die Assoziation von MBP mit Ribosomen. Die im Vergleich zu wt NAC recht schwache Bindung der Fusionsproteine an Riboso- men deutete jedoch schon darauf hin, dass NAC über mehrere Kontaktstellen mit dem Ribosom assoziiert sein muss, wobei der N-Terminus von EGD1 ent- scheidend für die Stabilität der Bindung ist.

### **Die Assoziation von NAC mit Ribosomen erfolgt über mehrere Bindungsstellen**

Für die Identifizierung der Bindungsstelle von NAC am Ribosom wurden die Gene *egd2* und *egd1* zusammen in *E. coli* exprimiert und der rekombinante heterodimere Hefe NAC Komplex mittels verschiedener Chromatographie- Methoden gereinigt. In den für die *in vitro* Studien eingesetzten vereinigten Fraktionen des letzten Chromatographie-Schritts lagen EGD2 ( $\alpha$ -NAC) und EGD1 ( $\beta$ -NAC) in einem 1:1 Verhältnis vor.

Die funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Hefe wt NAC erfolgte durch die *Photo-Cross-linking* Technik zu naszierenden Polypeptid- ketten von RNCs, mit der NAC ursprünglich entdeckt wurde (Wiedmann *et al.*, 1994), und die Rückbindung an 80S Ribosomen aus Hefe. Die Ergebnisse zeigten, dass das in *E. coli* exprimierte und gereinigte Hefe NAC die be- schriebenen charakteristischen Eigenschaften erfüllt. Bei der Quervernetzung zu naszierenden Polypeptiden fiel jedoch im Vergleich zu humanem NAC auf, dass EGD2 und EGD1 weniger zu den Polypeptidketten verknüpft wurden. Eine mögliche Erklärung ist die Verwendung von Kaninchen Retikulozyten-Lysat bei der Herstellung der RNCs (persönliche Mitteilung M. Wiedmann).

Zur Identifizierung der ribosomalen Bindungspartner von NAC wurden *Cross-linking* Studien mit dem rekombinanten, gereinigten Hefe wt NAC und Hochsalz-gereinigten 80S Ribosomen aus dem Hefestamm YJF24 ( $\Delta$ *egd2*,

$\Delta egd1$ ,  $\Delta btt1$ ) durchgeführt. Durch die Hochsalzreinigung werden Ribosomen-assoziierte Proteine entfernt, welche mit NAC um Kontaktstellen konkurrieren könnten. Des Weiteren wird durch diese Behandlung sichergestellt, dass Verknüpfungen nur zu ribosomalen Proteinen und nicht zu anderen assoziierten Faktoren erfolgen können. Das verwendete *Cross-linking* Reagenz N-( $\alpha$ -Maleimidoacetoxy)succinimid ester (AMAS) reagiert unter den gewählten Reaktionsbedingungen primär mit  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinen. Der Vorteil besteht darin, dass sowohl die ribosomalen Proteine als auch beide NAC-Untereinheiten reich an Lysinresten sind. Somit kann über die gesamte Moleküllänge auf Interaktionen getestet werden. Der Abstand zwischen den reaktiven Gruppen ist bei AMAS vergleichsweise sehr gering und beträgt nur 4,4 Å.

Die Ergebnisse zeigen sowohl für EGD1 ( $\beta$ -NAC) als auch für EGD2 ( $\alpha$ -NAC) mehrere spezifische *Cross-Link* Produkte unterschiedlicher Intensität (siehe Tabelle 7). Besonders auffällig sind für EGD1 zwei Verknüpfungen zu ribosomalen Proteinen von ungefähr 15 kDa bzw. 25 kDa ( $y\beta X15$  und  $y\beta X25$ ) und für EGD2 ein *Cross-Link* Produkt zu einem ribosomalen Protein von ebenfalls ungefähr 25 kDa ( $y\alpha X25$ ) (das Molekulargewicht wurde entsprechend der Verschiebung von EGD1 bzw. EGD2 in der Gelelektrophorese bestimmt).

**Tabelle 7** Mit AMAS erhaltene Verknüpfungen von EGD1 ( $\beta$ -NAC) und EGD2 ( $\alpha$ -NAC) zu ribosomalen Proteinen. Die Zahlen geben die Molekulargewichts-Verschiebung der NAC-Untereinheiten in der Gelelektrophorese in kDa an. Die von der Intensität her auffälligen *Cross-Link* Produkte sind hervorgehoben.

<i>Cross-Link</i> Produkte zu	
EGD1	EGD2
<b><math>y\beta X15</math></b>	$y\alpha X15$
	$y\alpha X18$
	$y\alpha X20$
<b><math>y\beta X25</math></b>	<b><math>y\alpha X25</math></b>
$y\beta X35$	$y\alpha X34$
	$y\alpha X38$
$y\beta X42$	$y\alpha X43$

### **$\beta$ -NAC assoziiert über den N-Terminus mit rpL31**

Da die meisten ribosomalen Proteine in der SDS-PAGE ein höheres apparentes Molekulargewicht aufweisen, ist es schwierig anhand der kalku-

lierten Molekulargewichtszunahme eine generelle Zuordnung zu treffen. Hinzu kommt, dass in Folge der elektrophoretischen Molekulargewichts-Verschiebung alleine für den Bereich von 15 kDa bis 25 kDa mehr als die Hälfte der 46 ribosomalen Proteine der großen Untereinheit in Frage kommen. Daher konzentrierten wir uns zunächst auf die Proteine in der Nähe des ribosomalen Tunnelausgangs (siehe Tabelle 8), wo die Bindungsstelle von NAC aufgrund der beschriebenen Funktionen erwartet wurde.

**Tabelle 8** Auflistung der ribosomalen Proteine mit kalkulierte Molekulargewicht ( $M_w$ ), die den Tunnelausgang umgeben. Das ribosomale Protein rpL4 befindet sich nicht am Tunnelausgang, ragt aber bis in den Tunnel hinein.

ribosomales Protein	$M_w$ [kDa]
rpL4	39,1
rpL17	20,6
rpL19	21,7
rpL25	15,8
rpL26	14,4
rpL31	13,0
rpL35	13,9

Für die ribosomalen Proteine rpL25, rpL35 und rpL4 wurden erfolgreich Hühner für die Produktion von Antikörpern immunisiert. Allerdings wurden in der Analyse der *Cross-linking* Ansätze keine Verknüpfungen der genannten Proteine zu EGD1 ( $\beta$ -NAC) oder EGD2 ( $\alpha$ -NAC) detektiert.

Mittels N-terminaler Sequenzierung und experimenteller Überprüfung wurde für EGD1 ( $\beta$ -NAC) das *Cross-Link* Produkt  $\gamma\beta X15$  eindeutig als die Verknüpfung mit dem ribosomalen Protein rpL31 identifiziert. Die Interaktion von EGD1 mit rpL31 erfolgt dabei über den N-Terminus, welcher für die Stabilität der Assoziation von NAC mit dem Ribosom entscheidend ist. Die Deletion der ersten 11 Aminosäuren führt in *Cross-linking* Studien zu einem vollständigen Verlust der Verknüpfung mit rpL31. Hingegen bleiben die weiteren Kontakte durch die Deletion unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu erhält man mit einem Positions-spezifischen *Cross-linking* Reagenz aus dem Bereich der N-terminalen Helix von EGD1 nur noch die Verknüpfung  $\gamma\beta X15$ . Die Tatsache, dass beide NAC-Untereinheiten spezifisch zu mehreren ribosomalen Proteinen verknüpft werden, unabhängig von der Interaktion der N-terminalen Helix von  $\beta$ -

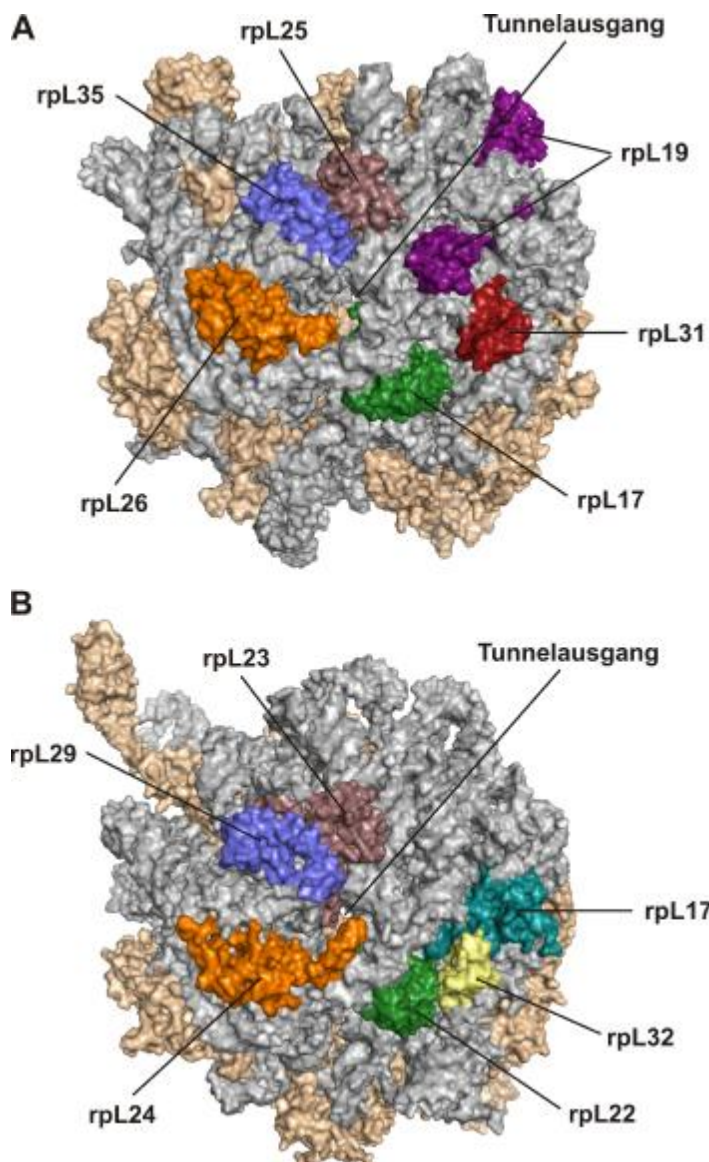
NAC zu rpL31, bestätigt, dass die Assoziation von NAC zum Ribosom über mehrere Kontaktstellen erfolgt. In Anbetracht des relativ geringen Abstandes zwischen den reaktiven Gruppen des *Cross-Linkers* AMAS (4,4 Å), wird außerdem deutlich, dass sich die NAC-Untereinheiten in einem engen Kontakt zu den verknüpften ribosomalen Proteinen befinden müssen.

### **rpL31 – Bindungsstelle von NAC und dem SRP-Rezeptor**

Das ribosomale Protein rpL31 gehört zu den Proteinen, welche den ribosomalen Tunnelausgang umgeben (siehe Abbildung 45). Bemerkenswerterweise finden sich Homologe von rpL31 nur in Eukaryonten und in Archaeobakterien, ebenso wie das Vorkommen von NAC auf diese Domänen beschränkt ist. In Eubakterien wie *E. coli* findet sich weder ein Homolog zu NAC noch ein Homolog zu rpL31. Daher ist es auch nicht überraschend, dass Hefe wt NAC in keiner Weise mit vergleichbarer Effizienz an Ribosomen aus *E. coli* binden kann, wie an Ribosomen aus *S. cerevisiae*.

In der Hefe *S. cerevisiae* gibt es zwei Gene (*rpl31a* und *rpl31b*), welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, die für fast identische Varianten von rpL31 kodieren. Der Unterschied liegt lediglich in einem Aminosäureaustausch (Asp<sup>47</sup>/Glu<sup>47</sup>). Über die Bedeutung von rpL31 als struktureller Bestandteil des Ribosoms ist bisher wenig bekannt. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Deletion von *rpl31a* zu einer Verlängerung der Lebensspanne (mehr Zellteilungen) bei Hefe führt. Interessanterweise zeigt sich dies nicht für die Deletion von *rpl31b* (Kaeberlein *et al.*, 2005). Die Beobachtung sagt zwar nichts über die Funktion von rpL31 als Komponente des Ribosoms aus, deutet aber darauf hin, dass *rpl31a* stärker exprimiert wird. Die Verlängerung der Lebensspanne könnte somit eine Folge der Energieeinsparung durch die Deletion sein.

Interessanterweise veröffentlichte jedoch die Gruppe um R. Beckmann gerade die Kryo-Elektronen-Mikroskopie (Kryo-EM) Struktur des sogenannten „*docking complex*“, welcher aus SRP gebunden an das translatierende 80S Ribosom und dem SRP-Rezeptor (SR) besteht. Die Struktur zeigt, dass die SRβ-Untereinheit in dem Komplex sowohl mit der 7S RNA von SRP als auch mit der Helix 99 der 25S rRNA und dem ribosomalen Protein rpL31 interagiert.



**Abbildung 45** Gegenüberstellung der großen ribosomalen Untereinheiten von Eukaryonten und Eubakterien. **A** 60S Untereinheit aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 1S11) **B** 50S Untereinheit aus *Escherichia coli* (PDB ID: 2AWB)

Die ribosomalen Proteine, die den Tunnelausgang umgeben, sind farbig hervorgehoben. Homologe Proteine sind in denselben Farben koloriert. Der Vergleich zeigt, dass es vom ribosomalen Protein rpL31, das ein wichtiger Bindungspartner von NAC bei der stabilen Assoziation mit dem Ribosom ist, kein Homolog in Eubakterien gibt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC) angefertigt.

Gleichzeitig verlagert sich hierdurch die NG-Domäne von SRP54, wodurch die Hauptkontaktstelle des Ribosoms für die Interaktion mit dem Translokon frei wird (Halic *et al.*, 2006). Diese neuen Einblicke in die SRP vermittelte Proteintranslokation zeigen, mit der Interaktion von SR $\beta$  zu rpL31, die Beteiligung einer in diesem Zusammenhang neuen ribosomalen Komponente. Besonders interessant ist das Ergebnis im Hinblick auf die für NAC beschriebene Funktion bei der Translokation, bei der es neben SRP und SR als weiterer Faktor an der korrekten Zielsteuerung von Proteinen ans ER beteiligt ist. Durch den von uns identifizierten Kontakt der N-terminalen Helix von EGD1 ( $\beta$ -NAC) zu rpL31 zeigt sich, dass NAC unter anderem eine wichtige Interaktion zu dem ribosomalen Protein ausbildet, mit dem auch der SRP-Rezeptor interagiert. Die in ersten Studien von uns identifizierten Sequenzbereiche von rpL31, welche wahr-



scheinlich an der Bindung von  $\beta$ -NAC beteiligt sind, lassen im Vergleich zur Kryo-EM Struktur vom „*docking complex*“ allerdings bisher nur den Rückschluss zu, dass NAC und SR $\beta$  nicht über dieselben Kontaktstellen an rpL31 binden.

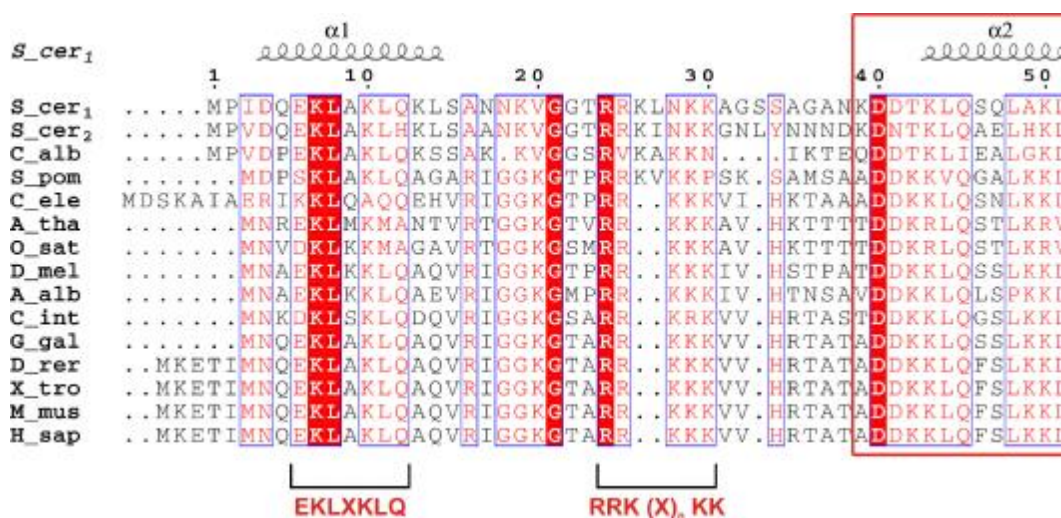
Die Ergebnisse, aus unseren Versuchen eine rpL31 Null-Mutante herzustellen, deuten mit sehr großer Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass rpL31 ein essentielles ribosomales Protein ist, welches nur in Eukaryonten und Archaeobakterien vorkommt.

rpL31 ist damit ein weiteres Protein, welches in direkter Umgebung des ribosomalen Tunnelausgangs liegt und eine wichtige Kontaktstelle für die Assoziation von zumindest zwei Faktoren (NAC und SR) ist. Hingegen wurde bisher nur rpL23p (rpL25 in Hefe) als eine universelle Bindungsstelle für cytosolische Faktoren angesehen, die im Bereich des Tunnelausgangs mit dem Ribosom assoziieren. So wurden in verschiedenen Studien der Kontakt von SRP54, wie auch dem eubakteriellem Homolog Ffh, von Trigger Faktor und vom Translokon zu rpL23p nachgewiesen (Pool *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2002; Beckmann *et al.*, 2001).

### Ein möglicher Kontakt von $\beta$ -NAC mit rpL23p?

In erst kürzlich veröffentlichten Studien wurden Ergebnisse präsentiert, die auf eine Assoziation von Hefe NAC mit rpL25 (rpL23p) hindeuten. In der Analyse der N-terminalen EGD1-Alanin-Mutanten (<sup>6</sup>EKL<sup>8</sup>/AAA und <sup>10</sup>KL<sup>11</sup>/AA), für die wir eine deutlich reduzierte Assoziation mit Ribosomen festgestellt hatten, konnten Wegrzyn *et al.* keinen negativen Einfluss auf die Bindung beobachten. Allerdings wurden diese Untersuchungen nur in Rückbindungstests durchgeführt, wobei die Autoren sowohl Ribosomen aus *E. coli* einsetzten (die kein NAC Homolog besitzen und mit denen Hefe NAC nicht stabil assoziiert; siehe 3.9), als auch aus *S. cerevisiae*. In einem Vorversuch mit rekombinantem Hefe wt NAC waren sie nämlich zu dem Ergebnis gekommen, dass NAC an Ribosomen aus *E. coli* genauso effizient bindet, wie an Ribosomen aus Hefe. Wegrzyn *et al.* identifizierten jedoch ein ebenfalls konserviertes Sequenzmotiv <sup>24</sup>RRK (X)<sub>n</sub> KK<sup>30</sup>, das in einem als ungeordnet vorhergesagtem Bereich zwischen der N-terminalen Helix und der Helix der NAC-Domäne von EGD1 ( $\beta$ -NAC) liegt (siehe Abbildung 46). In der Analyse der Assoziation von EGD1-Alanin-Mutanten mit Ribosomen beobachteten sie für <sup>24</sup>RRK<sup>26</sup>/AAA und <sup>29</sup>KK<sup>30</sup>/AA eine deutlich reduzierte Bindung (insbesondere für <sup>24</sup>RRK<sup>26</sup>/AAA).

Sie postulierten daher, dass das konservierte Sequenzmotiv  $^{24}\text{RRK}(\text{X})_n\text{KK}^{30}$ , das in einem exponierten Loop eines vorhergesagten Helix-Loop-Helix Motivs am N-Terminus von  $\beta$ -NAC liegt (Im Vergleich zu beschriebenen Helix-Loop-Helix Motiven (Branden and Tooze, 1998) fehlen dem Bereich die entsprechenden charakteristischen Eigenschaften.), hauptsächlich für die Ribosomenbindung verantwortlich ist. Der früher beobachtete Verlust der Assoziation mit Ribosomen für die N-terminale Deletion von EGD1 ist nach ihrer Interpretation auf eine Veränderung der strukturellen Konformation zurückzuführen (Wegrzyn *et al.*, 2006).

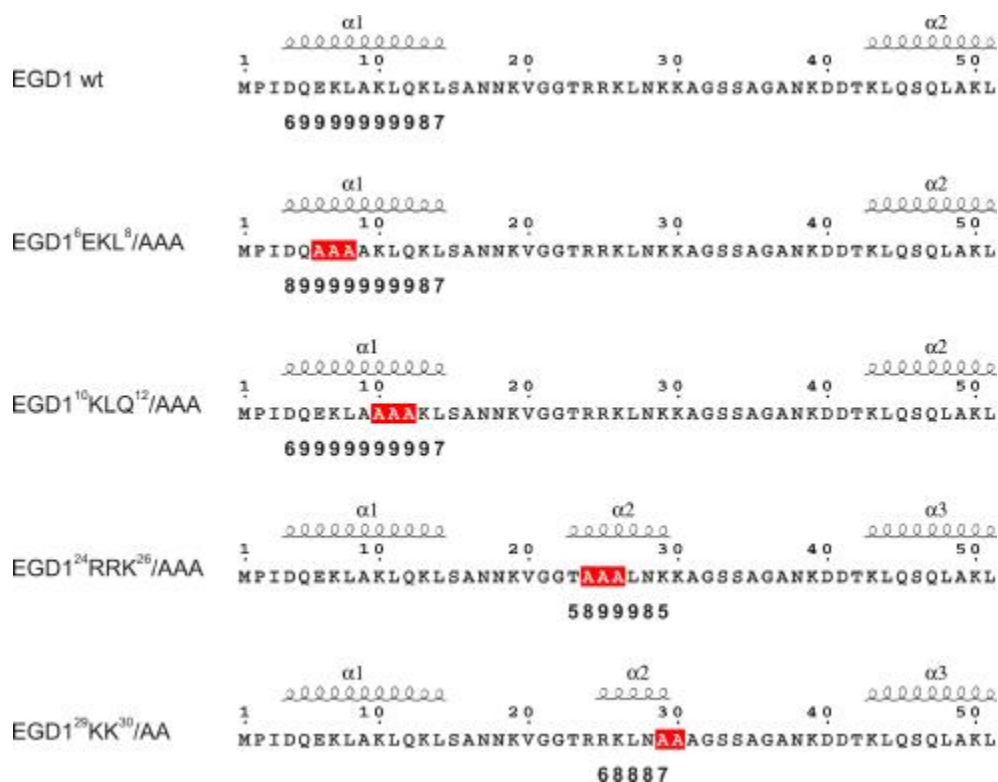


**Abbildung 46** N-terminaler Sequenzvergleich der  $\beta$ -NAC Homologen. Über alle Organismen konservierte Aminosäuren sind mit rotem Hintergrund, konservierte Aminosäureaustausche sind in Rot auf Weiß dargestellt. Repräsentativ ist die mit dem Programm PHD (Rost and Sander, 1993) vorhergesagte Sekundärstruktur der ersten Sequenz illustriert. Die im Text beschriebenen konservierten Sequenzmotive  $^6\text{EKLXKLQ}^{12}$  und  $^{24}\text{RRK}(\text{X})_n\text{KK}^{30}$  sind unter dem Sequenzvergleich hervorgehoben. Der zur hoch konservierten NAC-Domäne gehörende Sequenzbereich ist mit einem roten Kasten umrahmt. Für die Zugangsnummern der Sequenzen und Bezeichnung der Organismen siehe Abbildung 6B.

Wegrzyn *et al.* hatten Hefe NAC ebenfalls mit N-terminalen His-tag an EGD2 in *E. coli* exprimiert, welcher allerdings nicht durch einen proteolytischen Verdau (wie in unserem Versuchsansatz) entfernt werden konnte. Aufgrund der in unseren Arbeiten festgestellten artifiziiellen Verstärkung der Assoziation von NAC mit Ribosomen durch einen His-tag muss man schließen, dass das Ergebnis von Wegrzyn *et al.* zur Funktion der konservierten N-terminalen Sequenz  $^6\text{EKLXKLQ}^{12}$  bei der Bindung ans Ribosom artifiziiell ist und fehlinterpretiert wurde. Die Charakterisierung dieser Sequenz war nur in Rückbindungstests mit rekombinantem NAC analysiert worden. Deutlich wird die

artifizielle Verstärkung der Assoziation mit Ribosomen noch mal in einem Rückbindungstest im Vergleich von Hefe NAC ohne bzw. mit His-tag an EGD2 mit Ribosomen aus *E. coli* bzw. aus *S. cerevisiae* (siehe 8.2). In der Analyse ist ganz klar ersichtlich, dass Hefe NAC (ohne His-tag) überhaupt nicht effizient an Ribosomen aus *E. coli* bindet, wie an Ribosomen aus *S. cerevisiae*.

Für das von Wegrzyn *et al.* identifizierte Sequenzmotiv  $^{24}\text{RRK}(\text{X})_n\text{KK}^{30}$  stellt sich jedoch die Frage, weshalb Mutationen in dieser Sequenz trotz des His-tags am N-Terminus von EGD2 ( $\alpha$ -NAC) zu einer verringerten Assoziation mit Ribosomen führen. Daher wurden für die mutierten Aminosäuresequenzen von EGD1 ( $\beta$ -NAC) mit dem Programm PHD (Rost and Sander, 1993) Sekundärstrukturvorhersagen durchgeführt, um die verschiedenen Varianten auf mögliche strukturelle Veränderungen hin zu überprüfen (Abbildung 47).



**Abbildung 47** Vergleich der vorhergesagten Sekundärstrukturen der EGD1-Alanin-Mutanten  $^6\text{EKL}^8/\text{AAA}$ ,  $^{10}\text{KLQ}^{12}/\text{AAA}$ ,  $^{24}\text{RRK}^{26}/\text{AAA}$  und  $^{29}\text{KK}^{30}/\text{AA}$  mit dem Wildtyp (WT). Die ausgetauschten Aminosäuren sind an den entsprechenden Positionen in Weiß auf Rot illustriert. Über den Sequenzen ist jeweils die mit dem Programm PHD (Rost and Sander, 1993) vorhergesagte Sekundärstruktur dargestellt. Unter den Sequenzen sind die Zuverlässigkeitswerte für die im Vergleich relevanten vorhergesagten Sekundärstrukturen angegeben. Die Skala der Zuverlässigkeitswerte geht von 0 – 9. Es gilt, dass ab einem Zuverlässigkeitswert von 5 und größer die tatsächliche Wahrscheinlichkeit für die vorhergesagte Sekundärstruktur über 82 % beträgt.

Der Vergleich der vorhergesagten Sekundärstrukturen zeigt, dass die in dieser Arbeit vorgenommenen Aminosäureaustausche für <sup>6</sup>EKL<sup>8</sup> und <sup>10</sup>KLQ<sup>12</sup> in EGD1 (β-NAC) zu Alaninen keine Auswirkung auf die Konformation der vorhergesagten N-terminalen Helix haben und damit unsere beobachtete Auswirkung auf die Assoziation mit Ribosomen dem mutierten Sequenzmotiv <sup>6</sup>EKLXKLQ<sup>12</sup> zuzuschreiben ist. Dem entgegen stellt sich jedoch für die von Wegrzyn *et al.* identifizierte Sequenz heraus, dass durch die Mutationen <sup>24</sup>RRK<sup>26</sup>/AAA und <sup>29</sup>KK<sup>30</sup>/AA in EGD1 in einer eigentlich ungeordneten Region mit sehr großer Wahrscheinlichkeit eine α-helikale Konformation induziert wird. Insbesondere für die Mutation EGD1<sup>24</sup>RRK<sup>26</sup>/AAA, welche auch in der Analyse der Assoziation mit Ribosomen den stärkeren negativen Effekt zeigte. Über die Auswirkung einer Konformationsänderung in dem flexiblen, wahrscheinlich ausgestreckten Bereich zu einer Helix kann nur spekuliert werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die resultierende Verkürzung des Abstandes zwischen den beiden Helices durch die Induktion einer α-helikalen Konformation in dem Bereich negative Auswirkungen auf weitere Kontaktstellen zum Ribosomen haben kann, wie die richtige Positionierung der NAC-Domäne oder die korrekte Bindung der N-terminalen Helix an rpL31.

Aus dem Bereich des Sequenzmotivs <sup>24</sup>RRK (X)<sub>n</sub> KK<sup>30</sup> erhielten Wegrzyn *et al.* in Positions-spezifischen *Cross-linking* Studien Verknüpfungen zu den ribosomalen Proteinen rpL23 und rpL29 beim Einsatz von *E. coli* Ribosomen und zu rpL25 (Homolog zu rpL23) für Ribosomen aus Hefe. Hierbei verwendeten sie das Photo-aktivierbare *Cross-linking* Reagenz Benzophenon-4-iodoacetamid (BPIA), dessen Abstand zwischen den reaktiven Gruppen 10 Å beträgt. In unserer Analyse, der mit AMAS erhaltenen *Cross-Link* Produkte, mit Antikörpern gegen die Hefe ribosomalen Proteine rpL25 und rpL35 (Homolog zu *E. coli* rpL29) konnte keine der Verknüpfungen mit einem dieser Antikörper detektiert werden. Eine sehr wahrscheinliche Ursache hierfür ist der Abstand zwischen den reaktiven Gruppen der verwendeten *Cross-Linker*, welcher bei AMAS 4,4 Å beträgt gegenüber 10 Å bei BPIA. Dies bedeutet, dass das Sequenzmotiv <sup>24</sup>RRK (X)<sub>n</sub> KK<sup>30</sup> sich in keinem besonders engen Kontakt mit rpL25 befinden muss, um mit ihm verknüpft zu werden. Des Weiteren reagiert die Photo-aktivierbare Gruppe von BPIA unabhängig der exponierten Aminosäure-

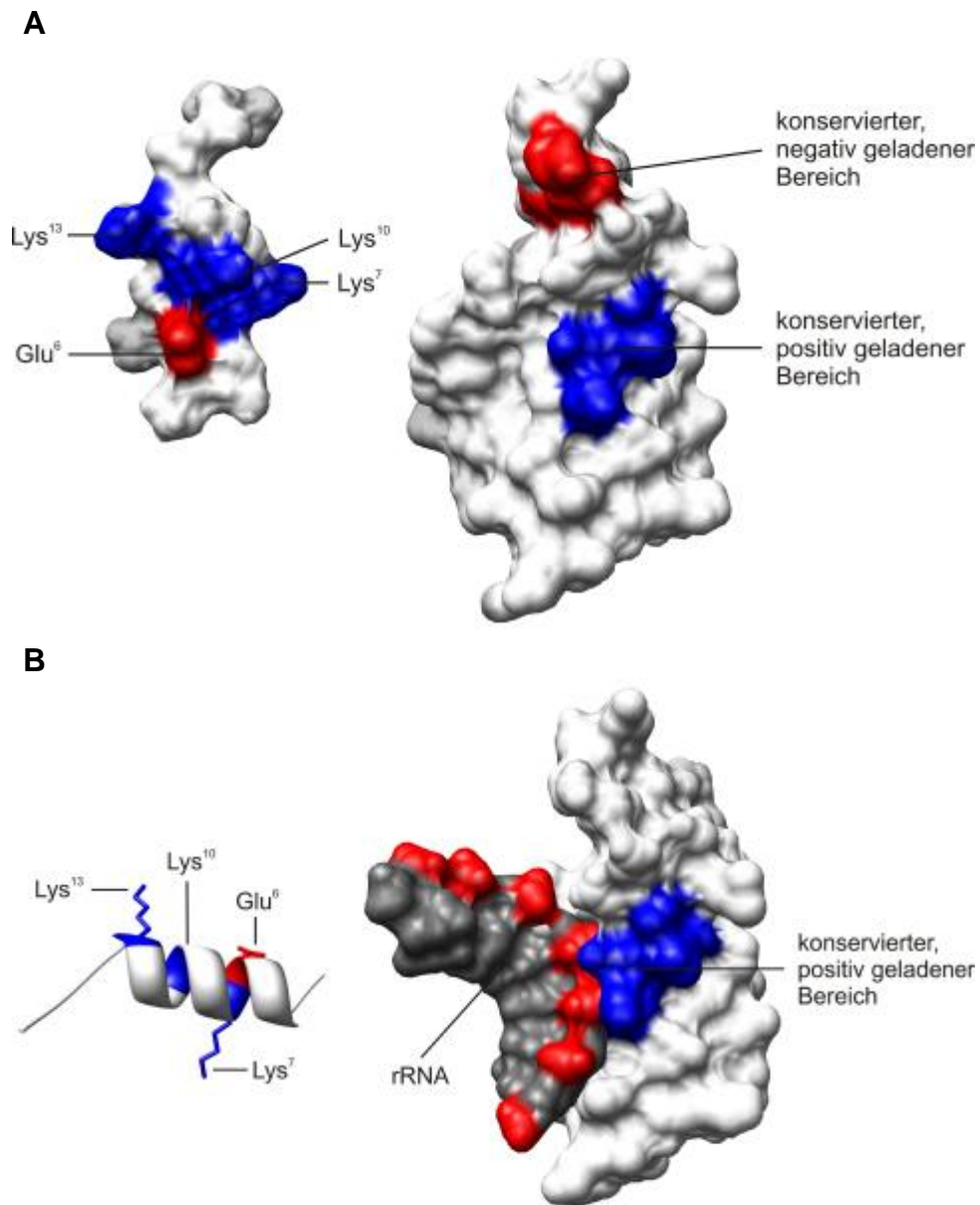
reste mit C-H Bindungen, wodurch sich gegenüber AMAS, welches spezifisch mit Aminogruppen reagiert, mehr Möglichkeiten für Verknüpfungen ergeben.

Auch wenn sich EGD1 ( $\beta$ -NAC) aus dem Bereich des Sequenzmotivs  $^{24}\text{RRK (X)}_n \text{KK}^{30}$  mit BPIA zu rpL25 verknüpfen lässt, muss man die Bedeutung bei der Assoziation von NAC mit Ribosomen anzweifeln. Gegen eine Beteiligung dieses Sequenzmotivs spricht auch unsere Beobachtung, dass die Fusion der ersten 23 Aminosäuren von EGD1, welche dieses Sequenzmotiv noch nicht beinhalten, mit MBP ausreicht, um MBP an Ribosomen zu binden. Die Tatsache, dass Hefe NAC nicht vergleichbar mit Ribosomen aus *E. coli* assoziiert, obwohl ein rpL25 Homolog existiert (rpL23), zeigt ebenfalls, dass der „Kontakt“ zu rpL25 nicht hauptsächlich für die Assoziation von NAC mit Ribosomen verantwortlich oder entscheidend sein kann. Demgegenüber zeigen unsere Ergebnisse, dass die Bindung von NAC an Ribosomen über mehrere andere Kontaktstellen erfolgt. Dabei hat die Interaktion des N-terminalen Sequenzmotivs  $^6\text{EKLXKLQ}^{12}$  zu dem ribosomalen Protein rpL31 eine besondere Bedeutung für die Stabilität der Assoziation von NAC mit Ribosomen.

### **Mögliche Bindungsmechanismen von $\beta$ -NAC an rpL31**

Da rpL31 offenbar essentiell für die Hefe ist, konnten wir keine Mutationsstudien auf Seiten dieses ribosomalen Proteins durchführen. Um trotzdem Hinweise auf die NAC-Bindungsstelle innerhalb von rpL31 zu bekommen, inkubierten wir eine Peptid-Bibliothek, die die gesamte Aminosäuresequenz von rpL31 repräsentiert mit wt NAC aus Hefe bzw. der NAC-Deletionsmutante (EGD1 $\Delta$ 1-11). Interessanterweise zeigen die von uns identifizierten Peptidsequenzen von rpL31, welche möglicherweise an der Interaktion mit  $\beta$ -NAC beteiligt sind, in der dreidimensionalen Struktur auffällige charakteristische Eigenschaften. So weist der Bereich der Peptide Nr. 12-14 (Sequenzabschnitt: Val<sup>23</sup> – Lys<sup>41</sup>) eine Region mit konservierten, positiv geladenen Aminosäureresten auf. Demgegenüber befindet sich in dem Bereich der Peptide Nr. 36-39 (Sequenzabschnitt: Leu<sup>71</sup> – Ser<sup>91</sup>) eine negativ geladene Region, welche ebenfalls konserviert ist (siehe 7.3 für einen Sequenzvergleich von rpL31 Homologen). Im Vergleich zur Ladungsverteilung der N-terminalen Helix von EGD1 lässt sich darüber ein Modell entwickeln, wie  $\beta$ -NAC mit rpL31 assoziieren könnte. Möglich wäre die Interaktion des Glu<sup>6</sup> mit dem positiv gela-

denem Bereich bei gleichzeitiger Wechselwirkung der Lysinreste (Lys<sup>7</sup>, Lys<sup>10</sup> und Lys<sup>13</sup>) mit der negativ geladenen Region von rpL31 (Abbildung 48A).



**Abbildung 48** Mögliche Bindungsmechanismen der N-terminalen Helix von **EGD1 (β-NAC) (links)** mit **rpL31 (rechts)**. **A** Interaktion der konservierten, geladenen Aminosäuren von EGD1 mit den positiv bzw. negativ geladenen Regionen von rpL31, die sich in den identifizierten Peptidsequenzen befinden. **B** Interaktion der positiv geladenen Lysinreste von EGD1 mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der rRNA, bei gleichzeitiger Bindung von Glu<sup>6</sup> an den positiv geladenen Bereich von rpL31. Die farbig hervorgehobenen Aminosäuren und chemischen Gruppen sind entsprechend ihrer Ladung in Blau (positiv) bzw. in Rot (negativ) koloriert. Die Helix (aa 2-14) von EGD1 wurde mit dem Programm PyMOL gemodelt. Die Struktur von rpL31 stammt aus der Kryo-EM Struktur der 60S Untereinheit aus *S. cerevisiae* (PDB ID: 1S1I). Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC) angefertigt.

Überprüfen ließe sich dieses Modell z.B. in Rückbindungstests von NAC an Ribosomen. Durch die Zugabe von Peptiden mit entsprechenden Aminosäu-

resequenzen aus den Regionen von rpL31 könnte dabei eine mögliche Kompetition analysiert werden. Am besten geeignet wäre allerdings die spezifische Mutation der entsprechenden Aminosäuren von rpL31 zur Überprüfung des Modells.

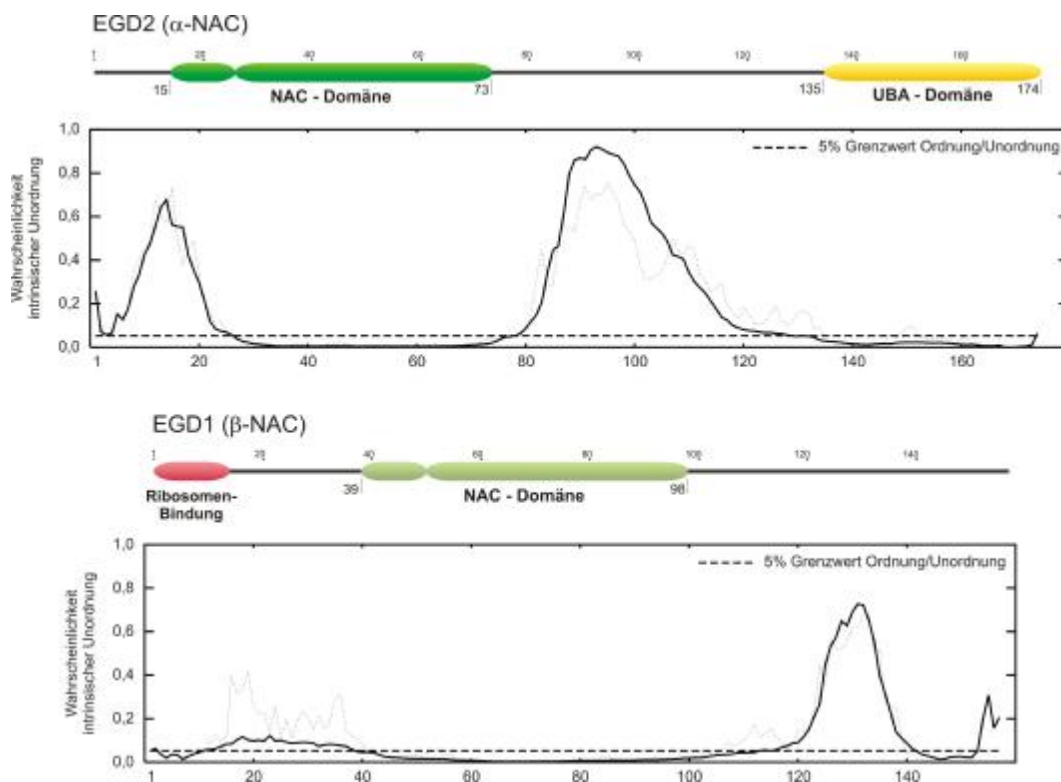
Da eine Interaktion mit dem negativ geladenen Bereich von rpL31 auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse nicht eindeutig beurteilt werden kann, entwickelten wir noch ein weiteres Modell zur Bindung von EGD1 ( $\beta$ -NAC) an rpL31 (Abbildung 48B). Dieses zweite Modell berücksichtigt in erster Linie die auffällige Anordnung der konservierten Lysinreste von EGD1, die sich wie ein positiv geladenes Band über die N-terminalen Helix ziehen (siehe auch Abbildung 44B). Dies lässt die Überlegung zu, dass möglicherweise nur Glu<sup>6</sup> an rpL31 über den positiv geladenen Bereich bindet, wobei die Lysinreste einen Kontakt zum negativ geladenen Phosphatrückgrat der daneben verlaufenden rRNA ausbilden könnten. Für dieses Modell spricht die Beobachtung, dass eine Behandlung von Ribosomen mit RNase A zu einer Verringerung der Rückbindung von NAC an diese Ribosomen führt (unveröffentlichte Daten B. Beatrix). Diese Interaktion ist allerdings nur schwierig experimentell zu überprüfen, da die Bindung nicht sequenzspezifisch oder von einer definierten Sekundärstruktur der rRNA abhängig wäre.

### **Struktur-Modell für Hefe wt NAC**

In Anbetracht der Größe von NAC (35,7 kDa in Hefe) scheint es nicht einfach verständlich zu sein, dass die Assoziation mit Ribosomen über mehrere Kontaktstellen erfolgt. Im Vergleich wurde in biochemischen Studien mit SRP54 (~ 56 kDa) dieses zu nur zwei ribosomalen Proteinen verknüpft. In der Analyse der Sekundärstrukturvorhersage für  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -NAC zeigen sich bei allen Homologen zum Teil längere Sequenzbereiche, für die keine strukturellen Konformationen vorhergesagt werden. Zur genaueren Beurteilung wurde mit dem Programm DISOPRED2 (Ward *et al.*, 2004) eine Vorhersage zur Bestimmung von intrinsisch ungeordneten Bereichen durchgeführt. Die Vorhersage gibt für EGD2 ( $\alpha$ -NAC) den N-Terminus und den Bereich zwischen der NAC-Domäne und der UBA-Domäne mit hoher Wahrscheinlichkeit als intrinsisch ungeordnet an. Für EGD1 ( $\beta$ -NAC) wird der Bereich zwischen der N-terminalen Helix und der NAC-Domäne, wie auch ein C-terminaler Bereich als intrinsisch ungeordnet

vorhergesagt. Auffällig dabei ist die Übereinstimmung der Vorhersage mit den Bereichen der strukturierten NAC-Domäne bzw. UBA-Domäne (Abbildung 49).

Bestätigt wird die Vorhersage durch die von uns gelöste Kristallstruktur des archaebakteriellen NAC (aeNAC) (Spreter *et al.*, 2005). Im Gegensatz zum heterodimeren NAC bei Eukaryonten gibt es bei Archaebakterien nur ein  $\alpha$ -NAC Homolog, welches ein Homodimer formt. Die Struktur zeigt deutlich, dass die NAC-Domäne über einen unstrukturierten Sequenzbereich mit der UBA-Domäne verbunden ist (siehe Abbildung 8A). Im Vergleich zu aeNAC ist dieser Bereich bei Eukaryonten allerdings noch länger. Die Untersuchungen ergaben, dass NAC partiell intrinsisch ungeordnet ist.



**Abbildung 49** Vorhersage möglicher intrinsischer Unordnung von Hefe wt NAC mit dem Programm DISOPRED2 (Ward *et al.*, 2004). Die Graphen unter der schematischen Illustration der konservierten Domänenstruktur geben die Wahrscheinlichkeit intrinsischer Unordnung an. Auf der Abszisse ist die Aminosäuresequenz aufgetragen und auf der Ordinate die Wahrscheinlichkeit der Unordnung auf einer Skala von 0 bis 1, entsprechend 0 % und 100 %. Der vom Programm angegebene Grenzwert für die Beurteilung des Übergangs Ordnung/Unordnung ist mit 5 % angegeben.

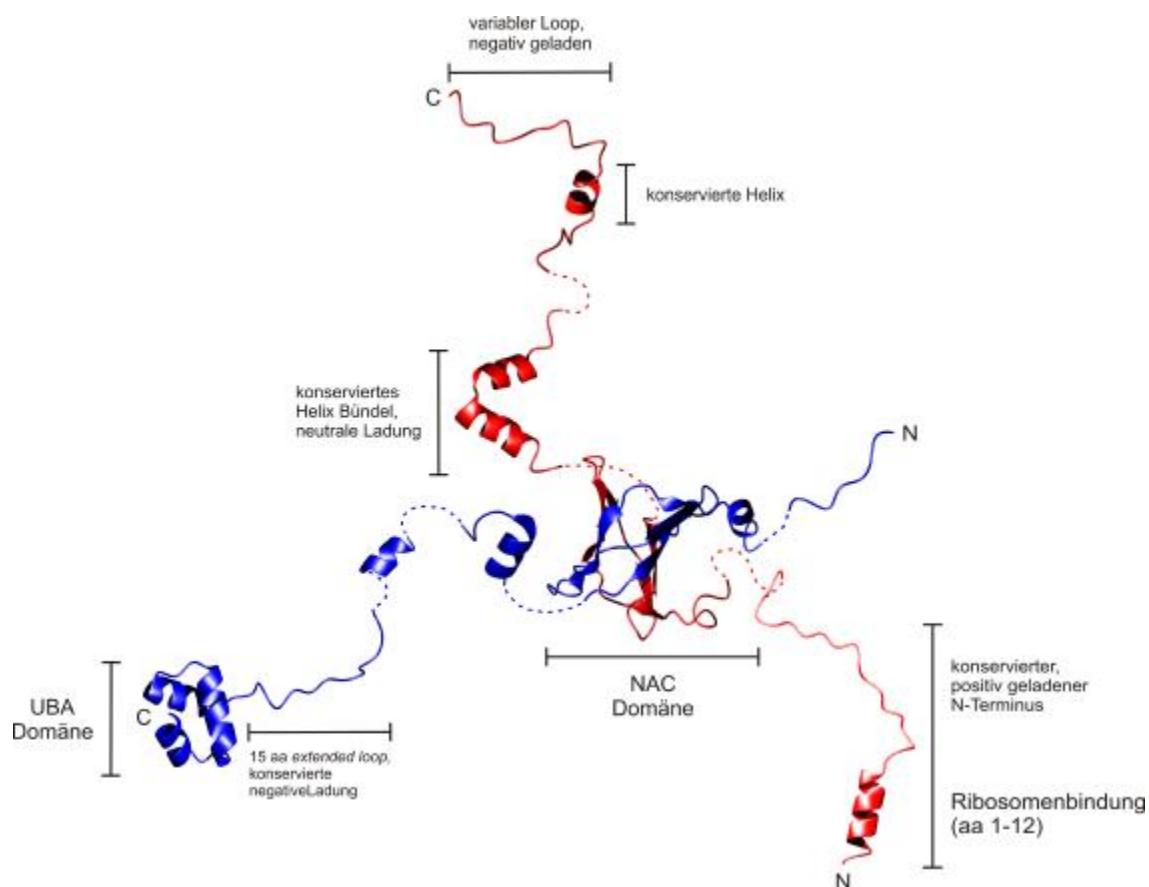
Intrinsisch ungeordnete Proteine oder Proteine mit intrinsisch ungeordneten Bereichen sind häufig an regulatorischen Prozessen, zellulärer Signalübertragung und vielfältigen anderen Interaktionen mit Proteinen und Nukleinsäuren beteiligt. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit einer hohen Spezifität,



aber geringen Affinität, mit zahlreichen unterschiedlich strukturierten Bindungspartnern interagieren können. Dabei wird ein schneller Wechsel zwischen Assoziation und Dissoziation gewährleistet (Dunker *et al.*, 2005; Receveur-Bréchet *et al.*, 2006). Aufgrund der Aminosäure-Zusammensetzung in Kombination mit unstrukturierten Regionen weisen intrinsisch ungeordnete Proteine andere Eigenschaften unter denaturierenden Bedingungen, wie auch abweichende hydrodynamische Eigenschaften im Vergleich zu strukturierten Proteinen auf. Zum Beispiel zeigt sich in der SDS-PAGE häufig ein 1,2-fach bis 1,8-fach höheres Molekulargewicht, als das berechnete, da sie weniger SDS binden als globuläre Proteine (Tompa, 2002). Außerdem führen das Fehlen von strukturierten Domänen und die große Anzahl an hydrophilen und geladenen Aminosäuren zu einer gewissen Resistenz gegen Hitze-induzierte Aggregation (Kalthoff, 2003). Diese und weitere beschriebene Eigenschaften werden auch bei NAC beobachtet. So wurde z.B. die thermische Stabilität bei der Präparation von NAC aus Rinderhirn zur Reinigung eingesetzt (persönliche Mitteilung B. Beatrix). Ebenfalls ist das höhere apparente Molekulargewicht für z.B. EGD2 ( $\alpha$ -NAC) gut ersichtlich, welches in der SDS-PAGE bei  $\sim 27$  kDa liegt (siehe Abbildung 18C), gegenüber dem berechneten Molekulargewicht von 18,7 kDa.

Ausgehend von den Ergebnissen der Sekundärstrukturvorhersage und der Vorhersage intrinsisch ungeordneter Bereiche entwickelten wir auf der Grundlage der Struktur von aeNAC und der gelösten Kristallstruktur der humanen NAC-Domäne ein Modell für die Struktur von Hefe Wildtyp NAC (Abbildung 50).

Das Modell zeigt in der Mitte die heterodimere NAC-Domäne als strukturierten Kern des Komplexes. Der Rest der Sequenz ist in modular verknüpften Sekundärstrukturelementen oder Schleifen-Bereichen dargestellt, die zusammen keine definierte Tertiärstruktur ausbilden. Das Modell repräsentiert sicherlich nur eine mögliche Beschreibung der Gesamtstruktur, da für die einzelnen Sekundärstrukturelemente eine Vielzahl von Orientierungen möglich ist. Durch das Modell wird aber sehr gut veranschaulicht, dass NAC durchaus über mehrere Kontaktstellen zu ribosomalen Proteinen an Ribosomen binden kann.



**Abbildung 50** Struktur-Modell von wt NAC aus *S. cerevisiae*. Das Modell zeigt in der Mitte die heterodimere NAC-Domäne. Der übrige Teil der Struktur wurde entsprechend der Sekundärstrukturvorhersage und der Vorhersage intrinsisch ungeordneter Bereiche modelliert. Hervorgehoben ist die charakteristische Aminosäureverteilung der einzelnen Bereiche. Grundlage für das Modell waren die Kristall-Strukturen von aeNAC und der humanen NAC-Domäne. Die  $\alpha$ -NAC Untereinheit (EGD2) ist in Blau, die  $\beta$ -NAC Untereinheit (EGD1) in Rot dargestellt.

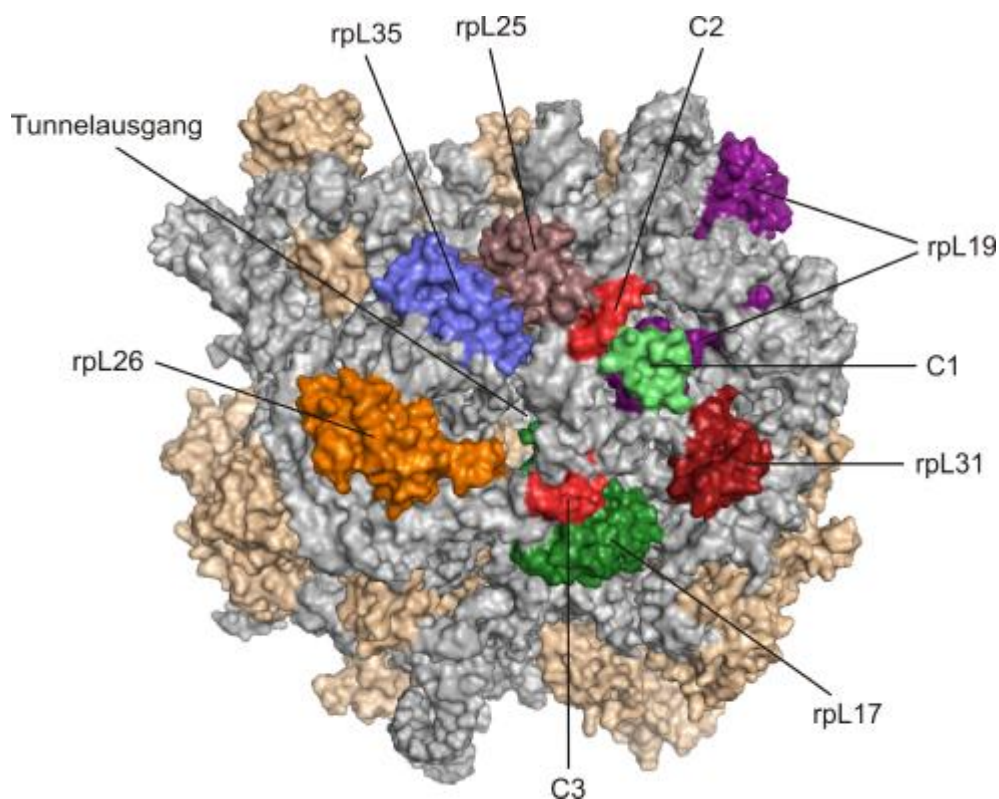
## Weitere potentielle Bindungsstellen von NAC – Ansatzpunkte für zukünftige Studien

Über die bisher nicht identifizierten *Cross-Link* Produkte (Tabelle 6) kann nur spekuliert werden. Durch die partiell ungeordnete Struktur von NAC ist es schwierig, eine genaue Aussage zu treffen, ob ein Kontakt zu einem ribosomalen Protein, das weiter vom Tunnelausgang entfernt liegt, möglich ist. Außerdem sind nicht alle ribosomalen Proteine in der Kryo-EM Struktur der 60S Untereinheit von *S. cerevisiae* modelliert, weshalb auch nicht die genaue Lokalisation im Ribosom bekannt ist. Dasselbe gilt auch für die Kristallstrukturen der 50S Untereinheiten aus *H. marismortui* und *E. coli*. Für viele der ribosomalen Proteine ist auch nicht die ungefähre Position aus biochemischen Untersuchungen bekannt.

Für die *Cross-Link* Produkte  $\gamma\beta X42$  bzw.  $\gamma\alpha X43$  wäre aufgrund der Molekulargewichts-Verschiebung eine Verknüpfung zu rpL3 denkbar, welches in einem Abstand von ca. 20 Å zu rpL31 liegt. Ebenfalls ist es möglich, dass es sich bei einem der kleineren *Cross-Link* Produkte zu EGD2 ( $\alpha$ -NAC), um eine Verknüpfung zu rpL26 handelt, welches ebenfalls in direkter Umgebung des Tunnelausgangs liegt. Peptide, die aus der Aminosäuresequenz von rpL26 abgeleitet worden waren, hatten allerdings keine befriedigende Immunreaktion in Hühnern ergeben, weshalb diese Annahme nicht überprüft werden konnte.

Am interessantesten jedoch ist für folgende Arbeiten die Identifizierung der *Cross-Link* Produkte  $\gamma\beta X25$  bzw.  $\gamma\alpha X25$ . Bei diesem *Cross-Link* Produkt handelt es sich nicht um rpL25, da mit dem entsprechenden Antikörper in der Analyse keine korrespondierende Bande nachgewiesen wurde. Die Tatsache der identischen Molekulargewichts-Verschiebung bei beiden NAC-Untereinheiten, welche reproduzierbar dominant auftritt, impliziert eine starke Bindung zu sehr wahrscheinlich dem gleichen ribosomalen Protein. Des Weiteren deutet es darauf hin, dass die Verknüpfung möglicherweise aus dem Bereich der NAC-Domäne erfolgt, über den die NAC-Untereinheiten dimerisieren. In Anbetracht der beschriebenen Funktionen von NAC am Ribosom kann man davon ausgehen, dass auch die NAC-Domäne in direkter Umgebung des ribosomalen Tunnelausgangs mit dem Ribosom assoziiert ist. Daher sind für die Verknüpfungen  $\gamma\beta X25$  und  $\gamma\alpha X25$  die Hefe ribosomalen Proteine rpL17 und rpL19 sehr wahrscheinlich (Abbildung 51).

Für rpL19 spräche zum einen, dass es Homologe nur in Eukaryonten und Archaeobakterien gibt, ebenso wie bei rpL31. Dies würde darauf hindeuten, dass das Vorkommen von NAC, wie auch der Bindungsmechanismus, spezifisch für Organismen aus den beiden Domänen ist. Interessanterweise wurde ein Bereich von rpL19 (C1) als eine der Kontaktstellen des Translokons identifiziert (Beckmann *et al.*, 2001). Ebenso wie der zwischen rpL19 und rpL25 befindliche RNA-Loop (C2) sowohl als Kontaktstelle des Translokons als auch von SRP identifiziert wurde (Beckmann *et al.*, 2001; Halic *et al.*, 2004).



**Abbildung 51** Kryo-EM Struktur der ribosomalen 60S Untereinheit von *S. cerevisiae* (PDB ID: 1S11). Die ribosomalen Proteine, die den Tunnelausgang umgeben, sind farbig hervorgehoben. Des Weiteren sind einige der identifizierten Kontaktstellen des Translokons (C1, hellgrün; C2 und C3, rot) wie auch von SRP (C2 und C3, rot) farbig abgesetzt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC) angefertigt.

rpL17 hingegen gehört zu den ribosomalen Proteinen, die in allen Organismen konserviert sind. Die Bindung von NAC an rpL17 könnte damit eine Erklärung für die, wenn auch vergleichsweise sehr schwache, Assoziation von Hefe NAC an Ribosomen aus *E. coli* sein. Bemerkenswerterweise befindet sich auch hier ein RNA-Loop (C3), der ebenfalls als Kontaktstelle des Translokons wie auch von SRP identifiziert wurde (Beckmann *et al.*, 2001; Halic *et al.*, 2004).

Die Identifizierung der *Cross-Link* Produkte  $\gamma\beta X25$  und  $\gamma\alpha X25$  könnte damit, im Fall von rpL17 oder rpL19, eine Erklärung liefern, wie NAC die Bindung von nicht-translatierenden Ribosomen oder Ribosomen, die cytosolische Proteine translatieren, an das Translokation verhindert. Darüber hinaus würde die Konkurrenz von NAC mit SRP um dieselben Bindungsstellen am Ribosomen Erklärungsansätze liefern, wie NAC die SRP abhängige Translokation von Proteinen ins ER beeinflusst.

Wegen der Komplexität der NAC-Interaktion mit dem Ribosom wird wohl erst die Lösung der Struktur eines Kokristalls aus der großen ribosomalen Untereinheit und NAC, oder noch besser einer Kryo-EM Struktur aus translatierenden Ribosomen mit NAC endgültig Aufschluss über die Art der Wechselwirkung geben.