

5 Zusammenfassung

Die Proteinbiosynthese am Ribosom ist ein komplexer Prozess, der immer noch viele Fragen offen lässt. Besonders interessant sind hierbei die Fragen, wie die wachsende Polypeptidkette in ihren biologisch aktiven, gefalteten Zustand überführt wird und gleichzeitig an den korrekten Bestimmungsort im Cytosol oder in andere zelluläre Kompartimente gelangt.

Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC) ist ein in Eukaryonten hoch konservierter, heterodimerer Komplex. Er wurde als erster nicht-ribosomaler Faktor identifiziert, der mit der naszierenden Polypeptidkette am Ribosom interagiert und in der Lage ist, sie gegenüber dem cytosolischen Milieu abzusichern. Darüber hinaus wurde für NAC auch eine regulatorische Funktion im Zusammenhang mit der Proteintranslokation postuliert, bei der NAC neben SRP als weiterer cytosolischer Faktor für die korrekte Zielsteuerung von Proteinen zum ER erforderlich ist. Wegen des Fehlens jeglicher Homologien zu anderen Proteinen ist die genaue Funktion von NAC als Ribosomen-assoziiertes Faktor trotz intensiver Studien noch wenig verstanden. Der letale Phänotyp von NAC-Mutationen in höheren Eukaryonten verdeutlicht allerdings die essentielle Bedeutung von NAC für die Funktion der eukaryontischen Zelle.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsstelle von NAC am Ribosom identifiziert und näher charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass NAC über mehrere ribosomale Bindungspartner in direkter Umgebung des Tunnelausgangs mit dem Ribosom assoziiert. Am N-Terminus von β -NAC wurde ein hoch konserviertes Sequenzmotiv identifiziert, welches für die Stabilität der Assoziation mit dem Ribosom erforderlich ist und laut Strukturvorhersage eine α -helikale Struktur ausbildet. Über diese N-terminale Helix assoziiert β -NAC mit dem ribosomalen Protein L31 (rpL31e). Auf der Grundlage von Mutationsstudien und unter Zuhilfenahme von Ribosomenstrukturdaten wurden zwei Modelle für den Bindungsmechanismus von β -NAC an rpL31 entwickelt. Interessanterweise wurde rpL31, welches ebenso wie NAC nur in Eukaryonten und Archaeobakterien vorkommt, gerade auch als Kontaktstelle des SRP-Rezeptors identifiziert. Die Ergebnisse implizieren außerdem, dass ein weiterer enger Kontakt zum Ribosom über den Bereich der strukturierten NAC-Domäne erfolgt. Bei dem ribosomalen Bindungspartner

handelt es sich hierbei sehr wahrscheinlich um rpL17 (rpL22p) oder rpL19 (rpL19e). Bemerkenswerterweise wurden auch diese beiden Proteine im Zusammenhang mit der SRP-abhängigen Proteintranslokation als Kontaktstellen des Translokons bzw. von SRP identifiziert. Die Lokalisation von NAC am ribosomalen Tunnelausgang, wie auch die mögliche Konkurrenz mit SRP bzw. dem SRP-Rezeptor um dieselben Bindungsstellen am Ribosom, liefern erste Erklärungsansätze für die regulatorische Funktion von NAC bei der Translokation von Proteinen. Abschließend werden die erzielten Ergebnisse im Kontext mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen kritisch diskutiert.

6 Summary

The biosynthesis of proteins on the ribosome is a complex process, which still leaves a number of questions unanswered despite extensive studies. Two interesting aspects are the questions how the nascent polypeptide chain is properly folded into its well-defined conformation to fulfil its biological function and how it is, at the same time, targeted to its correct destination in the cytosol or other cellular compartments.

Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC) is highly conserved in archaea and eukaryotes from yeast to humans. NAC was identified as the first non-ribosomal factor that contacts the nascent polypeptide chain emerging from the ribosome and protects it from inappropriate early interactions with cytosolic factors. NAC was also shown to play a role in regulation of cotranslational protein translocation. Since NAC shows no homology to other proteins its exact function as a ribosome-associated factor is still poorly understood despite intensive studies. However, the importance of the *in vivo* function of NAC is emphasized by early embryonically lethal phenotypes of NAC mutants in higher eukaryotes.

In the presented study the pivotal binding site of NAC on the eukaryotic ribosome was identified and characterized. The study shows that NAC associates with the ribosome via multiple interaction sites in the direct vicinity of the exit tunnel. A highly conserved sequence motif at the N-terminus of β -NAC, was identified which is predicted to form an α -helical structure and is necessary for the stability of NACs association with the ribosome. β -NAC binds via this N-terminal helix to the ribosomal protein rpL31 (rpL31e). Based on further studies two models for the binding-mechanism underlying β -NACs interaction with rpL31 are developed. Interestingly, rpL31, which is present only in eukaryotes and archaeobacteria (just like NAC), was identified just very recently as the binding site of the SRP-receptor. The presented data also imply that an additional close contact to the ribosome is made by the structured NAC-domain. The involved ribosomal binding partners are most probably rpL17 (rpL22p) or rpL19 (rpL19e). Remarkably these two proteins were also identified, in the context of the SRP dependent protein translocation as connection sites of the translocon and SRP respectively. The identification of the NAC binding site at

the ribosomal tunnel exit, as well as the possible competition with SRP-receptor for the same binding site on the ribosome , offer first explanations for the regulatory function of NAC during cotranslational protein translocation. Finally, a critical discussion of our results in comparison with data obtained by other groups is presented.