

1 Einleitung

1.1 Proteinsynthese in der prokaryontischen und eukaryontischen Zelle

Einer der grundlegendsten Prozesse in jeder Zelle ist die Neusynthese von Proteinen. Nach dem zentralen Dogma der Biologie wird die Übersetzung der genetischen Information von der Ebene der Ribonukleinsäuren auf die Ebene der Proteine vom Ribosom übernommen. Das Ribosom fungiert dabei als universeller Übersetzer und bewältigt diesen komplexen Prozess der Translation mit einer erstaunlichen Genauigkeit von etwa einem Fehler auf 3000 kodierte Aminosäuren (für detaillierte Beschreibung des Ribosoms und des Translationsprozesses siehe Wilson und Nierhaus, 2003).

In der bakteriellen Zelle finden sich etwa 20.000 Ribosomen und in höheren Eukaryonten können, in Abhängigkeit vom speziellen Gewebetyp, bis zu einigen Millionen Ribosomen vorkommen. Die Ribosomen arbeiten in Prokaryonten mit einer Expressionsgeschwindigkeit von 15-20 Aminosäuren pro Sekunde und in Eukaryonten von 5-7 Aminosäuren pro Sekunde (Bukau et al., 2000; Yewdell, 2001). Ein durchschnittliches Protein von 300 Aminosäuren wird damit in Prokaryonten in 15 – 20 Sekunden exprimiert. In Eukaryonten wird etwa eine Minute benötigt. Wie in Tabelle 1 für das Beispiel von humanen HeLa Zellen dargestellt, bedeutet das eine Synthese von $3 \cdot 10^6$ Proteinen in der Minute.

Tabelle 1 Proteinumsatz in humanen HeLa Zellen nach Yewdell, 2001. HSC70 und TRiC sind zwei Hauptkomponenten des Chaperon-Netzwerks der eukaryontischen Zelle (siehe Abbildung 1).

	Anzahl pro Zelle	Umsatz pro Minute
Proteine	$2 \cdot 10^9$	
Ribosomen	10^7	$3 \cdot 10^6$ Proteine synthetisiert
HSC70	10^7	$6 \cdot 10^5$ Proteine gefaltet
TRiC	$2 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^5$ Proteine gefaltet

Die Darstellung des Proteinumsatzes für eukaryontische bzw. prokaryontische Zellen hebt die Bedeutung des universellen Prozesses der Translation hervor, zeigt aber ebenso, dass die synthetisierte Polypeptidkette in eine dicht gepackte Umgebung entlassen wird. Es stellt sich daher die Frage, wie die Polypeptidkette in diesem dichten Medium in ein funktionelles Protein faltet, aber genauso, wie gleichzeitig dazu andere Prozesse direkt bei Entlassen der Polypeptidkette eingeleitet und koordiniert werden können. Um dieser komplexen Problematik Rechnung zu tragen, hat die Zelle ein differenziertes Netzwerk von Chaperonen und Ribosomen-assoziierten Faktoren entwickelt, das die Faltung der unterschiedlichen Proteine unterstützt, sobald die naszierende Polypeptidkette den ribosomalen Tunnel verlässt.

Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die Ribosomen-assoziierten Faktoren und Faltungshelfer in Prokaryonten und Eukaryonten. Im Allgemeinen verhindern die an der Kontrolle der Proteinfaltung beteiligten Faltungshelfer (Chaperone) eine unspezifische Aggregation der naszierenden Polypeptidkette durch vorübergehende Assoziation mit hydrophoben Sequenzbereichen und beeinflussen damit das Gleichgewicht zwischen Faltungsintermediaten. Alle Chaperone zeichnen sich durch die kurzlebige stöchiometrische Assoziation mit Faltungsintermediaten aus (Buchner, 1996; Ellis und Hartl, 1999). Die Mehrzahl der Chaperone sind konservierte Mitglieder der Hitze Schock Protein (Hsp) Familien Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, wobei die Zahl hinter der Bezeichnung für das mittlere typische Molekulargewicht der Proteine einer Familie steht. Die an der Kontrolle der Proteinfaltung im Cytosol beteiligten Faktoren können in zwei Untergruppen entsprechend ihrer Lokalisation eingeteilt werden. Die erste Gruppe setzt sich aus den löslichen cytosolischen Chaperonen zusammen, die post- bzw. ko-translational mit der Polypeptidkette interagieren. Die zweite Gruppe von Faktoren ist direkt mit dem Ribosom assoziiert und wechselwirkt mit der naszierenden Polypeptidkette, sobald sie den ribosomalen Tunnel verlässt und bevor ein Chaperon der ersten Gruppe die wachsende Polypeptidkette kontaktiert. Die hauptsächliche gemeinsame Eigenschaft der Faktoren dieser Gruppe ist ihre Assoziation mit dem Ribosom am Ausgang des ribosomalen Tunnels und ihre Wechselwirkung mit der naszierenden Polypeptidkette. Darüber hinaus scheint das Repertoire an Ribosomen-assoziierten Faktoren in Prokaryonten und Eukaryonten sehr unterschiedlich zu sein (für eine weitergehende Beschreibung der unterschiedlichen Ribosomen-assoziierten Faktoren siehe Abschnitt 1.3 und Frydman, 2001; Young et al., 2004).

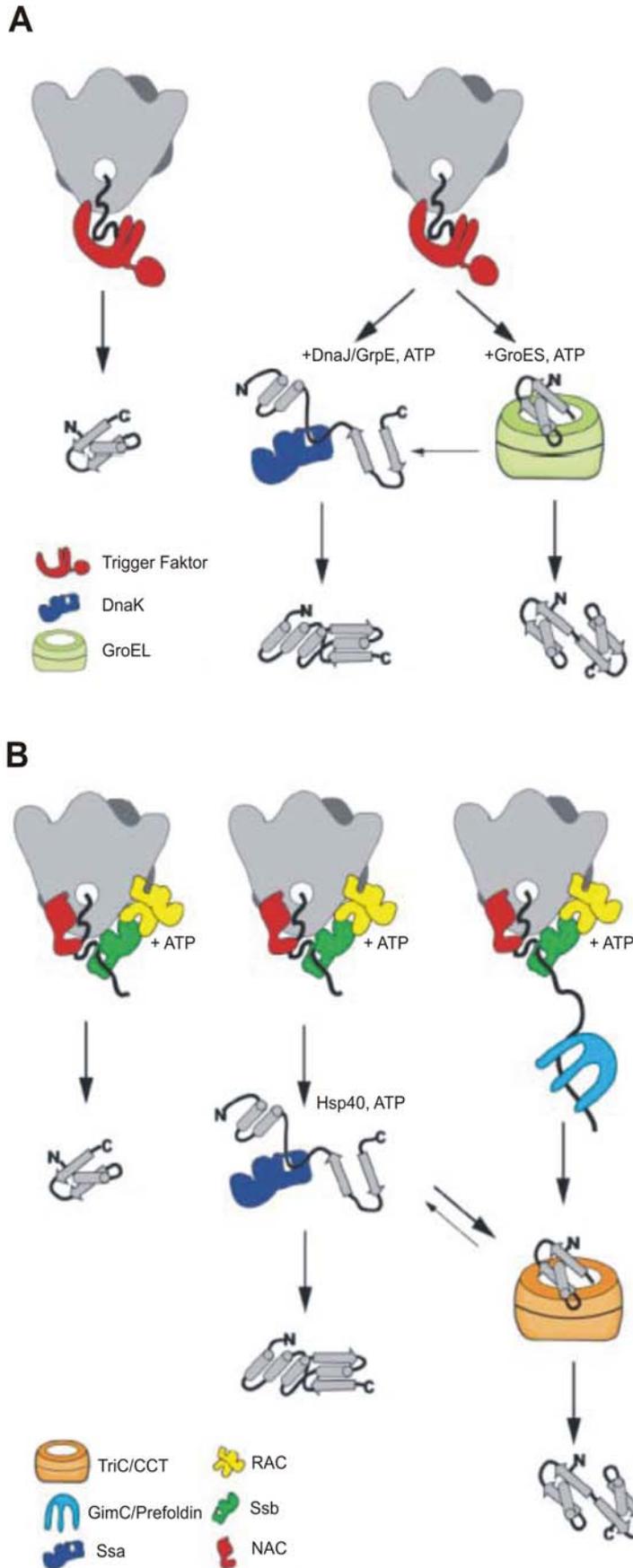


Abbildung 1

Modell des Chaperon Netzwerks und der Faltungswege in Pro- und Eukaryonten.

A Schematische Darstellung der Ribosomen-assoziierten und der cytosolischen Chaperone aus *E. coli*. In Prokaryonten ist der einzige Ribosomen-assoziierte Faltungshelfer der Trigger Faktor (TF). Der Trigger Faktor bindet die wachsende Polypeptidkette direkt am Ribosom, und ein Großteil der Proteine faltet sich nur mit Hilfe des TF. Ein kleiner Teil der prokaryontischen Proteine (~20%) benötigt zur korrekten Faltung die Hilfe des ATP-abhängigen Hsp70/40 Systems DnaK/DnaJ oder das Hsp60/10 – GroEL/GroES System

B Illustration der Situation in Hefe. Das Netzwerk an Ribosomen-assoziierten und cytosolischen Faktoren ist in Eukaryonten weitaus komplexer als in Prokaryonten. Zwei Systeme von Ribosomen-assoziierten Faktoren wechselwirken mit der wachsenden Polypeptidkette am Ribosom: Der Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC) und der RAC/Ssb Komplex. Der RAC/Ssb Komplex stellt ein Ribosomen-assoziiertes spezialisiertes Hsp70/40 System dar, das in ATP- Abhängigkeit die Faltung direkt am Ribosom unterstützt. NAC ist wahrscheinlich der erste Faktor, der die wachsende Polypeptidkette kontaktiert, er besitzt aber im Gegensatz zu allen anderen Faktoren keine Chaperon-Aktivität, und seine genaue Funktion ist bisher unklar. Ähnlich wie das prokaryontische System besitzen Eukaryonten cytosolische Hsp70 (Ssa) und Hsp60 (TriC/CCT) Komplexe, die die weitere Faltung kontrollieren (Abbildung adaptiert von Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Wegrzyn und Deuerling, 2005).

1.2 Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC)

1.2.1 NAC - heterodimerer Komplex am Ribosom

Das heterodimere Ribosomen-assoziierte NAC wurde ursprünglich mit einer Photo-crosslinking Technik entdeckt, bei der ein photoaktivierbares Lysinanalogen während der *in vitro* Translation in eine wachsende Polypeptidkette, die durch radioaktives Methionin markiert ist, eingebaut wird (Gorlich et al., 1991; Wiedmann et al., 1994). Durch Verwendung einer mRNA, die kein Stopkodon enthält, verbleibt die Polypeptidkette als Peptidyl-tRNA am Ribosom gebunden, und die Position des Photo-crosslinkers wird durch die Lysinkodons in der mRNA bestimmt. Durch Belichten der Probe entsteht eine kovalente Bindung zu benachbarten Molekülen, die dann über die Radioaktivität der Polypeptidkette nachgewiesen werden können. NAC wurde mit Hilfe dieser Technik als Nachweis erstmals aus Rinderhirn gereinigt und charakterisiert und entspricht einem heterodimeren Komplex aus der α - und β -NAC Untereinheit (Wiedmann et al., 1994).

Nach der Identifikation von α - und β -NAC stellte sich heraus, dass die β Untereinheit des heterodimeren NAC schon vorher in HeLa Zellen als Faktor, der einen Komplex mit RNA Polymerase II bildet, beschrieben und als BTF3 (Basic Transcription Factor 3) bezeichnet wurde. Darauf aufbauend wurde vorgeschlagen, dass BTF3 ein essentieller Faktor für die Initiation der RNA Polymerase II abhängigen Transkription ist (Moncollin et al., 1986; Zheng et al., 1990; Zheng et al., 1987). Später wurde entdeckt, dass das Gen für BTF3 für zwei *Splicing* Varianten kodiert, BTF3a (β_2 -NAC) und das am N-Terminus um 44 Aminosäuren verkürzte BTF3b (β_1 -NAC) (Kanno et al., 1992; Zheng et al., 1990). Eine folgende Studie konnte allerdings zeigen, dass BTF3 nicht für die Initiation der Transkription notwendig ist, und eine Funktion von NAC als Transkriptions-Aktivator gilt als fraglich (Moncollin et al., 1992). Das NAC Homolog aus Hefe wurde bei der Suche nach stabilisierenden Faktoren eines Gal4p – DNA Komplexes entdeckt. Die identifizierten Untereinheiten des stabilisierenden Faktors wurden Egd1p und Egd2p (Enhancer of Gal4 DNA binding) genannt (Parthun et al., 1992; Shi et al., 1995). In einem späteren Versuch wurde ein weiteres β -NAC Homolog in Hefe gefunden, Btt1p (Basic Transcription Faktor Three) (Hu und Ronne, 1994). Für Egd1p und Btt1p konnte keine signifikante Funktion in der Regulation der Transkription festgestellt werden, interessanterweise bewirkte aber die Deletion von

beiden β -NAC Homologen in Hefe eine signifikante Änderung der Expression einer Reihe von konstitutiv regulierten Genen (Hu und Ronne, 1994). Die Ursachen für diese Ergebnisse sind bis jetzt nicht genau verstanden. Eine mögliche Erklärung liefern aber die folgenden Beobachtungen (Reimann et al., 1999): Beide β -NAC Homologe aus Hefe (Egd1p bzw. Btt1p) bilden *in vivo* einen Komplex mit Egd2p (α -NAC). Zellen mit einer Deletion der beiden β -NAC Gene zeigen einen Wachstumsdefekt bei 37°C. Bei Deletion auch des Egd2p Gens zeigen die Zellen allerdings keinerlei Temperatursensitivität mehr. Diese Tatsache deutet eher auf eine regulatorische Funktion von α -NAC alleine bei Verlust oder Abwesenheit von β -NAC hin.

In späteren Studien konnte allerdings nachgewiesen werden, dass in der eukaryontischen Zelle der Hauptteil von α - und β -NAC als cytosolischer heterodimerer Komplex vorliegt und mit dem Ribosom assoziiert ist (Beatrix et al., 2000; Gautschi et al., 2001; Reimann et al., 1999)

Tabelle 2 Übersicht über die Nomenklatur der beiden Untereinheiten des eukaryontischen NAC. Cytosolisches NAC kommt hauptsächlich als heterodimerer Komplex aus der α - und β_1 - Untereinheit vor. Die Nomenklatur entspricht der ursprünglichen Identifizierung: Egd1p, Egd2p und Btt1p in Hefe bzw. BTF3a und b in Säugern. Sk-NAC ist eine Muskel spezifische *Splicing* Variante von α -NAC und wurde erstmals von Yotov und St-Arnaud, 1996a; Yotov und St-Arnaud, 1996b beschrieben. Der Ribosomen-assoziierte heterodimere Komplex aus α - und β_1 -NAC wird von hieran mit α - bzw. β -NAC bezeichnet.

	<i>S. cerevisiae</i>	Säugetiere
		α-NAC
α -NAC	Egd2p (Enhancer of Gal4 DNA binding)	α -NAC sk-NAC (Splicing Variante von α -NAC)
		β-NAC
β_1 -NAC	Egd1p (Enhancer of Gal4 DNA binding)	BTF3b (Basic Transcription Factor 3b)
β_2 -NAC		BTF3a (Basic Transcription Factor 3a)
β_3 -NAC	Btt1p (Btf Three)	-

Der identifizierte Ribosomen-assoziierte Komplex ist ein 41,1 kDa Heterodimer, bestehend aus der 23,4 kDa großen α Untereinheit mit 215 Aminosäuren und der 17,7 kDa großen β Untereinheit mit 162 Aminosäuren und entspricht einem Komplex aus dem in Tabelle 2 beschriebenen α -NAC und β_1 -NAC (von hieran wird für β_1 -NAC die Abkürzung β -NAC verwendet). Eine Sequenzanalyse zeigt, dass beide NAC Untereinheiten in Eukaryonten von Säugern über Pflanzen bis hin zu Einzellern

phylogenetisch hoch konserviert sind. Auf Aminosäuresequenzebene zeigen sie aber keinerlei Homologie zu anderen Proteinen. Der Vergleich der Sequenzen von eukaryontischen NAC Homologen definiert die ‚NAC-Domäne‘ als den am höchsten konservierten Bereich der NAC Gene (Conserved Domains Database, Marchler-Bauer et al., 2002). Abbildung 2 zeigt einen Sequenzvergleich von α - bzw. β -NAC und die entsprechende konservierte Domänenstruktur.

A

SP_Q13765_HUMAN

```

1      10      20      30      40      50      60
SP_Q13765_HUMAN M...PGEATETVPATEQELPQPQAE.TGSGTESDSDDESVPPELE...EQDSTQATTQQAQLAAAAAIDEEP
SP_Q5E9A1_BOVIN M...PGEATDTVPATEQELPQPQAE.TGSGTESDSDDESVPPELE...EQDSTQATTQQAQLAAAAAIDEEP
SP_Q60817_MOUSE M...PGEATETVPATEQELPQPQAE.TGSGTESDSDDESVPPELE...EQDSTQATTQQAQLAAAAAIDEEP
SP_Q68F90_XENTR M...PGEATETVPAAEQELHQQAE.TGSGTESDSDSPPPELE...Q.DSTQTTTQQAQLAAAAAIDEEP
SP_Q8JIU7_BRARE M...PGEATETVPVTEQEMQPQAE.TGSGTESDSDSVPDLE...EGDSAQTQQAQLAAAAAIDEEP
SP_Q94518_DROME MPELTEIKSEAAPSTSAEAKPEDVRVEDDGDSDSDGGMPGLE...E.AVAATTLQLGGGATGLPID..L
SP_Q86S66_CAEEL MT.....GSTETRQKEVKEPQVD.V.....SDDSDNEAV...EQ...ELTEEQRRAEAAGLDGDI
SP_Q9LHG9_ARATH M...TTEEK.....EILAAK.LEEQKID.LDKPEVEDDDDDNEDDDSDDDDKDDDEADG..LDGEA
SP_Q9M612_PINTA M...PSVSE...LTKEEETLAAK.LEQLEHSHSDEPILEDD...EDDDDEEDDDNEDDAQG..EQG.G
TE_Q4WD81_ASPPU M...ADPRVEELP..DEEVPKANVEDAGSD.....SES.....EAGEESSIPAGAAV...
TE_Q4D9L7_TRYCR .....MSTPQVQNPVVE.....DDEVPTLE...AAEV.....
SP_P38879_YEAST MSAIPENANV.....

```

SP_Q13765_HUMAN

```

70      80      90      100      110      120      130
SP_Q13765_HUMAN VSKAKQSRSEKARKKAMS KLGLRQVTGVTRVTRIRKSKNILFVITKPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLSQ
SP_Q5E9A1_BOVIN VSKAKQSRSEKARKKAMS KLGLRQVTGVTRVTRIRKSKNILFVITKPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLSQ
SP_Q60817_MOUSE VSKAKQSRSEKARKKAMS KLGLRQVTGVTRVTRIRKSKNILFVITKPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLSQ
SP_Q68F90_XENTR VSKAKQSRSEKARKKAMS KLGLRQVTGVTRVTRIRKSKNILFVITKPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLSQ
SP_Q8JIU7_BRARE VSKAKQSRSEKARKKAMS KLGLRQVTGVTRVTRIRKSKNILFVITKPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLSQ
SP_Q94518_DROME VSKAKQSRGSKARKKIMLKLGLRQVTGVTRVTRIRKSKNILFVINPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLSQ
SP_Q86S66_CAEEL DKQAKQSRSEKARKLFS KLGLRQVTGVSRVTRIRKSKNILFVINPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLTSQ
SP_Q9LHG9_ARATH GGKSKQSRSEKARKKAMS KLGLRQVTGVSRVTRIRKSKNILFVITKPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLSS
SP_Q9M612_PINTA EGKSKQSRSEKCRKAML KLGLRQVTGVSRVTRIRKSKNILFVINPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLSS
TE_Q4WD81_ASPPU ...TIHSRNEKARKKAI GKGLRQVTGVTRVTRIRKSKNILFVINPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLNS
TE_Q4D9L7_TRYCR ...PVAKQTKRYAKAMAKMGLKPEPNVVKVHTRIRKSKNILFVINPDVYKSPASDYYIVFGEAKIEDLNS
SP_P38879_YEAST ...TVLNLKNEKARELIG KLGLRQVTGIIRVTRFRKDNQIYAIKPEVFRSAGGN.YVVFGEAKVDNFTQ

```

SP_Q13765_HUMAN

```

140      150      160      170
SP_Q13765_HUMAN QAQLAAAEKFKV..Q....GEAVSNIQEN.....T...QTP.TVQEESEEEE...EVDDET
SP_Q5E9A1_BOVIN QAQLAAAEKFKV..Q....GEAVSNIQEN.....T...QTP.TVQEESEEEE...EVDDET
SP_Q60817_MOUSE QAQLAAAEKFKV..Q....GEAVSNIQEN.....T...QTP.TVQEESEEEE...EVDDET
SP_Q68F90_XENTR QAQLAAAEKFKV..Q....GEAVSNIQEN.....T...QTP.TVQEESEEEE...EVDDET
SP_Q8JIU7_BRARE QAQLAAAEKFKV..Q....GEAVSNIQEN.....T...QTP.TVQEESEEEE...EVDDET
SP_Q94518_DROME QAQVAAAEKFKV..PEA...AGAADSVGAT.....T...SVA.PIAAE.DEE...DVDDT
SP_Q86S66_CAEEL HAQMSAIENLKP..T...REA.....P...QLK.TVVEEDENEDVEFKEDST
SP_Q9LHG9_ARATH QIQSQAAEQFKA..P...D...LSNVISK.....G...ESS.SAAVVDDE...EVDDEE
SP_Q9M612_PINTA QLQTQAAEQFKA..P...N...LSHVTMK.....P...ESS.TAAQ.EDED...EVDDET
TE_Q4WD81_ASPPU QAQASAAQQLAA..AEA...AAGEHAGH.DHDHDHG...K GKAPET.EAK.KEEEDDGE...EVDDET
TE_Q4D9L7_TRYCR EAQEAAAARAVS.GVVPEVESRVEEVPPTAE.....TP...ETP.VPAEKTDDA...DAEDG
SP_P38879_YEAST KLAAAQQQ.AQA..S....GIMPSNEDVATKSPEDIQADMQAAA..EG.SVNAAA.EEDDEEG...EVDAG

```

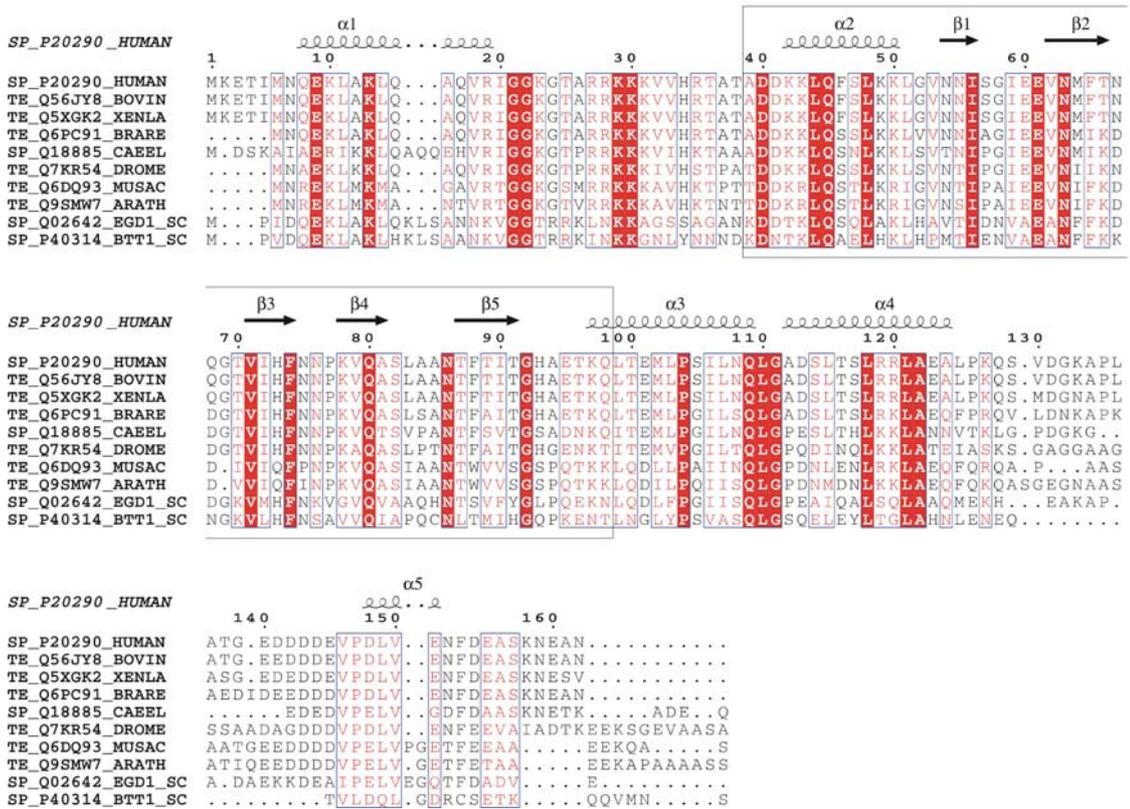
SP_Q13765_HUMAN

```

180      190      200      210
SP_Q13765_HUMAN G.VEVKDIELVMSQANVSRAKAVRALKKNNSNDIVNAIMELTM.
SP_Q5E9A1_BOVIN G.VEVKDIELVMSQANVSRAKAVRALKKNNSNDIVNAIMELTM.
SP_Q60817_MOUSE G.VEVKDIELVMSQANVSRAKAVRALKKNNSNDIVNAIMELTM.
SP_Q68F90_XENTR G.VEVKDIELVMSQANVSRAKAVRALKKNNSNDIVNAIMELTM.
SP_Q8JIU7_BRARE G.VEVKDIELVMSQANVSRAKAVRALKKNNSNDIVNAIMELTM.
SP_Q94518_DROME G.VDEKDIELVITQANTTRAKAKALKKNNNSNDIVNAIMELTML.
SP_Q86S66_CAEEL G.IEEKDIELVISOANTTRNKAIRALKKADNDIVNAIMSLTM.
SP_Q9LHG9_ARATH G.VEPKDIELVMTQAGVSRPNAVKALKKADGDIVGAIMELTT.
SP_Q9M612_PINTA G.VEPKDIELVMTQAGVSRPNAVKALKKADGDIVGAIMELTT.
TE_Q4WD81_ASPPU G.LEAKDIELVMAQANVSRAKAVKALRENDNDIVNSIMALSI.
TE_Q4D9L7_TRYCR G.ELEEREIKVVMQGNTRRAGAIRALKKNKGDIVNAILELTM.
SP_P38879_YEAST D.LNKDDIELVWQTNVSKNQAKALKKAHNGDLVNAIMSLSK.

```

B



C

αβ-NAC (*H. sapiens*)

α-NAC



β-NAC



Abbildung 2 Sequenzvergleich und Domänenstruktur der Untereinheiten von eukaryontischem NAC. **A** Sequenzvergleich von eukaryontischen α-NAC Homologen. Dargestellt sind eine Kurzbeschreibung der jeweiligen Organismen mit den vorangestellten Zugangsnummern der Datenbanken entsprechend Swissprot (SP_) bzw. TREMBL (TE_). **B** Sequenzvergleich von eukaryontischen β-NAC Homologen. Die Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm T-coffee (Notredame et al., 2000) berechnet und mit ESPript (Gouet et al., 1999) bearbeitet. 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 hoch konservierte NAC-Domäne und die UBA-Domäne sind mit einem Kasten umrahmt. **C** Schematische Illustration der konservierten Domänenstruktur von α- und β-NAC aus *H. sapiens*

Interessanterweise kommt diese einzigartige, hoch konservierte NAC-Domäne ausschließlich in NAC Proteinen und gleichermaßen in α - und β -NAC vor. Zusätzlich zu der konservierten NAC-Domäne weisen alle α -NAC Homologe eine konservierte C-terminale Domäne auf, die auf Sequenzniveau eine Homologie zu UBA-Domänen zeigt (Ubiquitin-Associated Domain). Abgesehen von dieser konservierten Domänenstruktur von α - bzw. β -NAC ist der N-Terminus von β -NAC auffallend hoch konserviert, während der N-Terminus von α -NAC die höchste Variation zeigt. Auffallend ist außerdem, dass es in Eubakterien kein NAC Homolog gibt, weder zu α - noch zu β -NAC.

1.2.2 Funktion des heterodimeren NAC am Ribosom

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wird NAC hauptsächlich als heterodimerer Komplex in Assoziation mit dem Ribosom gefunden. Die Mehrheit von α - und β -NAC bilden den heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC Komplex und monomere Untereinheiten sind nicht nachzuweisen (Beatrix et al., 2000; Reimann et al., 1999). Der heterodimere Komplex aus α - und β -NAC scheint in Hefe in etwa äquimolarem Verhältnis zu Ribosomen vorzuliegen, der heterodimere Komplex aus α - und β_3 -NAC kommt dagegen in 100-fach reduzierter Konzentration vor (Reimann et al., 1999). In Säugern variiert die NAC Konzentration je nach Gewebe, und das Verhältnis von heterodimerem $\alpha\beta$ -NAC zu Ribosomen wird auf 3:1 bis 10:1 geschätzt (Moller et al., 1998a; Raden und Gilmore, 1998; Wang et al., 1995). Damit scheint in Hefe der Großteil von NAC mit dem Ribosom assoziiert zu sein, während in vielzelligen Organismen wahrscheinlich eine höhere Konzentration von löslichem NAC, das nicht mit dem Ribosom assoziiert ist, im Cytosol vorhanden ist.

Verschiedene Studien konnten anhand von Quervernetzungsversuchen, ähnlich dem im letzten Abschnitt beschriebenen ursprünglichen Nachweis, zeigen, dass beide Untereinheiten des heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC zu kurzer naszierenden Polypeptidketten am Ribosom quervernetzt werden können (Beatrix et al., 2000; Raden and Gilmore, 1998; Reimann et al., 1999; Wang et al., 1995; Wiedmann et al., 1994). Die Ergebnisse der Quervernetzungsstudien lassen darauf schließen, dass $\alpha\beta$ -NAC mit geringer Sequenzspezifität naszierende Polypeptidketten in einer Entfernung von 17 – 100 Aminosäuren vom Peptidyl- Transferase Zentrum bindet. Das $\alpha\beta$ -NAC kann nach

diesen Versuchen mit sehr kurzen Ribosomen-gebundenen Polypeptidketten verknüpft werden und unterscheidet sich damit von den anderen Ribosomen-assoziierten Faktoren wie beispielweise TF oder Ssb, die erst mit längeren Polypeptidketten ab etwa 30 Aminosäuren verknüpft werden können (Hesterkamp et al., 1996; Pfund et al., 1998; Stoller et al., 1995). Die heute bekannten Kristallstrukturen von Ribosomen, die jedoch alle keine naszierende Polypeptidkette beinhalten, zeigen einen ribosomalen Ausgangstunnel, der eine Länge von 100 Å hat und durchschnittlich 15 Å breit ist. Der Tunnel fasst demnach etwa 30 – 50 Aminosäuren, je nachdem ob die Polypeptidkette im Tunnel in einer helikalen Konformation oder als ausgestreckter Strang vorliegt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass heterodimeres $\alpha\beta$ -NAC im Gegensatz zu den anderen bekannten Ribosomen-assoziierten Faktoren, mit der wachsenden Polypeptidkette noch im Tunnel interagieren kann.

Für die spezifische Bindung ans Ribosom benötigt heterodimeres $\alpha\beta$ -NAC die β Untereinheit. β -NAC alleine ist in der Lage, spezifisch ans Ribosom zu binden, während α -NAC keine Affinität zu Ribosomen zeigt (Beatrix et al., 2000). Die Deletion der 11 N-terminalen Aminosäuren von β -NAC aus Hefe führt zum Verlust der spezifischen Bindung ans Ribosom (Franke et al., 2001). Zwei erst kürzlich veröffentlichte Studien konnten Ergebnisse präsentieren, die für eine Assoziation von Hefe $\alpha\beta$ -NAC mit dem ribosomalen Protein L23 (bzw. L25 in Hefe) sprechen (Grallath et al., 2005; Wegrzyn und Deuerling, 2005). Die Ergebnisse zeigen, dass $\alpha\beta$ -NAC in unmittelbarer Umgebung zum ribosomalen Tunnelausgang positioniert ist, sie lassen aber keine Aussage darüber zu, welcher Teil von $\alpha\beta$ -NAC oder den Untereinheiten von NAC mit L23 assoziiert ist.

In Proteolyse-Versuchen konnte für das heterodimere $\alpha\beta$ -NAC gezeigt werden, dass es kurze Ribosomen-gebundene Polypeptidketten vor einem Angriff durch eine Protease schützt (Lauring et al., 1995c; Wang et al., 1995). Abgesehen von einer erst kürzlich veröffentlichten Studie von Grallath et al. konnte keine Chaperon-ähnliche Aktivität für NAC nachgewiesen werden, und die Affinität von NAC für ungefaltete Proteine ist in Abwesenheit des Ribosoms gering (Wiedmann et al., 1994). Im Gegensatz dazu konnten Grallath et al. erst kürzlich zeigen, dass NAC die Aggregation von Rhodanase bei einem mindestens 5-fachen molaren Überschuss von Hefe NAC verhindern kann. Es stellt sich die Frage, inwieweit NAC tatsächlich eine spezifische Chaperon-ähnliche Aktivität besitzt oder die Ergebniss eine Interaktion mit hydrophoben Oberflächen widerspiegelt.

In der ursprünglichen Veröffentlichung, in der $\alpha\beta$ -NAC als Ribosomen-assoziiertes Faktor identifiziert wurde, postulierten Wiedmann et al., dass $\alpha\beta$ -NAC neben SRP (Signal Recognition Particle) als zweiter cytosolischer Faktor für die korrekte Zielsteuerung der Proteine zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) notwendig ist (Lauring et al., 1995b; Wiedmann et al., 1994). Proteine, die nicht im Cytosol, sondern im ER gefaltet und weitergeleitet werden, tragen an ihrem N-Terminus eine kurze Erkennungssequenz, die sogenannte Signalsequenz. Der cytosolische Faktor SRP bindet spezifisch ans Ribosom und erkennt kotranslational diese N-terminalen Signalsequenzen direkt nach dem Verlassen des ribosomalen Tunnels. Nach der Bindung der Signalsequenz durch das SRP wird die Translation durch Interaktion der Alu-Domäne des SRP mit der Elongationsfaktor-Bindestelle am Ribosom angehalten und der Komplex durch die GTP-abhängige Interaktion von SRP mit dem SR (Signal Recognition Particle Receptor) an die ER Membran und das Translokon gekoppelt. Nach der Kopplung des SRP-RNC Komplexes (SRP - Ribosome Nascent-chain Complex) ans Translokon und der GTP Hydrolyse dissoziiert der SRP-SR Komplex, und die Polypeptidkette wird über den Ribosom – Translokon Komplex ins ER translatiert (für Übersichtsartikel zum SRP Mechanismus siehe Egea et al., 2005; Wild et al., 2004).

In frühen Experimenten wurde beobachtet, dass das Translokon nicht nur als Translokationspore fungiert, sondern ebenfalls mit hoher Affinität Ribosomen bindet (Gorlich et al., 1992; Kalies et al., 1994). Der Mechanismus der SRP kontrollierten Zielsteuerung von Proteinen lässt damit die Frage offen, inwieweit Ribosomen, die keine mRNA, tRNA und Polypeptidkette tragen, mit RNCs (Ribosome Nascent-chain Complex) um eine Bindung ans Translokon konkurrieren können und wie darüber hinaus verhindert wird, dass Proteine ohne Signalsequenz ins ER translatiert werden. In diesem Zusammenhang postulierte die Arbeitsgruppe um M. Wiedmann das Modell einer Membran-bindungs Stelle (M-site) am Ribosom, in dem $\alpha\beta$ -NAC als Faktor zur Verhinderung der Bindung an die ribosomale M-site fungiert. *In vitro* konnten sie zeigen, dass die Fehlanbindung von Signalsequenz-losen RNCs an das Translokon durch Zugabe von gereinigtem $\alpha\beta$ -NAC verhindert wurde (Lauring et al., 1995a; Lauring et al., 1995b; Moller et al., 1998b) (siehe Abbildung 3 für Details des M-site Modells). Der Mechanismus, wie $\alpha\beta$ -NAC die SRP kontrollierte Zielsteuerung von Proteinen und die Translokation ins ER beeinflusst, ist nicht bekannt, und bisher fehlen

in vivo Ergebnisse, die eine Rolle von $\alpha\beta$ -NAC in der Translokation bestätigen (Reimann et al., 1999; Wiedmann und Prehn, 1999).

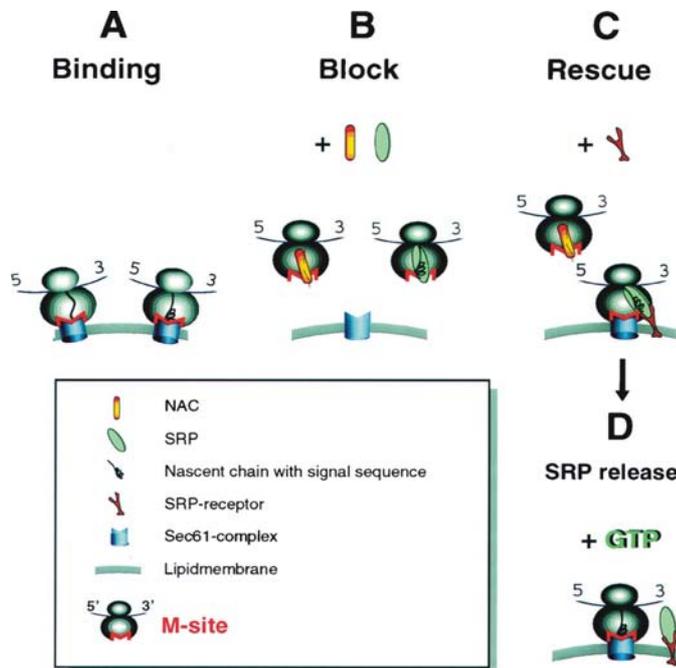


Abbildung 3 Modell zur Regulation der Bindung ans Translokation. Die Abbildung verdeutlicht die Ergebnisse von *in vitro* Versuchen, in denen gezeigt wurde, dass RNCs in Abwesenheit von NAC und SRP unabhängig von einer Signalsequenz mit geringer Effizienz ins ER translatiert werden (A), und dass sowohl NAC als auch SRP diese unspezifische Bindung verhindern können (B). Erst die GTP abhängige Kopplung von SRP-RNCs an den SR (SRP-Receptor) (C) führt zur spezifischen Translokation von Proteinen mit Signalsequenz (D). Abbildung adaptiert von Moller et al., 1998b.

Die genaue *in vivo* Funktion von $\alpha\beta$ -NAC als Ribosomen-assoziiertem Faktor bleibt rätselhaft. Mit hoher Wahrscheinlichkeit bindet $\alpha\beta$ -NAC naszierende Polypeptidketten und ist dadurch möglicherweise in der Lage, diese abzusichern und vor unspezifischer Aggregation zu schützen. Es ist eine attraktive Hypothese, dass, wie ursprünglich vorgeschlagen, das Ribosomen-assoziierte $\alpha\beta$ -NAC für die initiale Wechselwirkung mit der naszierenden Polypeptidkette und für die korrekte Übertragung der wachsenden Polypeptidkette an das differenzierte Chaperon - Netzwerk oder das Translokations-System mitverantwortlich ist (Neupert und Lill, 1994). Es gibt allerdings bis jetzt wenig Anhaltspunkte, die eine solche Funktion des

heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC am Ribosom bestätigen und die Formulierung eines Modell des Mechanismus ermöglichen.

1.2.3 Funktionen der individuellen NAC Untereinheiten

Die Wichtigkeit der Funktion von NAC in höheren Eukaryonten wird durch zwei Studien verdeutlicht, die für die Deletion bzw. Mutation des β -NAC Gens in Mäusen, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* einen embryonal letalen Phänotyp zeigten (Deng und Behringer, 1995; Markesich et al., 2000). In unabhängigen Studien wurde außerdem beobachtet, dass die intrazelluläre Konzentration der individuellen NAC Untereinheiten starke Veränderungen im Kontext einer Reihe von Krankheiten wie Alzheimer, Trisomie 21, AIDS und bösartigen Gehirntumoren zeigt (Kim et al., 2002; Kroes et al., 2000; Scheuring et al., 1998). Darüber hinaus identifizierten Bloss et al. β -NAC als einen Apoptose Inhibitor (Bloss et al., 2003). Der Verlust von β -NAC durch RNA Interferenz (RNAi) in *C. elegans* führte einerseits zum bekannten embryonal letalen Phänotyp, andererseits konnten die Autoren nachweisen, dass im Großteil der Zellen, die sich über die frühe Entwicklungsphase hinaus entwickelten, Apoptose ausgelöst wurde. Diese Beobachtung der Apoptose in weiter entwickelten Zellen konnte durch Eliminierung des *ced-4* Gens, ein wichtiges Gen im anerkannten Apoptose-Signalweg, unterdrückt werden. Bloss et al. postulierten daraufhin eine Funktion von β -NAC im Apoptose-Signalweg der Zelle. Diese beobachteten Phänotypen sprechen dafür, dass NAC oder die individuellen Untereinheiten eine vielfältigere Funktion erfüllen als die eines Chaperon-ähnlichen Faktors am Ribosom. Inwiefern diese Beobachtungen auf einen Verlust der Funktion der monomeren β Untereinheit, den Verlust der Funktion des heterodimeren Komplexes am Ribosom oder einen 'toxischen' Effekt von monomerem α -NAC zurückzuführen ist, ist allerdings unklar.

Erste Anhaltspunkte für eine Rolle von α -NAC in der Transkription wurden von der Arbeitsgruppe um R. St-Arnaud präsentiert (Moreau et al., 1998; Yotov et al., 1998; Yotov und St-Arnaud, 1996a; Yotov und St-Arnaud, 1996b). In *in vitro* Studien konnten Yotov et al. eine Interaktion von α -NAC mit dem Transkriptions-Aktivator c-Jun und dem TATA Box-Bindungs-Protein (TBP) feststellen und zeigen, dass α -NAC mit gewisser Sequenzspezifität an DNA bindet. Davon ausgehend wurde eine

Funktion von α -NAC als entwicklungsregulierter Transkriptions-Koaktivator postuliert. Diese Funktion von α -NAC gilt allerdings als fraglich. In einer anderen Studie wurde beispielweise nachgewiesen, dass NAC nicht sequenzspezifisch an DNA bindet, sondern sowohl α -NAC als auch der heterodimere Komplex an DNA, aber auch an tRNA und rRNA nicht sequenzspezifisch bindet (Beatrix et al., 2000). Die unterschiedlichen Resultate zur Funktion von α -NAC sind wahrscheinlich auf die Unterschiede in der experimentellen Vorgehensweise zurückzuführen. Die Gruppe um St-Arnaud hat die Eigenschaften von α -NAC in Abwesenheit von β -NAC oder nach Überexpression von α -NAC studiert, während α - und β -NAC hauptsächlich im Cytosol in äquimolarem Verhältnis vorzukommen scheinen und einen Komplex bilden. Es ist nicht auszuschließen, dass NAC in höheren Eukaryonten eine vielfältige Funktion erfüllt, einerseits als heterodimerer Komplex am Ribosom und andererseits als Transkriptions-Koaktivator im Nukleus nach dem Verlust von β -NAC und damit der Lokalisation am Ribosom. Dafür spricht, dass α -NAC *in vivo* als Transkriptions-Koaktivator aktiv ist, aber diese Aktivität bei Koexpression von β -NAC verliert (Yotov et al., 1998).

Die Funktion von NAC und der individuellen Untereinheiten von NAC *in vivo* bleibt rätselhaft und es stellt sich die Frage, ob NAC tatsächlich eine doppelte Funktion als Chaperon-ähnlicher Faktor am Ribosom und als Transkriptions-Koaktivator im Nukleus erfüllen kann. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur die anfänglichen, widersprüchlichen Ergebnisse zu einer möglichen Funktion von NAC oder der individuellen Untereinheiten von NAC in der Transkription veröffentlicht waren und der heterodimere Ribosomen-assoziierte Komplex der in der Zelle überwiegend vorkommende Komplex ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich die Funktion des heterodimeren Komplexes am Ribosom untersucht.

In den letzten Jahren ist das Feld der Ribosomen-assoziierten Faktoren und Chaperone intensiv untersucht worden und eine Vielzahl von Studien über andere Ribosomen-assoziierte Faktoren, sowohl aus Prokaryonten als auch Eukaryonten, ist in der Zeit der vorliegenden Arbeit veröffentlicht worden. Im Folgenden soll eine Übersicht über die neueren Erkenntnisse zu den Faktoren, die wie $\alpha\beta$ -NAC in direkter Umgebung der Polypeptidkette ans Ribosom binden, gegeben werden.

1.3 Schicksal der naszierenden Polypeptidkette in der prokaryontischen und eukaryontischen Zelle - kotranslationale Ereignisse am Ribosom

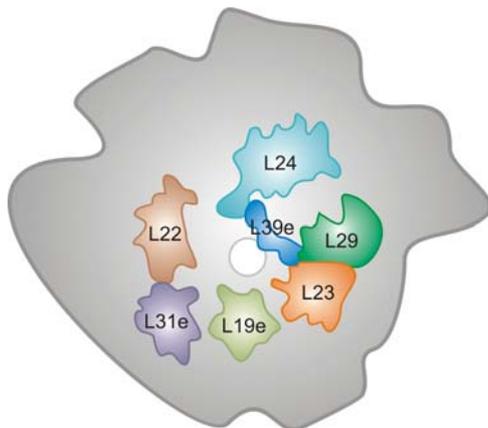
1.3.1 Kotranslationale Ereignisse am Ribosom und der ribosomale Tunnelausgang

Direkt nach der Synthese der Polypeptidkette im Ribosom müssen hauptsächlich zwei Probleme gelöst werden. Einmal muss sichergestellt werden, dass eine Vielfalt von sehr unterschiedlichen Proteinen in die richtige, funktionelle Tertiärstruktur faltet. Andererseits muss jedes Protein einem bestimmten Zielort zugeordnet und eventuell vor der Faltung und weiteren Translation zum entsprechenden Organell bzw. Membran transportiert werden. Abgesehen von diesen essentiellen Prozessen müssen noch weitere Faktoren Zugang zu der naszierenden Polypeptidkette haben. Dazu gehören einige modifizierende Enzyme, die für die N-Acetylierung (NatA) (Gautschi et al., 2003) oder Entfernung (MetAP) (Addlagatta et al., 2005) des N-terminalen Methionins zuständig sind und wahrscheinlich kotranslational agieren. Diese Vielfalt macht deutlich, dass es ein komplexes Netzwerk von Faktoren geben muss, welches auf die vielfältigen Bedürfnisse der verschiedenen Proteinsubstrate eingehen kann und deren in sich kodiertes Schicksal kontrolliert, sobald die naszierende Polypeptidkette das Ribosom verlässt. Damit wird außerdem deutlich, dass die meisten der Faktoren in geringer Entfernung zur Austrittsstelle der wachsenden Polypeptidkette binden müssen und stellt die Frage nach möglichen konservierten Bindungsstellen am Ribosom.

Die mittlerweile zur Verfügung stehenden Kristall- und Cryo-EM Strukturen der ribosomalen Untereinheiten bzw. des gesamten Ribosoms aus *Haloarcula marismortui*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermus thermophilus*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, trotz der Unterschiede in Größe und Zusammensetzung, eine große strukturelle Ähnlichkeit der Ribosomen aus Archaea, Prokaryonten und Eukaryonten (Ban et al., 2000; Harms et al., 2001; Schlutzen et al., 2000; Schuwirth et al., 2005; Spahn et al., 2001; Wimberly et al., 2000). Die strukturellen Unterschiede zwischen den Ribosomen der verschiedenen Klassen finden

sich hauptsächlich in den zum Cytosol exponierten Oberflächen der Untereinheiten und nicht an der Interaktionsfläche der beiden ribosomalen Untereinheiten.

Der Ausgang des ribosomalen Tunnels ist umgeben von ribosomaler RNA und unterschiedlichen ribosomalen Proteinen. Vier der Proteine, L22, L24, L23 und L29 sind über alle Organismen konserviert, während die Proteine L19e, L31e und L39e nur in Eukaryonten und Archaea vorkommen (siehe Abbildung 4). Die Oberfläche um den Ausgang des ribosomalen Tunnels, an dem die naszierende Polypeptidkette das Innere des Ribosoms verlässt und zugänglich wird, ist essentiell für die korrekte Positionierung der Ribosomen-assoziierten Faktoren, die die wachsende Polypeptidkette kontaktieren. Der Vergleich dieser essentiellen ribosomalen Oberfläche zwischen Prokaryonten, Eukaryonten und Archaea zeigt, dass es sowohl hoch konservierte, als auch variable Bereiche gibt und bietet Anhaltspunkte für mögliche Strategien von Ribosomen-assoziierten Faktoren zur Wechselwirkung mit dem Ribosom und eine mögliche Konservierung dieser Strategien.



Ribosomale Proteinfamilie	Archaea		Eukaryonten		Prokaryonten
	<i>H. marismortui</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>E. coli</i>	
L22	rpL22	rpL17	rpL17	rpL22	
L23	rpL23	rpL25	rpL23a	rpL23	
L24	rpL24	rpL26	rpL26	rpL24	
L29	rpL29	rpL35	rpL35	rpL29	
L19e	rpL19	rpL19	rpL19	-	
L31e	rpL31	rpL31	rpL31	-	
L39e	rpL39	rpL39	rpL39	-	

Abbildung 4 Schematische Illustration der großen ribosomalen Untereinheit mit Blick auf den ribosomalen Ausgangstunnel und die den Ausgangstunnel umgebenden ribosomalen Proteine. Die Konservierung der ribosomalen Proteine innerhalb der Prokaryonten, Eukaryonten bzw. Archaea ist entsprechend der nebenstehenden Tabelle gekennzeichnet (Darstellung adaptiert aus Wegrzyn und Deuerling, 2005).

1.3.2 Proteinfaltung und Faltungshelfer in Prokaryonten und Eukaryonten

Die Theorie der Proteinfaltung geht davon aus, dass die Tertiärstruktur eines Proteins vollständig durch die Primärstruktur der Polypeptidkette kodiert wird und diese selbstständig in ihre 3-dimensionale Struktur faltet (Dobson und Karplus, 1999). Die Synthese der Polypeptidkette am Ribosom findet vom N- zum C-Terminus statt, und ein Teil der Polypeptidkette wird somit schon in das Cytosol entlassen, während der C-terminale Teil noch synthetisiert wird. Es ist klar, dass die Polypeptidkette ihre ‚endgültige‘ Tertiärstruktur erst nach Ende der Synthese und Verlassen des Ribosoms erreichen kann. Allgemein stellt sich damit die Frage, an welchem Punkt der Translation die Faltung einer naszierenden Polypeptidkette beginnt und inwieweit die Faltung kotranslational erfolgen kann und ob es Unterschiede in den Faltungsstrategien gibt.

Ein konserviertes Merkmal der Ribosomen der unterschiedlichen Organismen ist der ribosomale Ausgangstunnel. Der Ausgangstunnel beginnt am Peptidyltransferase Zentrum an der Schnittstelle zwischen kleiner und großer ribosomaler Untereinheit und endet an der cytoplasmatischen Seite der großen Untereinheit. Der etwa 100 Å lange und durchschnittlich 15 Å breite Tunnel kann 30 - 50 Aminosäuren entsprechend einer gestreckten bzw. α -helikalen Konformation der naszierenden Polypeptidkette fassen. Die Präsenz dieses langen Tunnels in allen Organismen impliziert dessen Wichtigkeit, obwohl die genaue Funktion bislang ungeklärt ist. In zwei kürzlich veröffentlichten Arbeiten an ‚angehaltenen‘ Ribosomen mit naszierender Polypeptidkette konnte gezeigt werden, dass kurze Segmente der naszierenden Polypeptidkette möglicherweise schon im ribosomalen Tunnel in eine definierte Sekundärstruktur bzw. globuläre Konformation falten (Gilbert et al., 2004; Woolhead et al., 2004). Woolhead et al. konnten mit der Methode des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) für zwei sekretorische Proteine die Faltung einer definierten α -helikalen Struktur im Tunnel des eukaryontischen Ribosoms nachweisen, während Gilbert et al. in einer Cryo-EM Studie die mögliche Ausbildung einer globulären Struktur im Tunnel des bakteriellen Ribosoms beobachteten. Eine andere Studie beobachtete ebenfalls eine Erweiterung des ribosomalen Tunnels und schlug darauf aufbauend eine mögliche kotranslationale Faltung im ribosomalen Tunnel vor (Amit et al., 2005). Diese Ergebnisse lassen zwar keinen allgemeingültigen Schluss zu einer Rolle des

ribosomalen Tunnels in der kotranslationalen Proteinfaltung zu, zeigen aber, dass der Tunnel wahrscheinlich nicht als rigider, inerte Ribosomenausgang zu betrachten ist und dass die Faltung schon im Tunnel beginnen kann.

Abgesehen von einem möglichen Beginn der Faltung im ribosomalen Tunnel, besteht die Frage inwieweit die Proteinfaltung nachdem die naszierende Polypeptidkette den Tunnel verlässt kotranslational verläuft und ob es Unterschiede zwischen den Strategien von Prokaryonten und Eukaryonten gibt, was sich allein aufgrund der unterschiedlichen Expressionsgeschwindigkeiten vermuten lässt. Eine Reihe von Studien deuten auf einen kotranslationalen Start der Proteinfaltung hin (Frydman et al., 1999; Kolb et al., 2000; Netzer und Hartl, 1997; Nicola et al., 1999). Der Anteil an Proteinen, die ihre Faltung kotranslational beginnen, kann aber nur schlecht bestimmt werden.

Vielmehr scheint es dagegen fundamentale Unterschiede in den Fähigkeiten zur kotranslationalen Faltung zwischen Prokaryonten und Eukaryonten zu geben. Basierend auf den Ergebnissen aus drei Studien, die Unterschiede in der Faltung von eukaryontischen und bakteriellen Multi-Domänen-Proteinen in Bakterien und Eukaryonten feststellten, wurde postuliert, dass die Faltung von Multi-Domänen-Proteinen in Eukaryonten hauptsächlich kotranslational verläuft, während den Bakterien teilweise die Fähigkeit zur effizienten kotranslationalen Faltung fehlt (Agashe et al., 2004; Chang et al., 2005; Netzer und Hartl, 1998). Diese Beobachtung unterstützt die allgemeine Annahme, dass die effiziente Faltung von großen, modular aufgebauten Multi-Domänen-Proteinen bevorzugt sequentiell und kotranslational verläuft, da so die Wahrscheinlichkeit der Fehlfaltung durch destruktive intra- und intermolekulare Wechselwirkungen im dicht gepackten cytosolischen Milieu minimiert wird (Netzer und Hartl, 1997). Versuche zur *in vitro* Rückfaltung von Proteinen, die deutliche Unterschiede in der Faltungsgeschwindigkeit von homologen Proteinen aus Prokaryonten und Eukaryonten zeigten, sprechen außerdem für einen unterschiedlichen Faltungsmechanismus (Widmann und Christen, 2000). Es ist allerdings nicht klar, inwiefern diese Annahmen für den Großteil der bakteriellen Multi-Domänen-Proteine gelten. Generell kann die Faltung in Prokaryonten ebenso wie in Eukaryonten kotranslational verlaufen, aber es scheint fundamentale Unterschiede in der effizienten kotranslationalen Faltung von Multi-Domänen-Proteinen zu geben.

Durch diese Beobachtungen wird deutlich, dass es Unterschiede im Netzwerk der Faltungshelfer zwischen Prokaryonten und Eukaryonten geben muss, und dass eine

effiziente kotranslationale Kontrolle der Proteinfaltung andere Ansprüche an die beteiligten Faktoren stellt als eine posttranslationale. Es ist zu vermuten, dass die Faltung einer größeren Anzahl von komplexeren, modularen eukaryontischen Proteinen ein ebenfalls vielfältigeres Repertoire an spezialisierten Faltungshelfern in Eukaryonten erfordert. Inwiefern die Primärstruktur der wachsenden Polypeptidkette bestimmt welches Repertoire an spezialisierten Faltungshelfern sie benötigt bzw. rekrutiert, oder ob einigen Faktoren eine stärker aktive regulatorische Funktion zukommt, bleibt fraglich.

1.3.3 Ribosomen - assoziierte Chaperone am Tunnelausgang

Wie bereits erwähnt, müssen noch während der Synthese der wachsenden Polypeptidkette, sobald die Polypeptidkette den ribosomalen Tunnel verlässt, eine Reihe von so unterschiedlichen Prozessen wie Faltung, Proteinsortierung und enzymatische Modifikationen eingeleitet werden. Ein gemeinsames Merkmal der Faktoren, die diese Prozesse einleiten und koordinieren, ist deren Assoziation mit dem Ribosom an der Oberfläche um den ribosomalen Tunnelausgang und deren Zugang zur naszierenden Polypeptidkette, sobald diese den Tunnel verlässt. Fraglich ist, inwiefern diese unterschiedlichen Faktoren ähnliche Strategien zur Assoziation mit dem Ribosom verwenden und wie eine koordinierte Wechselwirkung dieser Vielzahl von Faktoren mit der naszierenden Polypeptidkette stattfinden kann.

Ribosomen-assoziierte Faltungshelfer

Die Ribosomen-assozierten Faltungshelfer sind die ersten Faltungshelfer, die mit der naszierenden Polypeptidkette interagieren, sobald diese den Tunnel verlässt und die den Faltungsprozess kotranslational beeinflussen oder regulieren. Interessanterweise unterscheiden sich diese Ribosomen-assozierten Faltungshelfer stark zwischen Prokaryonten und Eukaryonten und zeigen keinerlei sequenzspezifische oder strukturelle Homologie zueinander (siehe Abbildung 5 für eine Übersicht der unterschiedlichen Ribosomen-assozierten Faltungshelfer in Prokaryonten, Hefe und höheren Eukaryonten und Bukau, 2005 für einen detaillierteren Übersichtsartikel).

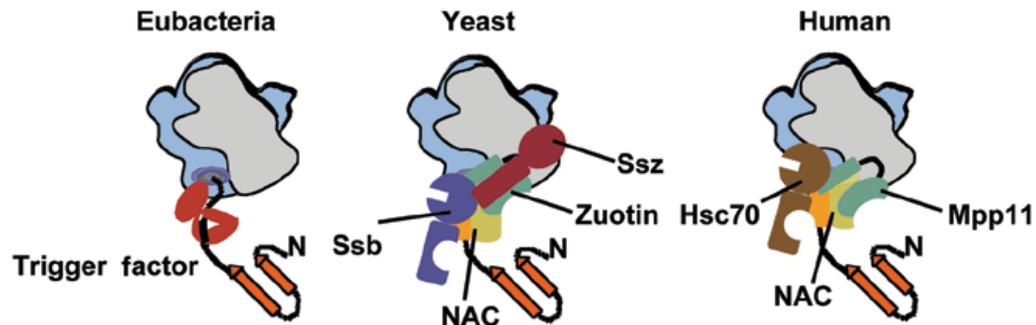


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Ribosomen-assoziierten Faktoren am Tunnelausgang in den unterschiedlichen Organismen. Die Illustration zeigt das unterschiedliche Repertoire an Ribosomen-assoziierten Faktoren in Prokaryonten und Eukaryonten. Darstellung adaptiert von Bukau, 2005.

Das am besten charakterisierte eukaryontische System ist die Hefe *S. cerevisiae*. In Hefe finden sich zwei unterschiedliche Ribosomen-assoziierte Systeme, die an der kotranslationalen Faltungskontrolle beteiligt sein könnten: Die Ssb/Ssz/Zuotin-Triade und das heterodimere NAC (Nascent Polypeptide-Associated Complex). Das erste System ist ein Hsp70/Hsp40 – Chaperon System mit zwei spezialisierten Hsp70 Chaperonen (Ssb und Ssz) und dem Hsp40 Ko-Chaperon von Ssz, Zuotin. Ssz und Zuotin bilden zusammen den RAC (Ribosom Associated Complex) und zusammen mit Ssb die sogenannte ribosomale Chaperon Triade (Gautschi et al., 2001; Gautschi et al., 2002). Inaktivierung der Chaperon Triade durch Deletion von einem der drei Teile oder allen drei Teilen der Triade führt zu erhöhter Salz Sensitivität, Kälte Sensitivität und Hypersensitivität gegenüber Aminoglykosiden (Gautschi et al., 2002; Hundley et al., 2002; Yan et al., 1998). Die molekulare Basis dieser Phänotypen ist allerdings noch ungeklärt und ermöglicht so keinen Rückschluss auf die spezifische Funktion dieser Triade. Trotzdem lässt sich feststellen, dass die Chaperone der klassischen Hsp70/Hsp40 Familie angehören und damit wahrscheinlich auch eine zumindest teilweise analoge Funktion als Chaperone erfüllen und den Faltungsprozess in der bekannten ATP-kontrollierten Art und Weise beeinflussen. Interessanterweise wird aber im Unterschied zu den meisten Chaperonen, die durch zellulären Stress reguliert werden, das Ssb Chaperon der Triade nicht durch zellulären Stress beeinflusst, sondern scheint eher an die Regulation der Translationsmaschinerie gekoppelt zu sein (Lopez et al., 1999). Das spricht für eine spezifischere und über die typische ATP-regulierte Chaperon-Aktivität hinausgehende Funktion dieser Triade am Ribosom.

Erst kürzlich konnten die Homologen zum Hefe RAC im humanen System gefunden werden (Hundley et al., 2005; Otto et al., 2005). Das humane Zuotin Homolog MPP11 assoziiert mit Ribosomen und kann den Phänotyp einer Zuotin Deletion in Hefe komplementieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass MPP11 einen stabilen Komplex mit dem humanen Ssz Homolog Hsp70L1 bildet und beweist damit die Konservierung des RAC von Hefe bis zu Säugetieren. Darüber hinaus weisen die Versuche im Hefe-System darauf hin, dass das humane MPP11 kein Ribosomen-assoziiertes Ssz Homolog benötigt, sondern vielmehr in der Lage ist, cytosolisches Hsp70 zum Ribosom zu rekrutieren.

Die Arbeiten am Hefe und humanen RAC bzw. der Chaperon Triade zeigen trotz der Abweichungen im Bezug auf das Ssb, dass das Prinzip eines ATP-regulierten Ribosomen-assoziierten Hsp70/Hsp40 Chaperon Systems in Eukaryonten hoch konserviert ist und impliziert somit die Notwendigkeit einer kotranslationalen ATP-regulierten Faltungskontrolle am Ribosom in direkter Umgebung des ribosomalen Tunnelausgangs. Zusätzlich zu diesem spezialisierten Hsp70/Hsp40 System assoziiert der heterodimere Komplex NAC mit Ribosomen und interagiert mit der naszierenden Polypeptidkette, die genaue Funktion am Ribosom bleibt aber bis jetzt rätselhaft (für weitere Details zu NAC siehe Abschnitt 1.2).

Trigger Faktor - Ribosomen-assoziiertes Chaperon in Prokaryonten

Im Gegensatz zum Eukaryontischen System gibt es in Prokaryonten nur ein hoch konserviertes Ribosomen-assoziiertes Chaperon, den Trigger Faktor (TF), der der erste nicht-ribosomale Faktor ist, der die naszierende Polypeptidkette kontaktiert (Crooke und Wickner, 1987; Hesterkamp et al., 1996; Stoller et al., 1995; Valent et al., 1995).

Die Funktion des Trigger Faktors als Ribosomen-assoziiertes Faltungshelfer wurde ursprünglich durch Deletionsmutanten in *E. coli* Stämmen analysiert (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). Die Zellen in TF deletierten *E. coli* Stämmen zeigten keinerlei signifikanten Phänotyp, wohingegen die Deletion sowohl von TF als auch von DnaK, dem cytosolischen Hsp70 Chaperon aus *E. coli*, zu einer synthetischen Letalität der Zellen führte. Die Deletion der beiden Chaperone führt zu einer massiven Aggregation und zeigt, dass die Zellen entweder TF oder DnaK zur Verhinderung von Fehlfaltung benötigen und lässt außerdem vermuten, dass TF und DnaK in der Faltung

von neuen Proteinen kooperieren. Der TF besitzt außerdem eine PPIase Domäne (Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerase), die für die Chaperon-Aktivität keine Rolle spielt, aber möglicherweise Einfluss auf die Faltungsgeschwindigkeit hat.

Durch die erst kürzlich veröffentlichten Kristallstrukturen des TF am Ribosom konnte durch Kombination der Ergebnisse mit den biochemischen Daten zur ribosomalen Bindungsstelle ein Modell für den TF am Ribosom entwickelt werden (Baram et al., 2005; Ferbitz et al., 2004; Schlunzen et al., 2005). Die biochemische Identifikation des ribosomalen Proteins L23 als konservierte Bindungsstelle des TF am Ribosom stimmt mit der Kristallstruktur überein (Kramer et al., 2002). In Abbildung 6 ist die Struktur des Trigger Faktors und das ausgehend von der Kristallstruktur des N-terminalen TF Fragmentes aus *E. coli* und der 50S ribosomalen Untereinheit von *H. marismortui* vorgeschlagene Modell schematisch dargestellt.

Die Kristallstruktur des Trigger Faktors alleine zeigt eine ausgestreckte Konformation. Der Trigger Faktor bildet in dieser Konformation eine grosse hydrophobe Tasche (siehe Abbildung 6B), die von der N-terminalen Ribosom-bindungs Domäne bis fast zur PPIase Domäne reicht und damit eine Interaktionsfläche für hydrophobe Flächen der naszierenden Polypeptidkette oder ebenso eine protektive Umgebung bietet. Das Modell der Struktur am Ribosom zeigt eine hydrophobe Tasche, die gefaltete Domänen von bis zu 15 kDa fassen könnte. Zur Erklärung der funktionellen Eigenschaften des TF am Ribosom wurde vorgeschlagen, dass der Trigger Faktor durch die hydrophobe Tasche eine protektive Umgebung über dem ribosomalen Tunnelausgang schafft, in der sich die naszierende Polypeptidkette ohne die Gefahr unspezifischer intermolekularer Wechselwirkungen in kleine Domänen falten kann. Außerdem bildet die hydrophobe Tasche eine Oberfläche zur Assoziation mit hydrophoben Bereichen von Faltungsintermediaten und unterstützt so den spezifischen Faltungsprozess. Das Modell ermöglicht so eine Art sequentielle Faltung von kleinen Domänen. Unterstützt wird dieses Modell der sequentiellen Faltung durch *in vitro* Translations Versuche, in denen die Zugabe von Trigger Faktor zu einer Verzögerung der Faltung führte und die Menge des erhaltenen, gefalteten und aktiven Proteins erhöht werden konnte (Agashe et al., 2004).

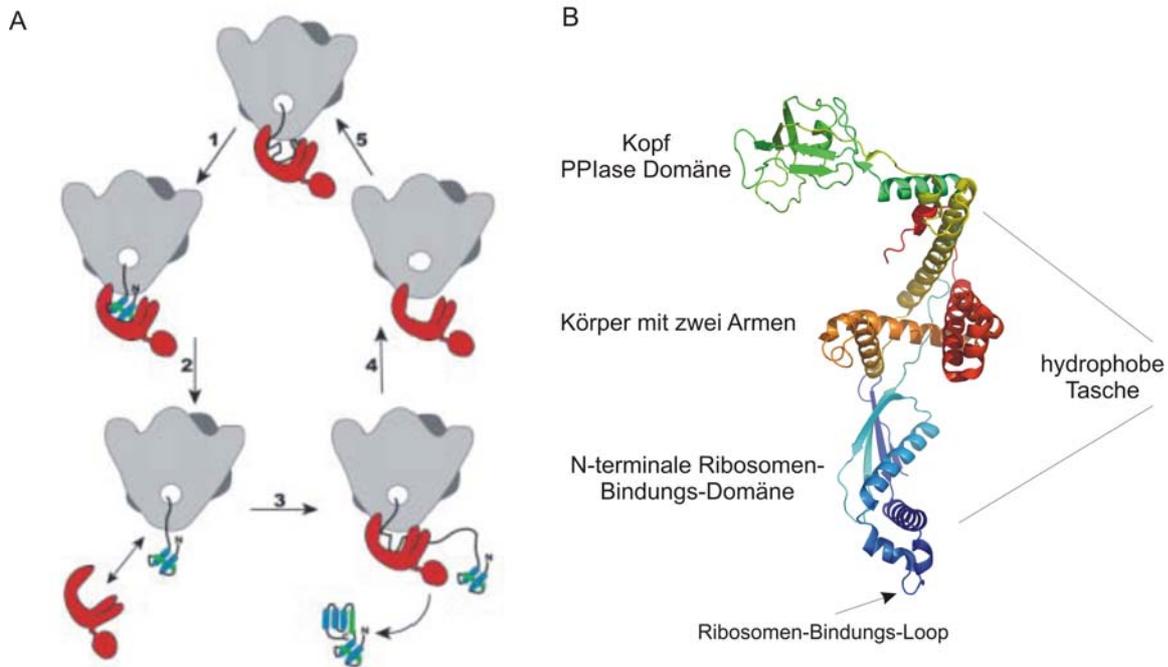


Abbildung 6 Modell des Trigger Faktors und der Funktion als Chaperon am Ribosom. **A** Illustration des Modells der TF Aktivität am Ribosom (Ferbitz et al., 2004). Der TF ist in Rot schematisch dargestellt. **B** Kristallstruktur des TF mit Blick von ‚unten‘ auf die hydrophobe Tasche. Die Struktur ist in sich graduell von Blau nach Rot ändernder Farbe vom N- bis C-Terminus illustriert. Die oberhalb in grün dargestellte Domäne ist die PPlase Domäne, die in Blau gezeigte Domäne ist die N-terminale Ribosomen-Bindungs-Domäne mit dem Ribosomen-Bindungs-Loop und die rot bis gelbe Domäne repräsentiert den Körper des TF mit zwei langen Helices, die wie Arme vom Körper weg weisen.

Die Idee einer protektiven hydrophoben Umgebung über dem ribosomalen Tunnelausgang macht offensichtlich Sinn, das Modell des Trigger Faktors lässt aber ebenso einige Fragen offen. Beispielsweise stellt sich die Frage, ob die Orientierung des Trigger Faktors *in vivo* tatsächlich so definiert ist und ob es eine Änderung in der TF Konformation bei Bindung an Ribosomen mit naszierender Polypeptidkette gibt (Horwich, 2004). Eine weitere Untersuchung zur Funktion der einzelnen Domänen des Trigger Faktors, in der herausgefunden wurde, dass die N-terminale Ribosomen-Bindungs-Domäne (TF-BD) alleine den letalen Phänotyp der Doppeldeletion von TF und DnaK verhindern kann, stellt dieses Modell wiederum in Frage (Kramer et al., 2004). Zwei erst kürzlich veröffentlichte Kristallstrukturen des TF im Komplex mit der 50S ribosomalen Untereinheit aus *D. radiodurans* präsentieren im Unterschied zu der ersten Struktur von Ferbitz et al. ein etwas anderes Bild der Bindung ans Ribosom (Baram et al., 2005; Schlunzen et al., 2005). Die Ansätze unterscheiden sich ins

Besondere dadurch, dass Schlünzen et al. bzw. Baram et al. einen homologen Komplex aus dem bakteriellen TF und der bakteriellen 50S ribosomalen Untereinheit aus *D. radiodurans* untersucht haben, während Ferbitz et al. den TF aus *E. coli* im Komplex mit der archaebakteriellen 50S Untereinheit aus *H. marismortui* zeigen. Die Struktur des Trigger Faktors zeigt in den beiden Studien von Schlünzen et al. bzw. Baram et al. eine signifikante Änderung der N-terminalen Ribosomen-Bindungs-Domäne (TF-BD), die durch die Unterschiede in den ribosomalen Proteinen am Tunnelausgang zwischen Prokaryonten und Archaea verursacht wird und stellt die Frage nach der Relevanz und tatsächlichen Dimension der von Ferbitz et al. vorgeschlagenen hydrophoben Tasche.

Prokaryonten und Eukaryonten weisen damit ein sehr unterschiedliches Repertoire an Ribosomen-assoziierten Faltungshelfern auf. In Prokaryonten gibt es nur den Trigger Faktor und ein Großteil der Proteine scheint zur richtigen Faltung kein ATP reguliertes Hsp70/Hsp40 System zu benötigen. In Eukaryonten dagegen gibt es NAC, das keine Homologie zum TF zeigt, keine Chaperon-ähnliche Aktivität hat und bis jetzt funktionell wenig entschlüsselt ist, und es gibt ein direkt mit dem Ribosom assoziiertes spezialisiertes Hsp70/Hsp40 System. Dieses komplexere System von Ribosomen-assoziierten Chaperonen trägt damit der wahrscheinlich komplexeren Faltung vieler eukaryontischer Multi-Domänen-Proteine Rechnung, deren Faltung vermehrt kotranslational eingeleitet wird und eine grössere Vielfalt an spezialisierten Faltungshelfern sowohl ko- als auch post-translational benötigt, die dementsprechend rekrutiert werden müssen.

1.4 Zielsetzung

NAC wurde als erster Ribosomen-assoziiertes Faktor identifiziert, der in der eukaryontischen Zelle die naszierende Polypeptidkette am Ribosom kontaktiert und diese schützt. Trotz dieser offensichtlichen Analogie zu anderen Ribosomen-assoziierten Faktoren ist die Funktion von NAC am Ribosom im Gegensatz zu den meisten anderen Faktoren wenig entschlüsselt und wahrscheinlich nicht auf die Wechselwirkung mit der wachsenden Polypeptidkette beschränkt. Die Wichtigkeit von NAC wird darüber hinaus durch den letalen Phänotyp von NAC Mutationen in vielzelligen Organismen unterstrichen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die Kristallstruktur des eukaryontischen NAC zu ermitteln, um über die Struktur des Komplexes neue Anhaltspunkte für die Funktion von NAC am Ribosom zu bekommen.