

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Synthese von Polypeptiden am Ribosom ist ein komplexer Prozess, der noch immer viele Fragen offen lässt. Besonders interessant ist hierbei die Frage, wie die wachsende Polypeptidkette aus dem Ribosom in das dicht gepackte cytosolische Milieu entlassen und gleichzeitig in den nativen, gefalteten Zustand überführt wird.

Der Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC) ist ein in Eukaryonten hoch konservierter Komplex, der in der Zelle mit dem Ribosomen assoziiert ist und keine Homologie zu anderen Faktoren zeigt. Die Beobachtung, dass NAC zu sehr kurzen Ribosomen-gebundenen Polypeptidketten verknüpft werden kann und diese schützt, führte zu der Annahme, dass NAC der erste nicht-ribosomale Faktor ist, der mit der wachsenden Polypeptidkette interagiert und diese von der cytosolischen Umgebung abschirmt. Darüber hinaus wurde postuliert, dass NAC am Ribosom eine regulatorische Funktion in der kotranslationalen Zielsteuerung von Proteinen zum ER übernimmt. Die allgemeine Wichtigkeit von NAC für die Funktion der eukaryontischen Zelle wird durch den letalen Phänotyp von NAC Mutationen in höheren Eukaryonten unterstrichen.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden die ersten Kristallstrukturen eines NAC Proteins bestimmt und darauf aufbauend ein strukturelles Modell für die Funktion der hoch konservierten NAC-Domäne am Ribosom vorgeschlagen. In einem ersten Schritt wurde die Kristallstruktur des funktionellen archaebakteriellen NAC Homologs bestimmt. Die Struktur zeigt erstmals einen Teil der hoch konservierten NAC-Domäne, die eine neuartige dimere β -Fass-Struktur ausbildet und die Dimerisierungsdomäne des Komplexes darstellt. Darüber hinaus weist die Struktur eine UBA-Domäne mit einer charakteristischen hydrophoben Oberfläche auf und deutet damit eine bisher nicht erkannte regulatorische Komponente von NAC an. Aufbauend auf der archaebakteriellen Struktur konnte die Kristallstruktur der heterodimeren humanen NAC-Domäne bestimmt werden. Die Struktur repräsentiert im Gegensatz zur archaebakteriellen Struktur die komplette NAC-Domäne und verdeutlicht die Konservierung einer flexiblen hydrophoben Tasche an der Oberfläche der NAC-Domäne. Ausgehend von dieser konservierten Eigenschaft der einzigartigen NAC-Domäne und dem Vergleich der NAC-Domäne zur hydrophoben Tasche der Trigger Faktor Ribosom-Bindungs-Domäne wurde ein strukturelles Modell für die Interaktion der hydrophoben Tasche der NAC-Domäne mit der naszierenden Polypeptidkette am Ribosom vorgeschlagen.

Das Modell bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die biochemischen Ergebnisse der Wechselwirkung von NAC mit der naszierende Polypeptidkette und der Abschirmung von kurzen Sequenzen, und es ermöglicht eine Reihe von Spekulationen und neuen Ansatzpunkten für zusätzliche, regulatorische Funktionen von NAC am Ribosom. Zukünftige biochemische Arbeiten können auf der präsentierten Hypothese aufbauen. Die derzeit verfolgte Kokristallisation von NAC-Ribosom Komplexen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Paola Fucini (MPI für Molekulare Genetik, Berlin-Dahlem) und die präsentierten vorläufigen Ergebnisse sollten zusätzliche Anhaltspunkte zum Verständnis der Funktion von NAC am Ribosom liefern.

Zur Entschlüsselung der funktionellen Positionierung von NAC am Ribosom ist wahrscheinlich ein kombinierter Ansatz aus Strukturanalyse und biochemischen Querverknüpfungsstudien notwendig, da weder Kokristallisationsstudien noch Querverknüpfungsversuche alleine die funktionelle Orientierung von eukaryontischem NAC am Ribosom lösen können und sich die Frage stellt, inwieweit die Orientierung von NAC am Ribosom von der Polypeptidkette und möglicherweise sogar von der Sequenz der Polypeptidkette abhängig ist. Die Cryo-Elektronenmikroskopie an Komplexen aus NAC und Ribosomen mit gebundener Polypeptidkette könnte möglicherweise eine Antwort darauf geben. Zusätzlich zu dem biochemischen Beweis des vorgestellten Modells eröffnen sich durch die präsentierten Strukturen noch eine Reihe von offenen Fragen und weiteren Ansatzpunkten für zukünftige biochemische Arbeiten. Die Spekulation über eine mögliche Funktion der ungeordneten Bereiche des eukaryontischen NAC lässt beispielsweise offen, ob und welche anderen Interaktionspartner NAC haben konnte oder inwieweit NAC tatsächlich eine regulatorische Funktion am Ribosom zukommt.

5 Summary

The synthesis of new polypeptides at the ribosome is a unique process, which still leaves a number of questions unanswered. One particularly interesting aspect is the question how the nascent polypeptide chain is released from the ribosome into the highly dense matter of the cytosol and how the polypeptide concurrently reaches its native, folded state.

The Nascent Polypeptide-associated Complex (NAC) was identified in eukaryotes as the first cytosolic factor that contacts the nascent polypeptide chain emerging from the ribosome. NAC is highly conserved from yeast to human and does not show any homology to other proteins. It was proposed that NAC protects the nascent chain from inappropriate early interactions with cytosolic factors. The general significance of NAC is emphasized by the embryonically lethal phenotypes of NAC mutations in mice, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*.

In this work we present the first crystal structures of a NAC protein and based on that we propose a model for the function of the conserved NAC-domain on the ribosome. In a first step the crystal structure of the functional archaeobacterial NAC homolog was determined, revealing two structural features: (i) a novel dimeric β -barrel fold, which mediates the dimerization of the conserved NAC-domains and (ii) a ubiquitin-associated domain, which suggests a yet unidentified role for NAC in the cellular protein quality control system via the ubiquitination pathway. Based on the archaeobacterial crystal structure we were able to determine the first crystal structure of the heterodimeric human NAC-Domain. The structure represents in contrast to the archaeobacterial structure the complete NAC-domain and reveals a conservation of a versatile hydrophobic pocket on the surface of the NAC-domain. The observation of a conserved hydrophobic pocket of the NAC-domain and the comparison of this feature with the hydrophobic pocket of the Trigger Factor ribosome-binding-domain lead to a structural model of the NAC-domain on the ribosome and the hypothesis of the hydrophobic pocket of the NAC-domain interacting with the nascent polypeptide chain on the ribosome. The proposed model presents an explanation for the biochemical observations of NAC interacting with short polypeptide chains on the ribosome and opens up a number of speculations and new approaches for future biochemical studies to further elucidate NAC's function on the ribosome.