

1 Einleitung

1.1 Proteinsynthese in der prokaryontischen und eukaryontischen Zelle

Von zentraler Bedeutung in der Biologie ist die Übersetzung der genetischen Information in funktionelle Proteine. Diese Proteinbiosynthese durch Ribosomen ist ein fundamentaler und, in allen Lebewesen existierender, universeller Prozess. Das Ribosom hat dabei die essentielle Funktion als Übersetzer. Es nutzt die in der *messenger* RNA (mRNA) enthaltene Information, um ein zunächst lineares Polypeptid mit korrespondierender Aminosäuresequenz zu synthetisieren. In weiteren Schritten erreichen neu synthetisierte Polypeptide ihre aktive dreidimensionale Konformation. Einige falten selbstständig, wohingegen andere die Hilfe von Chaperonen (Faltungshelfern) benötigen.

Eine prokaryontische Zelle enthält ungefähr 20.000 Ribosomen, während in den Zellen höherer Eukaryonten, in Abhängigkeit vom Gewebetyp, einige Millionen Ribosomen vorkommen können. So haben Zellen mit einer höheren Proteinsyntheserate, wie Leberzellen, eine größere Anzahl an Ribosomen. Die Syntheserate, mit der Aminosäuren an die naszierende Polypeptidkette angefügt werden, ist bemerkenswert hoch und beträgt bei Bakterien 10 – 20 Aminosäuren pro Sekunde (Neidhardt, 1987). Daraus folgt, dass ein durchschnittlich großes Protein von 300 Aminosäuren unter optimalen Wachstumsbedingungen in 15 – 30 Sekunden synthetisiert wird. Diese Aufgabe wird vom Ribosom mit einer erstaunlichen Genauigkeit durchgeführt. So ereignet sich nur ungefähr alle 3.000 kodierte Aminosäuren ein Fehler (für detaillierte Beschreibung des Ribosoms und des Translationsprozesses siehe Wilson and Nierhaus, 2003).

Bei Eukaryonten beträgt die Translationsgeschwindigkeit immerhin noch 4 bis 7 Aminosäuren pro Sekunde (Braakman *et al.*, 1991; Bonven and Gullov, 1979). Der in Tabelle 1 aufgeführte Proteinumsatz am Beispiel einer humanen HeLa-Zelle beruht auf einem typischen Protein von 600 Aminosäuren. Betrachtet wird die Dauer eines Zellzyklus (24 h), während der alle zellulären Proteine neu synthetisiert werden müssen, zusätzlich zu den vom Proteasom in dieser Zeit wieder abgebauten Proteinen. Theoretisch könnten alle Ribosomen zusammen 5×10^6 Proteine pro Minute synthetisieren (Yewdell, 2001).

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

	Anzahl pro Zelle	Umsatz pro Minute
Proteine	2×10^9	
Ribosomen	10^7	3×10^6 synthetisierte Proteine
HSC70	10^7	6×10^5 gefaltete Proteine
TRiC	2×10^6	$4,5 \times 10^5$ gefaltete Proteine

Die Darstellung des Proteinumsatzes in eukaryontischen bzw. prokaryontischen Zellen verdeutlicht noch mal die zentrale Bedeutung der Translation während der Proteinbiosynthese. Im Hinblick auf den massiven Fluss an Proteinen stellen sich allerdings dadurch zwei Fragen: (i) Wie werden die Proteine in ihre biologisch aktive dreidimensionale Konformation gefaltet? (ii) Wie gelangen sie an ihren korrekten Bestimmungsort im Cytosol oder in andere zelluläre Kompartimente wie das endoplasmatische Retikulum (ER) oder die Plasmamembran?

Beide Prozesse (Faltung und Transport) werden kotranslational durch, mit dem Ribosom assoziierte, Faktoren initiiert. An der Proteinfaltung ist eine große Gruppe an molekularen Faltungshelfern (Chaperone) beteiligt, die zum einen Ribosomen-assoziiert und zum anderen als lösliche Komponenten des Cytosols die neu synthetisierten Proteine posttranslational binden (Young *et al.*, 2004; Frydman, 2001; Hartl and Hayer-Hartl, 2002) (eine Übersicht, der an der Proteinfaltung beteiligten Chaperone, ist in Abbildung 1 dargestellt). Die meisten Chaperone gehören zu den sogenannten Hitze Schock Protein (Hsp) Familien Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 und Hsp10 (die Nummern beziehen sich auf das typische Molekulargewicht der Proteine). Diese Chaperone sind im Gegensatz zu anderen, wie dem Trigger Faktor (TF), der nur in Eubakterien und Chloroplasten existiert, oder dem Hsp70/40 Paar Ssz/Zuotin, welches nur in Eukaryonten gefunden wurde, in fast allen Organismen konserviert. Eine Ausnahme bildet die Domäne der Archaea, in der das Vorkommen der verschiedenen Hitze Schock Proteine recht unterschiedlich ist (eine kurze Übersicht ist in Tabelle 2 dargestellt). So wurden in den bisher sequenzierten Genomen von Archaeobakterien keine Homologe für Hsp90 und Hsp10 gefunden (in *Methanosarcina spp.* gibt es ein Hsp10 Homolog) (Laksanalamai *et al.*, 2004).

Im Wesentlichen zeichnen sich Chaperone durch eine kurzzeitige stöchiometrische Assoziation an Faltungsintermediate aus, wodurch sie Fehlfaltung und Aggregation der noch nicht nativ gefalteten Proteine durch Bindung an hydrophobe Bereiche verhindern (Buchner, 1996; Ellis and Hartl, 1999).

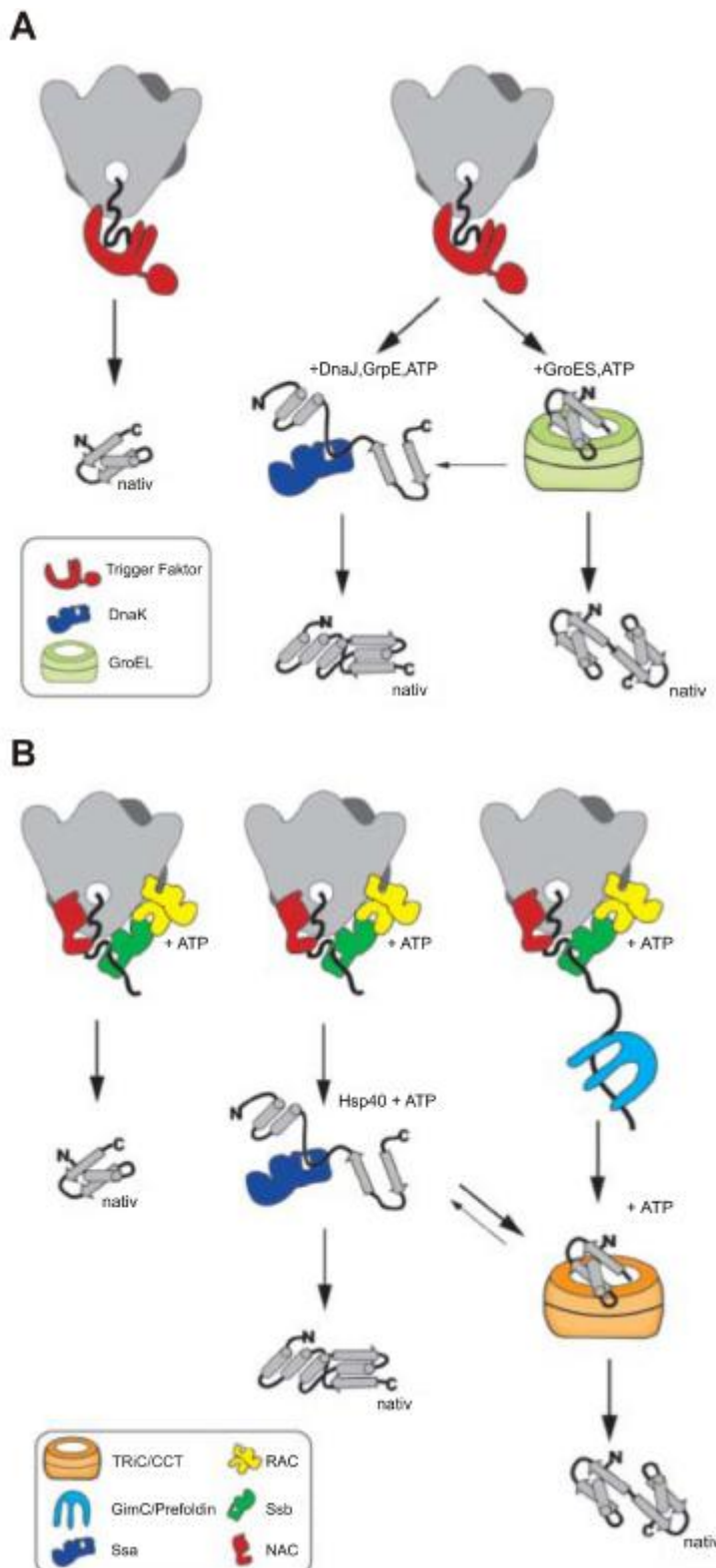


Abbildung 1

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

A In Prokaryoten ist der Trigger Faktor (TF) der einzige Ribosomen-assoziierte Faltungshelfer, der die naszierende Polypeptidkette kotranslational bindet und den Faltungsprozess fördert. Ein Großteil der Proteine (~67%) kann danach selbstständig seine aktive Struktur einnehmen, während einige noch zusätzliche ATP-abhängige Chaperone, wie das Hsp70/40 System – DnaK/DnaJ oder das Hsp60/10 System – GroEL/GroES benötigen.

B In Eukaryoten ist das Chaperon-Netzwerk weitaus komplexer, wie am Beispiel von Hefe gezeigt. Im Gegensatz zu Prokaryoten agieren hier zwei Systeme direkt am Ribosom: Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC) und der Hsp70/Hsp40 Komplex Ssb/RAC. Im Vergleich zu DnaK/DnaJ unterstützt der Ssb/RAC Komplex in ATP-Abhängigkeit die Faltung direkt am Ribosom. Für NAC ist im Gegensatz zu allen anderen Faktoren bisher noch keine Chaperon-Aktivität festgestellt worden. Er ist aber der erste Faktor, der die neu synthetisierte Polypeptidkette kontaktiert. Seine genaue Funktion ist noch unklar. Vergleichbar zu den Prokaryoten besitzen auch Eukaryoten weitere cytosolische Chaperone wie aus den Hsp70 (Ssa) oder Hsp60 (TRiC/CCT) Familien, um eine effiziente Faltung zu gewährleisten. Der Chaperon-Komplex GimC scheint hauptsächlich an der Faltung von Actin und Tubulin beteiligt zu sein. (Abbildung adaptiert von Wegrzyn and Deuring, 2005)

Tabelle 2 Vorkommen der Hsp-Chaperone in den sequenzierten Genomen von hyperthermophilen, thermophilen und mesophilen Archaeobakterien nach Laksanalamai *et al.*, 2004.

Protein	hyperthermophil	thermophil	mesophil
Hsp100	Nein	Nein	Ja
Hsp90	Nein	Nein	Nein
Hsp70	Nein*	Ja	Ja
Hsp60	Ja	Ja	Ja
Hsp40	Nein	Ja	Ja
Hsp10	Nein	Nein	Einige [#]

* Ein mögliches Hsp70 Homolog gibt es in *Aeropyrum pernix*.

[#] Hsp10 wurde bisher nur in *Methanosarcina spp.* gefunden.

Die Synthese von sekretorischen Proteinen oder integralen Membranproteinen ist häufig direkt mit der Translokation durch oder Insertion in eine Membran verknüpft. Diese Proteine werden gewöhnlich mit einer abspaltbaren N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, deren charakteristischer Bestandteil ein kurzer hydrophober Bereich von 7 – 12 Aminosäureresten ist. Der Signal Recognition Particle (SRP), ein konservierter Ribonukleoprotein-Komplex, erkennt die Signalsequenz, sobald sie den ribosomalen Tunnel verlässt, und bindet an den *Ribosome Nascent Chain Complex* (RNC). Nach Bindung der Signalsequenz durch SRP54 wird dabei in Eukaryonten die Translation durch Interaktion der Alu-Domäne des SRP mit der Elongationsfaktor-Bindestelle am Ribosom vorübergehend verlangsamt bzw. gestoppt. Die Alu-Domäne interagiert mit denselben konservierten ribosomalen Kontaktstellen und verhindert dadurch die Assoziation des Elongationsfaktors eEF2 (Halic *et al.*, 2004; Halic and Beckmann, 2005). Der SRP-RNC Komplex erreicht die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) in Eukaryonten oder die innere Plasmamembran in Prokaryonten durch Interaktion mit dem SRP-Rezeptor (SR). Hierfür ist die Bindung von GTP an sowohl SRP als auch den Rezeptor notwendig. Der RNC Komplex wird dann auf das Translokon, einen heterotrimeren Transmembranproteinkomplex, überführt, wobei der SRP-SR Komplex vom Ribosom dissoziiert. In Folge der GTP-Hydrolyse dissoziiert SRP vom Rezeptor (Koch *et al.*, 2003; Keenan *et al.*, 2001). Die Bindung des RNC Komplexes mit dem Translokon bewirkt die Öffnung der Translokationspore und eine Interaktion mit der Signalsequenz, so dass die naszierende Kette in den Kanal gelangt und während der weiteren Translation direkt ins Lumen des ER überführt oder in die Membran inseriert wird (Keenan *et al.*, 2001; Doudna and Batey, 2004).

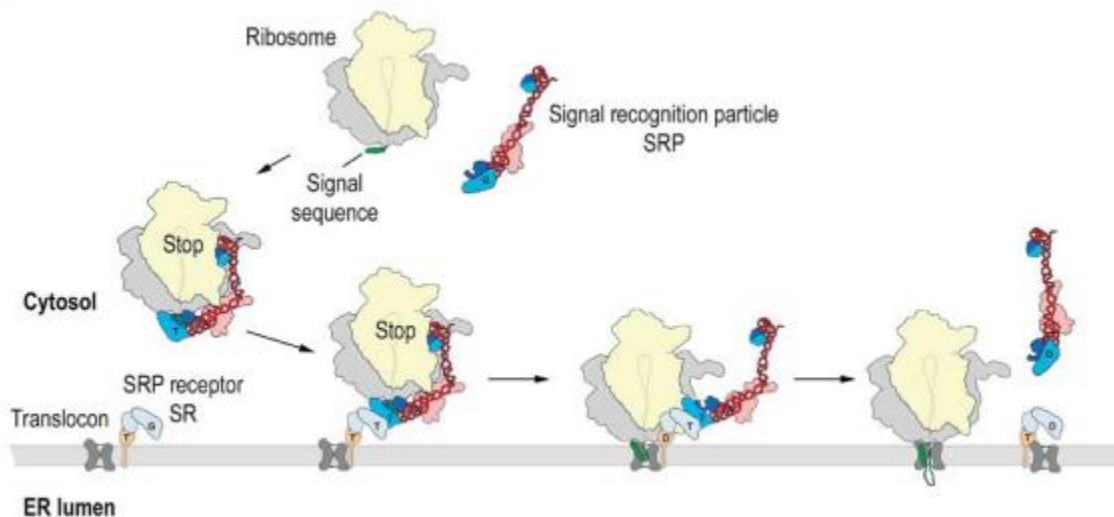


Abbildung 2 Schematische Übersicht des SRP-Zyklus bei der kotranslationalen Translokation am ER. SRP interagiert mit der Signalsequenz und assoziiert mit dem Ribosom. In Eukaryonten führt dies zum Stopp der Elongation. Durch Interaktion von SRP mit SR gelangt der Komplex an die ER-Membran, wo der RNC Komplex auf das Translocon überführt wird. Gefördert durch die GTP Hydrolyse an SRP und SR dissoziiert der SRP-SR Komplex auseinander. G weist auf die GTPase Domänen von SRP bzw. SR hin (T: mit GTP; D: mit GDP) (Abbildung adaptiert von Halic and Beckmann, 2005)

In einem zweiten Mechanismus werden einige sekretorische Proteine erst im Anschluss an die komplette Synthese (posttranslational) transloziert. Hierbei wird die Polypeptidkette durch cytosolische Chaperone entfaltet gehalten und ATP-abhängig durch einen Translokationskanal in das Lumen des ER oder das Periplasma bei Prokaryonten transportiert. Die meisten sekretorischen Proteine werden in Eubakterien posttranslational transloziert, wohingegen bei höheren Eukaryonten die Translokation hauptsächlich kotranslational erfolgt. In Eubakterien gibt es darüber hinaus das TAT-System, welches über einen speziellen Kanal den Transport von gefalteten Proteinen, die meistens bereits Kofaktoren bzw. Koenzyme enthalten, ins Periplasma erlaubt. Die Energie hierfür stammt dabei aus dem trans-Membranen Protonengradienten der inneren Plasmamembran (Wickner and Schekman, 2005; Osborne *et al.*, 2005).

1.2 Schicksal der naszierenden Polypeptidkette in der prokaryontischen und eukaryontischen Zelle

Das Feld der Ribosomen-assoziierten Faktoren und Chaperone ist in den vergangenen Jahren, sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten, intensiv untersucht worden. Der folgende Abschnitt soll eine Übersicht über die

neueren Erkenntnisse zu den Faktoren geben, die in direkter Umgebung der neu synthetisierten Polypeptidkette an das Ribosom binden.

1.2.1 Kotranslationale Ereignisse am Ribosom und der ribosomale Tunnelausgang

Während und nach der Synthese der Polypeptidkette am Ribosom müssen in erster Linie zwei Probleme gelöst werden. Zum einen muss sich die Vielfalt von sehr unterschiedlichen Proteinen in die richtige, funktionell aktive Tertiärstruktur falten und zum anderen muss der Transport zum jeweiligen Bestimmungsort sichergestellt sein. Daneben müssen aber auch noch weitere Faktoren Zugang zur naszierenden Polypeptidkette haben, wie modifizierende Enzyme, die z.B. für die N-Acetylierung (NatA) (Gautschi *et al.*, 2003) oder die Entfernung des N-terminalen Methionins (MetAP) (Addlagatta *et al.*, 2005) zuständig sind und sehr wahrscheinlich kotranslational agieren. Diese Vielzahl an zum Teil parallel verlaufenden Prozessen macht deutlich, dass es ein komplexes Netzwerk von Faktoren geben muss, welches auf die speziellen Bedürfnisse der verschiedenen Proteinsubstrate eingehen kann, sobald die wachsende Polypeptidkette das Ribosom verlässt. Hieraus folgt, dass die meisten der Faktoren in geringer Entfernung zum Ausgang des ribosomalen Tunnels binden müssen, und es stellt sich die Frage nach möglichen konservierten Bindungsstellen am Ribosom.

Die inzwischen zur Verfügung stehenden Kristall- und Kryo-Elektronen-Mikroskopie (Kryo-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 ihrer Größe und Zusammensetzung, eine große strukturelle Ähnlichkeit der Ribosomen aus Archaea, Eubacteria und Eukarya (Ban *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001; Schlünzen *et al.*, 2000; Schuwirth *et al.*, 2005; Spahn *et al.*, 2001; Wimberly *et al.*, 2000). Strukturelle Unterschiede zwischen den Ribosomen der drei Domänen finden sich hauptsächlich in den zum Cytosol exponierten Oberflächen, aber nicht an der Interaktionsfläche der großen und der kleinen ribosomalen Untereinheit.

Der Ausgang des ribosomalen Tunnels ist von rRNA und zum Teil unterschiedlichen ribosomalen Proteinen umgeben. Die Proteine L22p, L23p, L24p

und L29p sind in allen Organismen hoch konserviert, während die Proteine L19e, L31e und L39e nur in Archaea und Eukaryonten vorkommen. Dagegen kommen bei Eubakterien die Proteine L17p und L32p hinzu (Nomenklatur der ribosomalen Proteinfamilien nach: *Index of ribosomal proteins classified by families on the basis of sequence similarities*, UniProt – Swiss-Prot Knowledgebase). Der Bereich um die Austrittsstelle, an der die wachsende Polypeptidkette das Ribosom verlässt, ist essentiell für die korrekte Bindung und Ausrichtung der Ribosomen-assoziierten Faktoren, die mit der Polypeptidkette in Kontakt treten.

Der in Abbildung 3 dargestellte Vergleich von konservierten und variablen ribosomalen Proteinen um den Tunnelausgang, zwischen Archaea, Eubacteria und Eukarya, bietet Anhaltspunkte für potentielle Interaktionspartner der Ribosomen-assoziierten Faktoren zur Wechselwirkung mit dem Ribosom und mögliche konservierte Strategien.

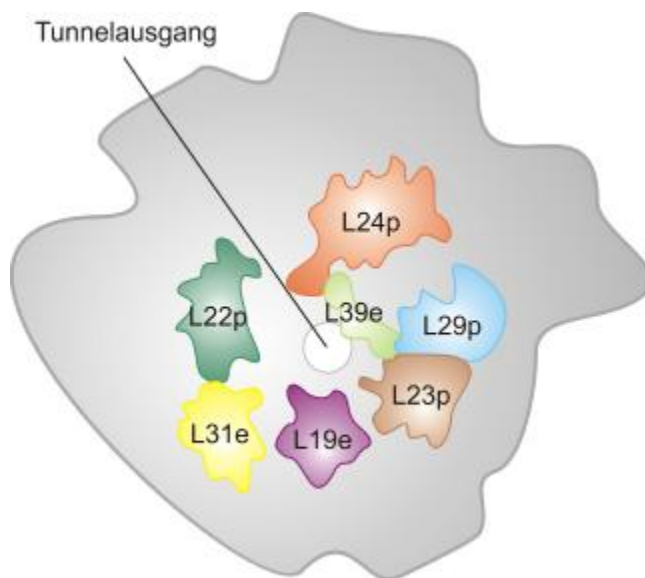


Abbildung 3

Schematische Illustration der großen ribosomalen Untereinheit mit Blick auf den ribosomalen Ausgangstunnel und die umgebenden ribosomalen Proteine. Die Konservierung der ribosomalen Proteine innerhalb der Archaea, Eukarya und Eubacteria ist entsprechend der darunter stehenden Tabelle gekennzeichnet. (Abbildung adaptiert von Wegrzyn and Deuring, 2005)

Ribosomale Proteinfamilie	Archaea	Eukarya		Eubacteria
	<i>H. marismortui</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>E. coli</i>
L22p	rpL22p	rpL17	rpL17	rpL22
L23p	rpL23p	rpL25	rpL23a	rpL23
L24p	rpL24p	rpL26	rpL26	rpL24
L29p	rpL29p	rpL35	rpL35	rpL29
L19e	rpL19e	rpL19	rpL19	-
L31e	rpL31e	rpL31	rpL31	-
L39e	rpL39e	rpL39	rpL39	-

1.2.2 Proteinfaltung und Faltungshelfer in Prokaryonten und Eukaryonten

Die Theorie der Proteinfaltung geht davon aus, dass die Tertiärstruktur eines Proteins vollständig durch die Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, vorgegeben ist und sich selbstständig in ihre dreidimensionale Konformation faltet (Dobson and Karplus, 1999). Da die Synthese der Polypeptidkette am Ribosom vom N- zum C-Terminus erfolgt und der N-terminale Teil der wachsenden Polypeptidkette schon ins Cytosol entlassen wird, während die Translation noch nicht abgeschlossen ist, wird deutlich, dass die Polypeptidkette ihre endgültige Tertiärstruktur erst nach Ende der Synthese und entlassen ins Cytosol einnehmen kann. Daraus ergibt sich die Frage, an welchem Punkt der Translation die Faltung der naszierenden Polypeptidkette beginnt und inwieweit die Faltung kotranslational erfolgen kann.

Ein struktureller Vergleich der großen ribosomalen Untereinheit zwischen den drei Domänen zeigt, dass der ribosomale Ausgangstunnel ein konserviertes Merkmal ist. Er beginnt am Peptidyl-Transferase Zentrum, der Schnittstelle zwischen den ribosomalen Untereinheiten, und erstreckt sich durch die große ribosomale Untereinheit zur cytoplasmatischen Seite. Der Tunnel wird hauptsächlich von rRNA gebildet und ist etwa 100 Å lang und durchschnittlich 15 Å breit. Abhängig von einer gestreckten oder α -helikalen Konformation der naszierenden Polypeptidkette, kann er zwischen 30 und 50 Aminosäuren fassen. Die Existenz dieses Ausgangstunnels in allen Organismen deutet auf dessen Wichtigkeit hin, jedoch ist die genaue Funktion bisher ungeklärt. In zwei Studien mit „angehaltenen“ Ribosomen, die naszierende Polypeptidketten tragen (Woolhead *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2004), wurde gezeigt, dass kurze Segmente der wachsenden Polypeptide möglicherweise schon im Tunnel falten. Woolhead *et al.* wiesen für eine Polypeptidkette mit der Transmembran-Sequenz des VSV Glykoprotein G (Vesikular Stomatitis Virus) die Faltung einer definierten α -helikalen Struktur im Tunnel des eukaryontischen Ribosoms, mit der Methode des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET), nach. Hingegen beobachteten Gilbert *et al.* in einer Kryo-EM Studie die mögliche Ausbildung einer globulären Struktur im Tunnel des bakteriellen Ribosoms. Eine allgemeingültige Aussage zur Funktion des ribosomalen Tunnels bei der kotranslationalen Proteinfaltung lassen diese Ergebnisse nicht zu, verdeutlichen

aber, dass der Tunnel wahrscheinlich kein rigider Ribosomenausgang ist und die Faltung der naszierenden Polypeptidkette durchaus schon im Tunnel beginnen kann.

Abgesehen von der Möglichkeit, dass die Proteinfaltung im ribosomalen Tunnel beginnt, stellt sich weiterhin die Frage inwieweit die Faltung der Polypeptidkette nach Verlassen des Tunnels kotranslational verläuft und ob es bei Pro- und Eukaryonten unterschiedliche Strategien gibt, was sich im Hinblick auf die verschiedenen Expressionsgeschwindigkeiten vermuten lässt. Die Ergebnisse einer Reihe von Studien deuten auf einen kotranslationalen Start der Proteinfaltung hin (Frydman *et al.*, 1999; Kolb *et al.*, 2000; Netzer and Hartl, 1997; Nicola *et al.*, 1999), allerdings ist es schwierig den Anteil an Proteinen zu bestimmen, die kotranslational ihre Faltung beginnen.

Hinsichtlich der Fähigkeit zur kotranslationalen Faltung scheint es jedoch bei Pro- und Eukaryonten fundamentale Unterschiede zu geben. In drei verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass Bakterien eukaryontische Multi-Domänen-Proteine nur äußerst ineffizient falten können. Es wurde daher postuliert, dass es in Pro- und Eukaryonten unterschiedliche Faltungsmechanismen geben muss, da die Faltung von Multi-Domänen-Proteinen in Eukaryonten hauptsächlich kotranslational erfolgt, wohingegen Bakterien die Fähigkeit zu einer effizienten kotranslationalen Faltung teilweise fehlt (Agashe *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Netzer and Hartl, 1998). Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass die Faltung von großen, modular aufgebauten Multi-Domänen-Proteinen bevorzugt sequentiell und kotranslational verläuft, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung aufgrund unspezifischer intra- und intermolekularer Wechselwirkungen im Cytosol minimiert wird (Netzer and Hartl, 1997). Darüber hinaus zeigten *in vitro* Versuche zur Rückfaltung von Proteinen deutliche Unterschiede in der Faltungsgeschwindigkeit von homologen Proteinen aus Pro- und Eukaryonten, was zusätzlich für einen unterschiedlichen Faltungsmechanismus spricht (Widmann and Christen, 2000). Es ist allerdings unklar, inwiefern die Aussagen für den Großteil der bakteriellen Multi-Domänen-Proteine gelten. Die Unterschiede im Netzwerk der Faltungshelfer im Vergleich von Pro- und Eukaryonten liegen darin, dass eine effiziente kotranslationale Proteinfaltung gegenüber der posttranslationalen andere Ansprüche an die beteiligten Faktoren stellt. Die Faltung einer größeren Anzahl an komplexen,

modularen Proteinen in Eukaryonten lässt vermuten, dass ebenfalls ein vielfältigeres Repertoire an spezialisierten Faktoren erforderlich ist. Es gibt erste Hinweise darauf, dass die Primärstruktur der naszierenden Polypeptidkette vorgibt, welche Faltungshelfer benötigt und rekrutiert werden.

1.2.3 Ribosomen-assoziierte Chaperone am Tunnelausgang

Die Ribosomen-assoziierten Faltungshelfer haben während der Biosynthese als erste Zugang zu neu synthetisierten Proteinen. Daher wird angenommen, dass diese Chaperone eventuell eine wichtige Funktion dabei übernehmen, die Polypeptide auf den korrekten Faltungsweg des Netzwerkes zu führen. Im Vergleich der Ribosomen-assoziierten Chaperone zwischen Prokaryonten und Eukaryonten existieren bemerkenswerterweise keine strukturellen oder Sequenz-Homologien. Dennoch zeigen sie funktionelle Ähnlichkeiten, wie sie mit dem Ribosom und der naszierenden Kette interagieren (siehe Abbildung 4 für eine Übersicht der unterschiedlichen Ribosomen-assoziierten Chaperone in Eubakterien und Eukaryonten). Alle diese Faltungshelfer assoziieren in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit dem Ribosom und lassen sich zu einer Vielzahl von verschiedenen naszierenden Polypeptidketten quervernetzen (Hesterkamp *et al.*, 1996; Pfund *et al.*, 1998; Stoller *et al.*, 1995; Wiedmann *et al.*, 1994). Basierend auf der Beobachtung einer erhöhten Salzresistenz der Chaperon-Ribosom Bindung in Gegenwart der naszierenden Polypeptidkette wird angenommen, dass die Stabilität der Assoziation mit Ribosomen abhängig von der Gegenwart einer Polypeptidkette ist.

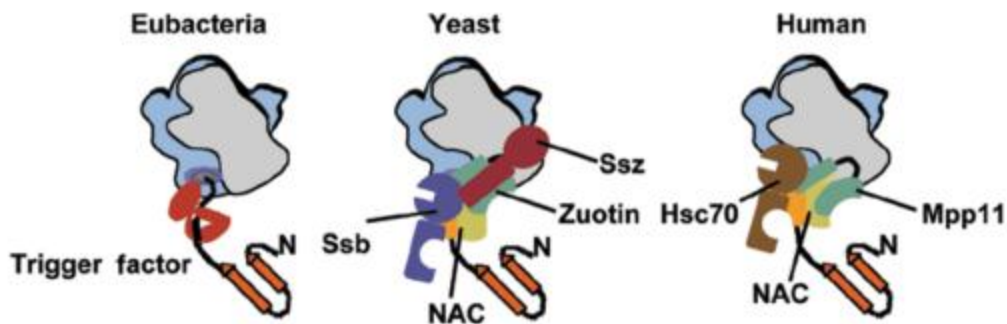


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Ribosomen-assoziierten Faktoren am Tunnelausgang im Vergleich von Eubacteria und Eukarya. (Abbildung adaptiert von Bukau, 2005)

Trigger Faktor – Ribosomen-assoziiertes Chaperon in Eubakterien

Einer der am besten untersuchten Ribosomen-assoziierten Faktoren ist der Trigger Faktor (TF) aus *Escherichia coli*. Er wurde ursprünglich von Crooke und Wickner als cytosolischer Faktor, welcher die Translokation von pro-OmpA fördert, entdeckt (Crooke and Wickner, 1987). Später wurde gezeigt, dass TF als Ribosomen-assoziiertes Chaperon die naszierende Polypeptidkette in Eubakterien kontaktiert (Hesterkamp *et al.*, 1996; Stoller *et al.*, 1995; Valent *et al.*, 1995). Die Deletion von TF zeigt erstaunlicherweise weder einen offensichtlichen Phänotyp noch eine verstärkte Fehlfaltung von neu synthetisierten Proteinen (Deuerling *et al.*, 1999; Teter *et al.*, 1999). Die gleichzeitige Deletion des cytosolischen Hsp70 Chaperon DnaK führt jedoch zu einer synthetischen Letalität bei Wachstums-Temperaturen oberhalb von 30°C. Weitere Studien zeigten, dass *in vivo* die Funktion von TF sich teilweise mit den cytosolischen Chaperon Systemen DnaK/DnaJ und GroEL/GroES überlagert, welche jedoch im Gegensatz zu TF ATP-abhängig die Proteinfaltung aktiv fördern (Maier *et al.*, 2001; Deuerling *et al.*, 2003; Ullers *et al.*, 2004; Vorderwülbecke *et al.*, 2004; Genevoux *et al.*, 2004).

TF aus *E. coli* setzt sich aus drei Domänen zusammen. Die N-terminale Domäne ist erforderlich für die korrekte Bindung ans Ribosom (Hesterkamp *et al.*, 1997), ohne die TF nicht mit der naszierenden Kette interagieren kann. In biochemischen Studien wurde gezeigt, dass TF über eine hoch konservierte Sequenz in dieser Domäne an das ribosomale Protein L23p bindet (Kramer *et al.*, 2002), welches zu den in allen Organismen konservierten Proteinen um den Tunnelausgang des Ribosoms gehört. Die zweite Domäne zeigt *in vitro* eine Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase Aktivität. Die Funktion dieser PPlase Domäne bei der Proteinfaltung *in vivo* ist jedoch unklar, da weder Punktmutationen noch die Deletion der gesamten Domäne eine Veränderung der Aktivität des TF zeigen (Genevoux *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 2004a). Die C-terminale Domäne scheint an der Interaktion mit der wachsenden Polypeptidkette beteiligt zu sein. Untersuchungen, bei denen die Domäne deletiert wurde, zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine verringerte Chaperon Aktivität (Zarnt *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 2004b).

Die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur von TF aus *E. coli* zeigt eine ungewöhnliche gestreckte Konformation des Moleküls (Abbildung 5). Bemerk-

kenswert ist eine große hydrophobe Tasche, die von der C-terminalen Domäne gebildet wird und sich von der N-terminalen Ribosomen-Bindungs Domäne bis fast zur PPlase Domäne erstreckt. Die nach Innen exponierten hydrophoben Seitenketten bieten vielfältige Kontaktstellen für ungefaltete Polypeptidketten (Ferbitz *et al.*, 2004).

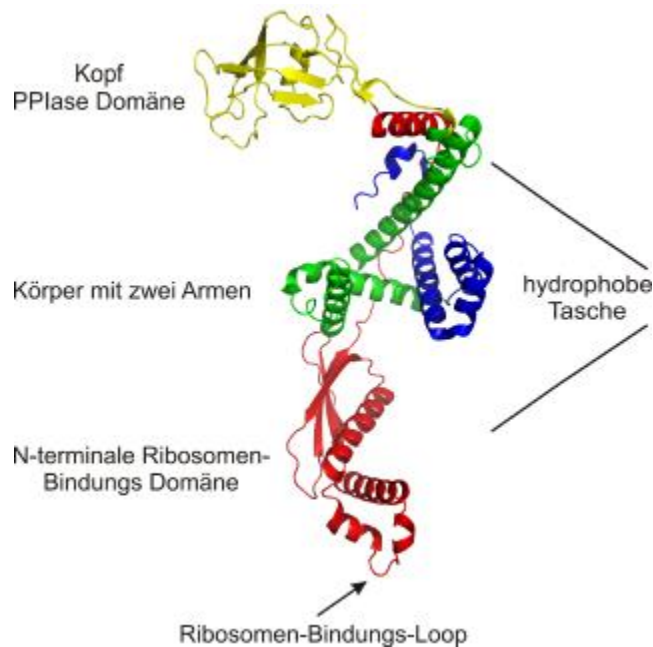


Abbildung 5 Kristallstruktur des TF mit Blick auf die hydrophobe Tasche. Die Ribosomen-Bindungs Domäne ist in Rot, die PPlase Domäne in Gelb und der Körper mit den zwei Armen in Grün bzw. Blau illustriert. (Darstellung adaptiert von Ferbitz *et al.*, 2004)

Eukaryontische Ribosomen-assoziierte Chaperone

Der in diesem Themengebiet am besten charakterisierte eukaryontische Organismus ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. In Hefe findet man zwei verschiedene Ribosomen-assoziierte Systeme, die an der kotranslationalen Proteinfaltung beteiligt sein könnten: die Ssb/Ssz/Zuotin Triade und den Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC).

Das erste System ist ein Hsp70/Hsp40 Chaperon System und umfasst zwei Hsp70 Chaperone (Ssb und Ssz) und das Hsp40 Co-Chaperon von Ssz (Zuotin). Ssz und Zuotin formen den Ribosome-Associated Complex (RAC) und bilden einen stabilen heterodimeren Komplex, was ungewöhnlich gegenüber der normalerweise kurzzeitigen Interaktion zwischen Hsp70 und Hsp40 Chaperonen ist. RAC wurde ursprünglich *in vitro* als Faktor identifiziert, der die Translokation von Polypeptiden in Mitochondrien stimuliert. *In vivo* zeigte die Deletion

von RAC aber keine Mitochondrien-spezifischen Defekte (Gautschi *et al.*, 2001). RAC assoziiert über Zuotin mit dem Ribosom und bildet zusammen mit dem zweiten Hsp70 Ssb die sogenannte Chaperon Triade. Der Kontakt zur naszierenden Kette geht dabei von Ssb aus (Gautschi *et al.*, 2002). Die Inaktivierung dieser Chaperon Triade durch Deletion von einem oder allen drei Proteinen führt in Hefe zu drei Phänotypen: Salzsensitivität, Kältesensitivität und einer Hypersensitivität gegenüber Aminoglykosiden wie Paromomycin, welches die ribosomale Proteinsynthese blockiert (Yan *et al.*, 1998; Gautschi *et al.*, 2001; Gautschi *et al.*, 2002; Hundley *et al.*, 2002). Bisher sind jedoch die spezifische Funktion der Ribosomen-assoziierten Triade und die molekularen Grundlagen für die beobachteten Phänotypen der Deletionsmutanten nicht geklärt. Es ist anzunehmen, dass Ssb, Ssz und Zuotin in einem ATP-abhängigen Mechanismus die Faltung der naszierenden Polypeptidkette fördern. Es wurden jedoch einige interessante Eigenschaften beobachtet, die diese Chaperon Triade durchaus einzigartig machen. Im klassischen Hsp70/40 System stimuliert das Co-Chaperon Hsp40 durch kurzzeitige Interaktion der J-Domäne mit der ATPase-Domäne des Hsp70 dessen ATP-Hydrolyse (Kelley, 1999). Huang *et al.* zeigten in einer neueren Studie, dass Ssz die Aktivität von Zuotin reguliert, unabhängig von der eigenen ATPase-Aktivität, wodurch Zuotin spezifisch und effizient die ATPase-Aktivität von Ssb stimuliert (Huang *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass Ssb nicht wie viele andere Chaperone durch zellulären Stress induziert wird, sondern die Expression zusammen mit der Regulation der Gene für ribosomale Proteine koordiniert ist (Lopez *et al.*, 1999). Ebenso zeigte eine neuere Arbeit, dass Ssz und Zuotin ebenfalls nicht durch zellulären Stress induziert werden (Albanèse *et al.*, 2006). Außerdem scheint die Chaperon Triade erforderlich für die korrekte Translation zu sein. Rakwalska und Rospert beobachteten in *in vitro* und *in vivo* Studien für die Deletionen von RAC und Ssb einen Defekt in der Termination der Translation und eine geringe Zunahme beim Fehleinbau von Aminosäuren in die naszierende Polypeptidkette. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine Fehlfaltung von Proteinen, die an der Translation beteiligt sind, zurückzuführen, obwohl in der Abwesenheit von RAC und Ssb bisher keine erhöhte intrazelluläre Proteinaggregation festgestellt wurde (Rakwalska and Rospert, 2004). Diese Ergeb-

nisse deuten auf eine speziellere, über die klassische ATP-abhängige Chaperon-Aktivität hinausgehende, Funktion der Chaperon Triade am Ribosom hin.

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass das Vorkommen des Ssb/Ssz/Zuotin Systems auf Pilze beschränkt sei. In zwei kürzlich veröffentlichten Arbeiten von Hundley *et al.* und Otto *et al.* wurde MPP11 als humanes Zuotin Homolog identifiziert, welches ebenso mit Ribosomen assoziiert ist und den Phänotyp der Deletion von Zuotin in Hefe komplementiert. Auch MPP11 bildet einen stabilen Komplex mit Hsp70L1, dem humanen Ssz Homolog (Hundley *et al.*, 2005; Otto *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse belegen, dass RAC von Hefe bis zu den Säugetieren konserviert ist. Interessanter Weise benötigt MPP11 kein weiteres Ribosomen-assoziiertes Hsp70, welches das Homolog zu Ssb wäre, sondern führt cytosolisches Hsp70 an die naszierende Polypeptidkette heran (Otto *et al.*, 2005).

Trotz der Abweichungen in Bezug auf Ssb zeigen die Ergebnisse der Arbeiten am Hefe und am humanen RAC, dass dieses Ribosomen-assoziierte Chaperon System in Eukaryonten hoch konserviert ist und verdeutlicht die Notwendigkeit einer kotranslationalen ATP-regulierten Faltungskontrolle am Ribosom in direkter Nähe des ribosomalen Tunnelausgangs. In Eukaryonten assoziiert außer diesem spezialisierten Hsp70/40 System noch NAC mit Ribosomen und kontaktiert die naszierende Polypeptidkette (für Details zu NAC siehe Abschnitt 1.3).

Das Repertoire an Ribosomen-assoziierten Faltungshelfern ist damit in Prokaryonten und Eukaryonten sehr unterschiedlich. In Prokaryonten gibt es nur den Trigger Faktor und es scheint, dass ein Großteil der Proteine zur korrekten Faltung kein ATP-reguliertes Hsp70/Hsp40 System benötigen. In Eukaryonten gibt es hingegen NAC, welches weder eine Homologie zum TF zeigt, noch Chaperon-ähnliche Aktivität hat und funktionell bis jetzt wenig entschlüsselt ist. Außerdem gibt es das spezialisierte Ribosomen-assoziierte Hsp70/Hsp40 System RAC/Ssb. Dieses komplexere Netzwerk von Ribosomen-assoziierten Faktoren hängt mit der wahrscheinlich komplexeren Faltung vieler eukaryontischer Multi-Domänen-Proteine zusammen, deren Faltung kotranslational eingeleitet wird und eine größere Vielfalt an spezialisierten Chaperonen sowohl ko- als auch posttranslational benötigt.

1.3 Nascent Polypeptide-Associated Complex – NAC

1.3.1 NAC – heterodimerer Proteinkomplex am Ribosom

NAC wurde ursprünglich mit einer *Photo-Cross-linking* Technik, mit der auch SRP54 entdeckt wurde, als heterodimerer Proteinkomplex identifiziert, der mit naszierenden Polypeptiden am Ribosom interagiert. Hierbei werden unter Verwendung von mRNAs, die kein Stopp-Codon enthalten, stabile *Ribosome Nascent Chain Complexes* (RNCs) produziert, bei denen die Polypeptidkette als Peptidyl-tRNA am Ribosom gebunden bleibt. Zusätzlich wird ein photoaktivierbares Lysinanalogon während der *in vitro* Translation an Positionen die für Lysin kodieren in die wachsende Polypeptidkette eingebaut. Die Translation in Gegenwart von L-[³⁵S]-Methionin ermöglicht die Detektion der Polypeptidkette und quervernetzter Proteinfaktoren anhand der Radioaktivität (Görlich *et al.*, 1991; Wiedmann *et al.*, 1994). Durch Belichten der Probe entsteht ein hochreaktives Carben, das eine kovalente Bindung zu benachbarten Molekülen ausbilden kann, die über die Radioaktivität der Polypeptidkette nachgewiesen wird. Mit Hilfe dieser Technik wurde NAC erstmals aus Rinderhirn gereinigt und als heterodimerer Komplex aus einer α - und β -Untereinheit charakterisiert (Wiedmann *et al.*, 1994).

Ein Vergleich der Sequenzen von α - und β -NAC mit der Datenbank ergab, dass die β -Untereinheit identisch zu BTF3 (Basic Transcription Factor 3) ist, einem schon früher in HeLa-Zellen beschriebenen Protein. BTF3 bildete danach einen Komplex mit RNA-Polymerase II und sollte ein essentieller Faktor bei der Initiation der RNA-Polymerase II abhängigen Transkription sein (Moncollin *et al.*, 1986; Zheng *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 1990). Es zeigte sich, 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 spätere Studie zeigte allerdings, dass BTF3 nicht für die Initiation der Transkription notwendig ist, wodurch eine Funktion von NAC als Transkriptions-Aktivator als fraglich gilt (Moncollin *et al.*, 1992).

Das NAC Homolog in Hefe wurde zunächst als stabilisierender Faktor entdeckt, der an der Bindung des Transkriptionsaktivators Gal4p an DNA beteiligt sein sollte. Die identifizierten Untereinheiten wurden als EGD1 und

EGD2 (Enhancer of Gal4 DNA binding) bezeichnet, wobei EGD1 das β -NAC und EGD2 das α -NAC Homolog ist (Parthun *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1995). In einer späteren Studie konnte ein zweites β -NAC Homolog aus Hefe identifiziert werden. BTT1 (Basic Transcription Factor Three) zeigte eine 90 %ige Übereinstimmung mit EGD1 (Hu and Ronne, 1994). Eine Funktion in der Regulation der Transkription konnte für EGD1 und BTT1 nie festgestellt werden, allerdings bewirkte die Deletion beider β -NAC Homologe eine signifikante Steigerung des Expressionslevels einer Reihe von konstitutiv regulierten Genen (Hu and Ronne, 1994). Die Ursache für diese Ergebnisse ist bis jetzt nicht genau verstanden. Eine mögliche Erklärung liefern aber die folgenden Beobachtungen. Bei Hefe bilden beide β -NAC Homologe (sowohl EGD1 als auch BTT1) in vivo einen Komplex mit EGD2 (α -NAC). Bei einer Deletion beider β -NAC Gene zeigen die Zellen einen schwachen Wachstumsdefekt bei 37°C. Die Temperatursensitivität wird jedoch durch die zusätzliche Deletion von *egd2* wieder aufgehoben (Reimann *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse deuten eher auf einen negativen Effekt von EGD2 in Abwesenheit von EGD1 hin, als auf eine regulatorische Funktion der β -NAC Untereinheiten (siehe auch 1.3.3).

In späteren Studien konnte allerdings nachgewiesen werden, dass in eukaryontischen Zellen 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 3 Übersicht der 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. skNAC ist eine spezifisch in Muskelgewebe vorkommende *Splicing* Variante von α -NAC und wurde erstmals von Yotov und St-Arnaud beschrieben (Yotov and St-Arnaud, 1996a; Yotov and St-Arnaud, 1996b).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Säuger
aNAC		
α NAC	Egd2p (Enhancer of Gal4 DNA binding)	α NAC (NACA) skNAC (<i>Splicing</i> Variante von α NAC)
βNAC		
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 (Basic Transcription Factor Three)	

Der identifizierte Ribosomen-assoziierte Komplex ist beim Menschen ein 41,1 kDa großes Heterodimer, bestehend aus der 23,4 kDa großen α -Untereinheit und der 17,7 kDa großen β -Untereinheit und entspricht einem Komplex aus den in Tabelle 3 beschriebenen α -NAC und β_1 -NAC. In der Hefe hat der heterodimere Komplex eine Größe von nur 35,7 kDa und wird aus EGD2 (18,7 kDa) und EGD1 (17,0 kDa) gebildet. Die zelluläre Konzentration von BTT1 ist 100-mal geringer als die von EGD1 (George *et al.*, 1998; Reimann *et al.*, 1999).

Eine Sequenzanalyse zeigt, dass beide NAC-Untereinheiten bei Eukaryonten von Einzellern bis hin zu Säugern phylogenetisch hoch konserviert sind und auf Aminosäuresequenzebene keinerlei Homologie zu anderen Proteinen aufweisen. Der Sequenzvergleich von eukaryontischen NAC Homologen untereinander definiert die „NAC-Domäne“ als den am höchsten konservierten Bereich der NAC Gene (Conserved Domains Database, Marchler-Bauer *et al.*, 2002). Interessanterweise existiert diese einzigartige, hoch konservierte NAC-Domäne nur in NAC-Proteinen und zwar gleichermaßen in α -NAC wie auch in β -NAC.

Abbildung 6 zeigt einen Sequenzvergleich von α - bzw. β -NAC und die entsprechende konservierte Domänenstruktur. Zusätzlich zu der NAC-Domäne weisen alle α -NAC Homologe eine C-terminale konservierte Domäne auf, die im Sequenzvergleich ebenso wie strukturell eine hohe Homologie zu UBA-Domänen zeigt (*Ubiquitin-Associated Domain*). Innerhalb der NAC Homologe ist der N-Terminus der verschiedenen β -NAC Proteine auffallend hoch konserviert, wohingegen der N-Terminus von α -NAC eine sehr hohe Variation aufweist. Im Vergleich der α -NAC Homologen fällt besonders der kürzere N-Terminus bei niederen Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Candida albicans* auf. Hingegen weist der N-Terminus von α -NAC in höheren Vielzellern eine hoch konservierte Aminosäuresequenz auf.

Bemerkenswerterweise gibt es in Eubakterien keine NAC Homologe. Hingegen wurde in einer vergleichenden Studie von komplett sequenzierten Archaea Genomen das Vorhandensein eines α -NAC Homologs (aeNAC) beschrieben (Makarova *et al.*, 1999; Macario and Conway De Macario, 2001). Aktuellere Sequenzvergleiche zeigen, dass es in allen bisher sequenzierten Archaea Genomen ein hoch konserviertes aeNAC gibt, welches die gleiche konservierte Domänenstruktur wie α -NAC aufweist.

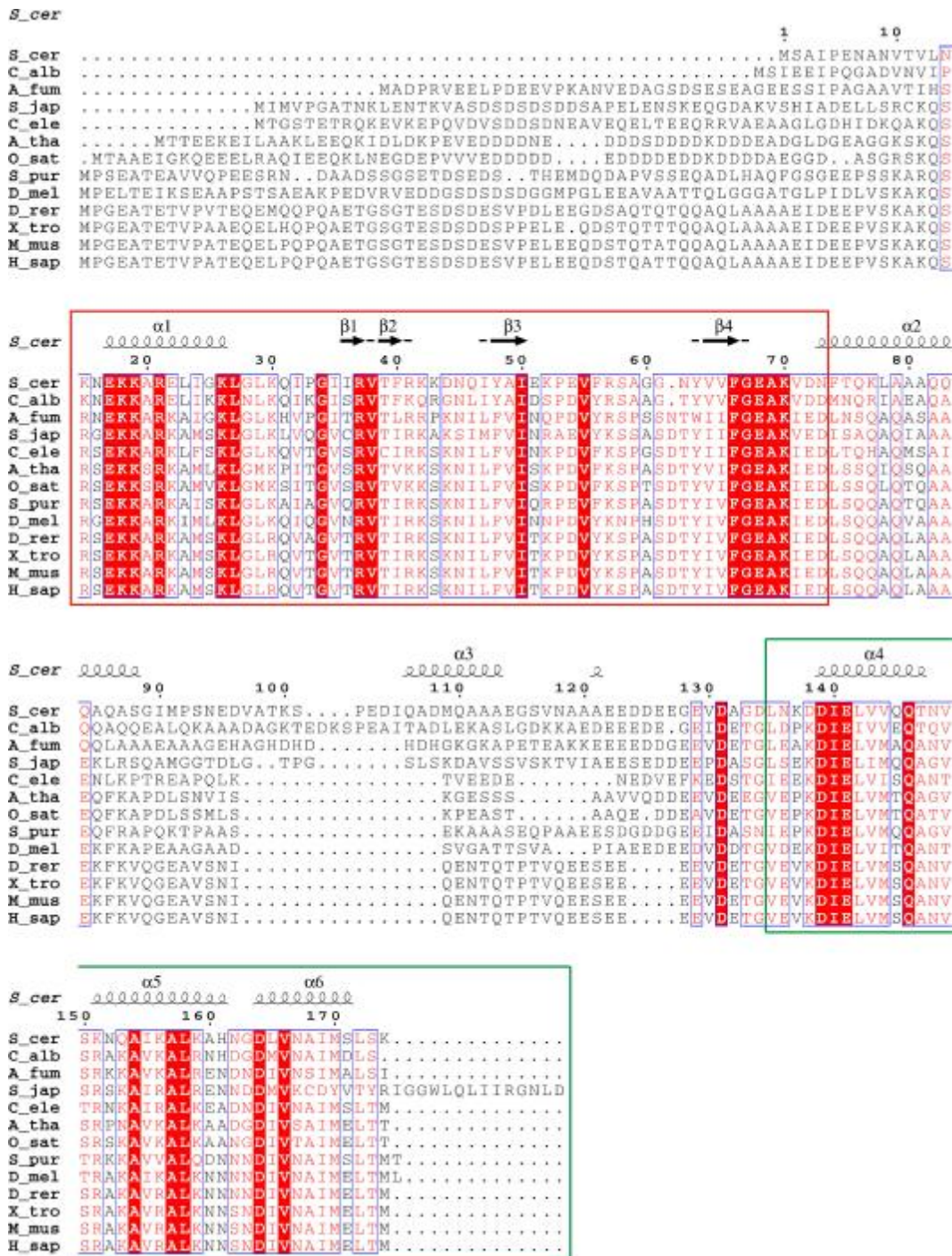


Abbildung 6A Sequenzvergleich der α -NAC Homologen: *S_cer*: *Saccharomyces cerevisiae*, # AAS56614; *C_alb*: *Candida albicans*, # XP_723074; *A_fum*: *Aspergillus fumigatus*, # XP_747695; *S_jap*: *Schistosoma japonicum*, # AAW26771; *C_ele*: *Caenorhabditis elegans*, # Q86S66; *A_tha*: *Arabidopsis thaliana*, # Q9LHG9; *O_sat*: *Oryza sativa*, # BAC78570; *S_pur*: *Strongylocentrotus purpuratus*, # XP_781778; *D_mel*: *Drosophila melanogaster*, # Q94518; *D_rer*: *Danio rerio*, # Q8JIU7; *X_tro*: *Xenopus tropicalis*, # Q68F90; *M_mus*: *Mus musculus*, # Q60817; *H_sap*: *Homo sapiens*, # CAA56869.

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 (rot bzw. grün).

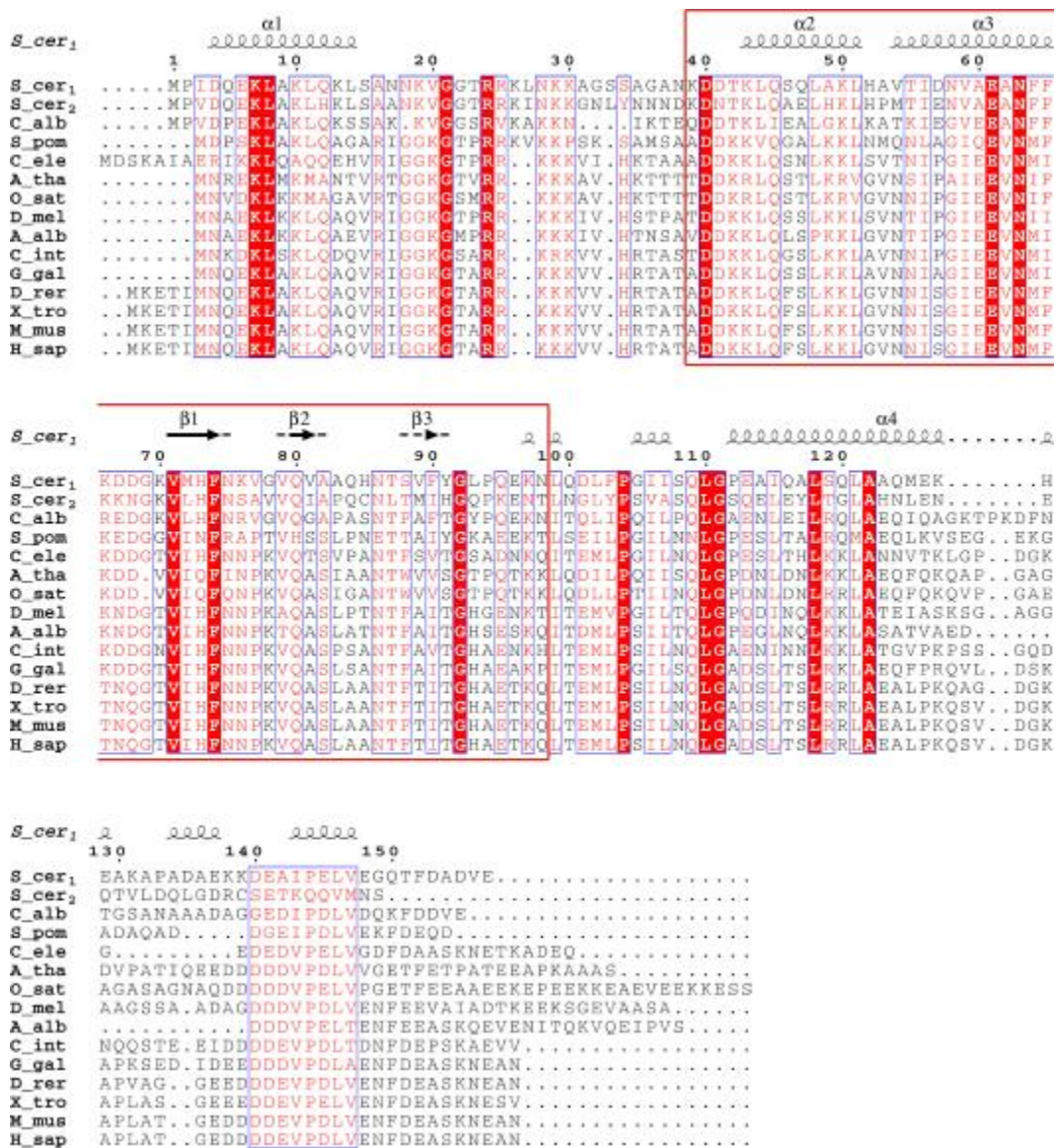


Abbildung 6B Sequenzvergleich der β -NAC Homologen: S_cer₁: *Saccharomyces cerevisiae* EGD1, # CAA55371; S_cer₂: *Saccharomyces cerevisiae* BTT1, # P40314; C_alb: *Candida albicans*, # EAK93932; S_pom: *Schizosaccharomyces pombe*, # CAB11717; C_ele: *Caenorhabditis elegans*, # Q18885; A_tha: *Arabidopsis thaliana*, # CAB56149, O_sat: *Oryza sativa*, # AAO72645; D_mel: *Drosophila melanogaster*, # AAF06076; A_alb: *Aedes albopictus*, # AAV90705; C_int: *Ciona intestinalis*, # BAE06336; G_gal: *Gallus gallus*, # NP_001026456; D_rer: *Danio rerio*, # XP_692591; X_tro: *Xenopus tropicalis*, # NP_001016697; M_mus: *Mus musculus*, # AAH80837; H_sap: *Homo sapiens*, # CAA52200.

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 ist mit einem roten Kasten umrahmt. Die Sequenzvergleiche wurde mit dem Programm CLUSTAL W 1.83 (Thompson *et al.*, 1994) berechnet und mit ESPript 2.2 (Gouet *et al.*, 1999) unter Verwendung der Matrix BLOSUM62 bearbeitet.

yNAC (*S. cerevisiae*)EGD2 (α -NAC)EGD1 (β -NAC)

Abbildung 6C Schematische Illustration der konservierten Domänenstruktur von NAC aus *Saccharomyces cerevisiae*.

1.3.2 Funktion des heterodimeren NAC am Ribosom

α - und β -NAC bilden einen heterodimeren Komplex. Monomere NAC-Untereinheiten wurden bisher nicht nachgewiesen, was nicht ausschließt, dass sie in nicht nachweisbaren Konzentrationen existieren können (Beatrix *et al.*, 2000; Reimann *et al.*, 1999). In Säugern wird der α/β -Komplex von beiden *Splicing* Varianten der β -Untereinheit gebildet, wobei β_2 -NAC in geringeren Konzentrationen vorkommt. Obwohl der α/β_2 -Komplex *in vitro* noch nicht näher charakterisiert wurde, wird angenommen, dass er vergleichbare Eigenschaften zum α/β_1 -Komplex hat. In Hefe findet man primär den aus EGD2 und EGD1 gebildeten Komplex, bedingt durch die 100-mal geringere Konzentration des β -NAC Homologs BTT1 (Reimann *et al.*, 1999). Der NAC Komplex liegt in Hefe in einem ungefähr äquimolaren Verhältnis zu Ribosomen vor und ist nahezu vollständig Ribosomen-assoziiert. In Säugern hingegen variiert die NAC Konzentration in den unterschiedlichen Geweben und liegt in einem Bereich von 3 μM bis 10 μM gegenüber einer durchschnittlichen Ribosomen Konzentration von $\sim 1 \mu\text{M}$ (Möller *et al.*, 1998a; Raden and Gilmore, 1998; Wang *et al.*, 1995).

Basierend auf *Photo-Cross-linking* Studien wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass beide Untereinheiten des NAC Komplexes zu kurzen Ribosomen-gebundenen naszierenden Polypeptidketten verknüpft werden. Wenn die Polypeptidketten aber zuvor vom Ribosom losgelöst werden (z.B. durch Puromycin-Behandlung), interagiert NAC nicht mehr mit ihnen (Beatrix *et al.*, 2000; Raden and Gilmore, 1998; Reimann *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1995; Wiedmann *et al.*, 1994). Die Quervernetzungsexperimente zeigten, dass NAC ohne erkennbare Sequenzspezifität mit naszierenden Polypeptiden in einer Entfernung von 17 bis 100 Aminosäuren vom Peptidyl-Transferase-Zentrum (PTC)

des Ribosoms interagieren kann. Eine Affinität von NAC zu ungefalteten Proteinen in Abwesenheit des Ribosoms wurde jedoch nicht beobachtet (Wiedmann *et al.*, 1994). Die Quervernetzung von NAC zu Ribosomen-gebundenen Peptiden in einer Entfernung von gerade mal 17 Aminosäuren zum PTC stellt einen deutlichen Unterschied zu anderen Ribosomen-assoziierten Faktoren dar, wie dem TF oder Ssb die erst mit Polypeptidketten ab 30 Aminosäuren verknüpft werden können (Hesterkamp *et al.*, 1996; Pfund *et al.*, 1998; Stoller *et al.*, 1995). Die heute bekannten Kristallstrukturen der großen ribosomalen Untereinheit zeigen einen Tunnel der am Peptidyl-Transferase Zentrum beginnt, 100 Å lang ist und einen Durchmesser von durchschnittlich 15 Å hat. Je nachdem ob die wachsende Polypeptidkette in diesem Ausgangstunnel eine helikale Konformation hat oder ausgestreckt vorliegt, kann er zwischen 30 und 50 Aminosäurereste fassen (siehe auch 1.2.2). Diesen Ergebnissen nach, kann der heterodimere NAC Komplex im Gegensatz zu anderen Ribosomen-assoziierten Faktoren schon im ribosomalen Tunnel mit der neu synthetisierten Polypeptidkette interagieren.

Für die stabile, salzresistente Interaktion von NAC mit dem Ribosom ist die β -Untereinheit erforderlich. So wurde gezeigt, dass β -NAC alleine mit dem Ribosom assoziiert, wohingegen α -NAC zwar noch mit der naszierenden Polypeptidkette interagiert, seine Affinität zum Ribosom aber nicht stark genug ist, um sie in Sedimentationsexperimenten nachzuweisen (Beatrix *et al.*, 2000). Franke *et al.* zeigten in der Hefe *S. cerevisiae*, dass die Deletion der ersten 11 Aminosäuren der β -Untereinheit unter physiologischen Bedingungen zu einem Verlust der Bindung des NAC-Komplexes ans Ribosom führt (Franke *et al.*, 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden für humanes NAC gefunden (persönliche Mitteilung B. Beatrix). In zwei erst kürzlich veröffentlichten Studien wurden Ergebnisse präsentiert, die auf eine Assoziation von Hefe NAC mit dem ribosomalen Protein L23 (bzw. L25 in Hefe) hindeuten (Grallath *et al.*, 2006; Wegrzyn *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse wurden jedoch zum Teil mit einem heterologen Versuchssystem erzielt, bei dem Hefe NAC zunächst mit Ribosomen aus *E. coli* getestet wurde. Das verdeutlicht zwar, dass der NAC-Komplex in unmittelbarer Nähe des ribosomalen Ausgangstunnels positioniert ist, lässt aber noch keine Aussage zu, welcher Bereich von NAC bzw. der einzelnen Untereinheiten mit L23 assoziiert.

Aufgrund seiner Lokalisation am ribosomalen Ausgangstunnel und seiner Interaktion mit der naszierenden Polypeptidkette wird NAC häufig im Zusammenhang mit Chaperonen genannt. Bisher wurde jedoch keine Affinität des NAC-Komplexes zu ungefalteten Polypeptiden in Abwesenheit des Ribosoms beobachtet (Wiedmann *et al.*, 1994). In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit von Grallath *et al.* wurde jedoch eine Chaperon-ähnliche Aktivität für NAC postuliert. So konnten sie in ihrer Studie zeigen, dass NAC in einem fünf- bis zehnfachen molaren Überschuss die Aggregation von denaturierter Rhodanase verhindern kann. Im Vergleich zu der Positivkontrolle GroEL betrug die Effizienz von NAC jedoch nur 20 %. Hierdurch stellt sich die Frage, inwieweit NAC wirklich eine spezifische Chaperon-ähnliche Aktivität besitzt oder die Ergebnisse auf eine unspezifische Interaktion mit hydrophoben Oberflächen zurückzuführen sind.

Bereits kurz nach ihrer Entdeckung von NAC postulierte die Gruppe von M. Wiedmann aufgrund von Flotationsversuchen mit mikrosomalen Membranen und RNCs, dass NAC neben SRP (Signal Recognition Particle) als zweiter cytosolischer Faktor für die korrekte Zielsteuerung von Proteinen zum endoplasmatischen Retikulum (ER) erforderlich ist (Wiedmann *et al.*, 1994; Lauring *et al.*, 1995b).

Das Translokon fungiert nicht nur als Kanal in der ER-Membran, sondern bindet auch mit hoher Affinität Ribosomen (Potter *et al.*, 2001; Görlich *et al.*, 1992; Kalies *et al.*, 1994). Im Zusammenhang mit der Proteintranslokation ins ER stellt sich daher die Frage, wie nicht-translatierende Ribosomen oder Ribosomen, die cytosolische Proteine translatieren, mit RNCs, die eine Signalsequenz exponieren, um die Bindung an das Translokon konkurrieren und wie eine unspezifische Translokation von cytosolischen Proteinen ins Lumen des ERs verhindert wird. Die Wiedmann-Gruppe zeigte, dass NAC *in vitro* die Bindung von RNCs, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit einer Signalsequenz an der Polypeptidkette, an das Translokon verhindert und darüber hinaus eine unspezifische Translokation (Lauring *et al.*, 1995a; Lauring *et al.*, 1995b; Möller *et al.*, 1998b). Auf der Grundlage dieser Studien postulierten sie das M-site Modell, nach dem NAC die Membran-Bindungsstelle (M-site) des Ribosoms blockiert, wodurch die Bindung an das Translokon verhindert wird (siehe Abbildung 7 für Details des M-site Modells). Der Mecha-

nismus, wie NAC die SRP abhängige Translokation von Proteinen ins ER beeinflusst, ist noch nicht bekannt, und es fehlen auch *in vivo* Studien, die die Funktion von NAC bei der Translokation bestätigen.

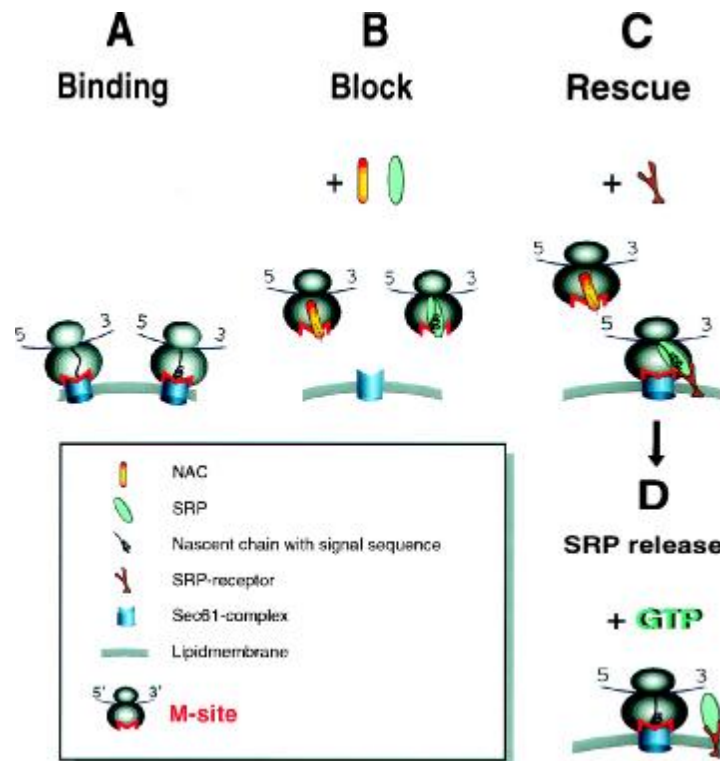


Abbildung 7 Modell zur Regulation der Bindung ans Translokon. **A** Naszierende Polypeptide werden in Abwesenheit von NAC und SRP unabhängig von einer Signalsequenz mit geringer Effizienz ins ER transloziert. **B** Sowohl NAC als auch SRP können diese unspezifische Bindung ans Translokon verhindern. **C** Die GTP-abhängige Bindung von SRP-RNCs an den SRP-Rezeptor **D** führt zur spezifischen Translokation von Proteinen mit Signalsequenz. (Abbildung adaptiert von Möller *et al.*, 1998b)

Die genaue *in vivo* Funktion von NAC als Ribosomen-assoziiertes Faktor bleibt rätselhaft. Man kann jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen, dass NAC naszierende Polypeptidketten bindet und dadurch in der Lage ist, sie vor unspezifischen Interaktionen abzusichern und Aggregation zu verhindern. Diese Überlegung wird durch die Ergebnisse aus kontrollierten Proteolyse-Versuchen gestützt, in denen gezeigt wurde, dass NAC kurze Ribosomen-gebundene Polypeptidketten vor dem Angriff durch eine Protease schützt (Lauring *et al.*, 1995c; Wang *et al.*, 1995). Eine attraktive Hypothese ist, dass, wie ursprünglich vorgeschlagen, das Ribosomen-assoziierte 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 and

Lill, 1994). Es gibt jedoch bis jetzt wenig Anhaltspunkte, die eine solche Funktion des heterodimeren NAC am Ribosom bestätigen und die Formulierung eines Modells vom Mechanismus ermöglichen.

1.3.3 Funktion der individuellen NAC Untereinheiten

Die essentielle Bedeutung von NAC in höheren Eukaryonten wird durch mehrere Studien deutlich, in denen die Deletion bzw. Mutation des β -NAC Gens in Mäusen, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* einen embryonal letalen Phänotyp zeigten (Deng and Behringer, 1995; Markesich *et al.*, 2000). In weiteren unabhängigen Studien wurde außerdem beobachtet, dass die intrazelluläre Konzentration der einzelnen NAC-Untereinheiten im Zusammenhang mit einer Reihe von Krankheiten wie Alzheimer, Trisomie 21, AIDS und bösartigen Gehirntumoren stark verändert ist (Kim *et al.*, 2002; Kroes *et al.*, 2000; Scheuring *et al.*, 1998). In einer Untersuchung von Bloss *et al.* wurde darüber hinaus für β -NAC eine Funktion als Apoptose Inhibitor identifiziert. Hierbei führte der Verlust von β -NAC durch RNA Interferenz (RNAi) in *C. elegans* zum einen zu dem bekannten embryonal letalen Phänotyp und zum anderen wurde im Großteil der Zellen, die sich über die frühe Phase hinaus weiter entwickelten und differenzierten Apoptose ausgelöst (Bloss *et al.*, 2003). Dieser Zelltod konnte durch gleichzeitige Eliminierung des *ced-4* Gens, über das im anerkannten Apoptose-Signalweg die wichtige Caspase CED-3 aktiviert wird, unterdrückt werden. Bloss *et al.* postulierten daraufhin für β -NAC eine Funktion im Apoptose-Signalweg. Die Beobachtungen dieser Studien sprechen dafür, dass NAC oder die individuellen Untereinheiten eine vielfältigere Funktion erfüllen, als die eines Chaperon-ähnlichen Faktors am Ribosom. Inwiefern die beobachteten Phänotypen jedoch auf einen Verlust der Funktion des heterodimeren Komplexes am Ribosom, den Verlust einer Funktion der β -Untereinheit oder einen toxischen Effekt der alleine vorliegenden α -Untereinheit zurückzuführen sind, bleibt allerdings unklar.

Für α -NAC wurde von der Arbeitsgruppe um R. St-Arnaud eine Funktion als entwicklungsregulierter Transkriptions-Koaktivator postuliert (Moreau *et al.*, 1998; Yotov *et al.*, 1998; Yotov and St-Arnaud, 1996a; Yotov and St-Arnaud, 1996b). Sie konnten in *in vitro* Studien eine Interaktion von α -NAC mit dem Transkriptions-Aktivator c-Jun und dem TATA-Box Bindungsprotein (TBP)

zeigen und stellten fest, dass α -NAC mit einer gewissen Sequenzspezifität an DNA bindet. Diese Funktion von α -NAC gilt allerdings als fraglich, da in einer anderen Studie nachgewiesen wurde, dass sowohl α -NAC als auch der heterodimere Komplex nicht nur an DNA, sondern auch an tRNA und rRNA Sequenzunabhängig bindet (Beatrix *et al.*, 2000). Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Funktion von α -NAC sind wahrscheinlich auf die experimentellen Vorgehensweisen zurückzuführen. Die Gruppe um St-Arnaud studierte die Eigenschaften von α -NAC immer in Abwesenheit von β -NAC oder nach Überexpression von α -NAC, obwohl α - und β -NAC im Cytosol praktisch ausschließlich in äquimolarem Verhältnis vorkommen und einen heterodimeren Komplex bilden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass NAC in höheren Eukaryonten vielfältige Funktionen erfüllt, einerseits als Komplex am Ribosom und andererseits als Transkriptions-Koaktivator im Nukleus nach Verlust der β -Untereinheit und damit der Assoziation mit Ribosomen. Dafür spricht die Beobachtung, dass *in vivo* die Funktion von α -NAC als Transkriptions-Koaktivator durch die Koexpression von β -NAC unterdrückt wird (Yotov *et al.*, 1998). Ebenso wurde festgestellt, dass β -NAC in höheren Eukaryonten ein Substrat für Caspasen ist (Thiede *et al.*, 2001; B. Beatrix, unveröffentlichte Daten). Caspasen sind eine Gruppe der Cysteiny-Aspartasen, die Apoptose durch die proteolytische Spaltung verschiedener zellulärer Substrate auslösen (Stroh and Schulze-Osthoff, 1998).

1.3.4 Kristallstruktur des archaebakteriellen NAC Homologs

In allen bisher sequenzierten Archaea Genomen gibt es ein hoch konserviertes α -NAC Homolog (aeNAC). Kürzlich bestimmten wir die erste Kristallstruktur eines NAC Proteins aus dem Archaeon *Methanothermobacter marburgensis* (Abbildung 8A). aeNAC formt ein Homodimer, zeigt aber dieselben Charakteristika wie das eukaryontische heterodimere NAC: (i) Assoziation mit Ribosomen, (ii) Interaktion mit naszierenden Polypeptiden und (iii) die Fähigkeit an ribosomale RNA (rRNA) zu binden.

Die Kristallstruktur deckte zwei bemerkenswerte Eigenschaften auf. Die Dimerisierung wird von einem neuen einzigartigen *Protein-Fold* vermittelt, welcher von der in allen NAC Proteinen konservierten NAC-Domäne gebildet wird (Spreter *et al.*, 2005). Obwohl die Struktur der NAC-Domäne keine

Homologie zu bekannten Kristallstrukturen aufweist, erinnert ihr Gesamterscheinungsbild an *Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding Folds* (OB). Charakteristisch ist die ähnliche konkave β -Faltblatt-Oberfläche auf der konservierte hydrophobe Aminosäuren exponiert sind, welche bei OB-Folds für die spezifische Bindung der Liganden relevant sind (Theobald *et al.*, 2003; Arcus, 2002) und bei NAC für die Bindung an rRNA verantwortlich sein könnten. Darüber hinaus entwickelten wir ein Homologie-Modell für die heterodimere NAC-Domäne aus Hefe, auf der Grundlage der archaebakteriellen homodimeren Domäne, aus dem deutlich wird, dass das eukaryontische α - und β -NAC ebenso über die konservierte NAC-Domäne dimerisieren (Abbildung 8B).

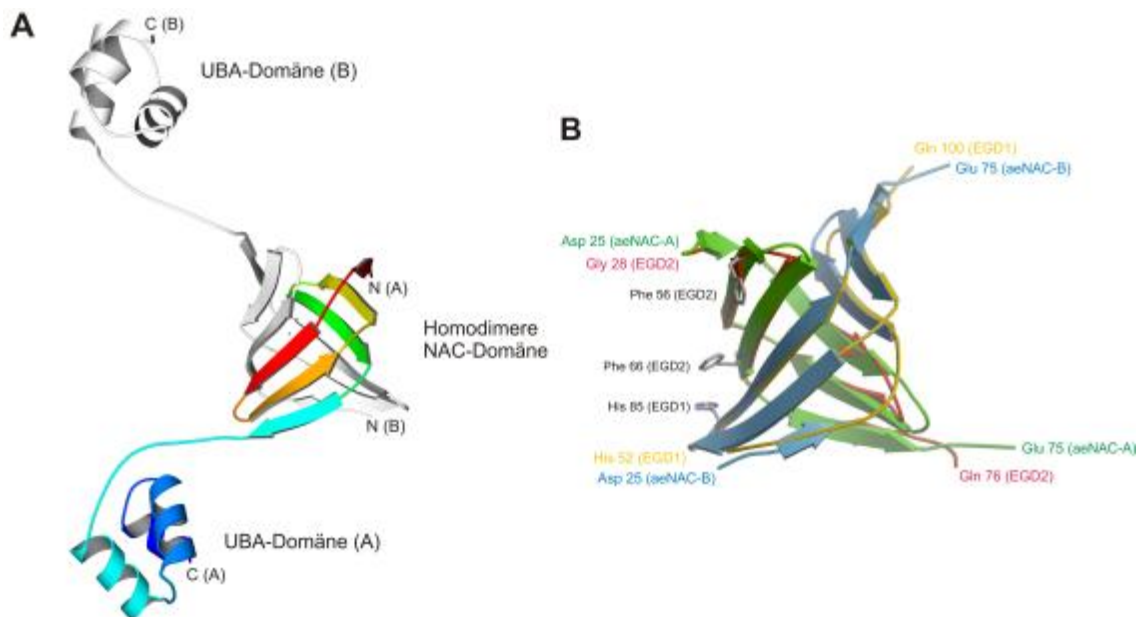


Abbildung 8 **A** Kristallstruktur des homodimeren archaebakteriellen NAC (aeNAC). Monomer (A) ist entsprechend dem Verlauf der Polypeptidkette vom N- zum C-Terminus von Rot bis Blau in sich graduell ändernder Farbe dargestellt. Monomer (B) ist in Grau gezeigt. **B** Überlagerung der homodimeren NAC-Domäne vom aeNAC und einem Homologie-Modell der heterodimeren NAC-Domäne von *S. cerevisiae*. Die Untereinheiten vom aeNAC sind in Grün (A) und Blau (B) dargestellt, die Untereinheiten von Hefe NAC in Rot (EGD2) und Gelb (EGD1). Das Homologie-Modell zeigt in Analogie zur aeNAC Struktur konservierte hydrophobe Reste (grau eingezeichnet) an der Oberfläche. (Abbildung adaptiert von Spreter *et al.*, 2005)

Das zweite charakteristische Merkmal ist die UBA-Domäne, welche in ihrer Struktur eine hohe Homologie zu bekannten UBA-Domänen verschiedener Proteine zeigt und auf ihrer Oberfläche einen konservierten charakteristischen exponierten hydrophoben Bereich aufweist (Spreter *et al.*, 2005). UBA-Domänen kommen in sehr verschiedenen Proteinen vor, die an der Protein-Degradation, der Kontrolle des Zellzyklus und DNA Reparatursystemen beteiligt

sind. Es wurde gezeigt, dass sie Ubiquitin oder Polyubiquitin binden. NMR Studien deckten auf, dass diese Interaktion über den hydrophoben Bereich auf der Oberfläche erfolgt (Mueller *et al.*, 2004). Bisher wurde angenommen, dass Proteine der UBL/UBA Familie (UBL – Ubiquitin Like Domain) wie Rad23 polyubiquitinierte Proteine ans Proteasom überführen, wo sie dann proteolytisch abgebaut werden. Eine erste biochemische Studie von Raasi und Pickart legte allerdings nahe, dass die UBA-Domänen von Rad23 möglicherweise mit dem Ubiquitin-Rezeptor des Proteasoms um diese Substrate konkurrieren, und daher die Ubiquitin-vermittelte Degradation durch Rad23 verhindert wird und Proteine stabilisiert werden (Raasi and Pickart, 2003). Da NAC sich am Ribosom in Kontakt mit naszierenden weitestgehend ungefalteten Polypeptidketten befindet, könnte es eine ähnliche Funktion haben.

Diese Ergebnisse zusammen mit der Beobachtung einer kotranslationalen Ubiquitinierung durch eine wohl Ribosomen-assoziierte Ubiquitin-Ligase (Schubert *et al.*, 2000; Turner and Varshasky, 2000) führen zu der Überlegung, dass es eine bisher noch nicht identifizierte Funktion von NAC im zellulären Protein-Qualitäts-Kontrollsystem gibt. Für die UBA-Domäne vom α -NAC Homolog aus *S. cerevisiae* (EGD2) konnte jedoch in einer *in vitro* Studie keine Bindung an Tetraubiquitin nachgewiesen werden (Raasi *et al.*, 2005), ebenso nicht wie für das humane NAC (B. Beatrix, unveröffentlichte Daten).

Die Funktion von NAC und den individuellen Untereinheiten *in vivo* bleibt rätselhaft. 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 seinen individuellen Untereinheiten in der Transkription veröffentlicht waren und α - und β -NAC in der Zelle überwiegend als heterodimerer Ribosomen-assoziiertes Komplex vorkommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich die Funktion des heterodimeren Komplexes am Ribosom untersucht.

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 essentielle Bedeutung von NAC wird darüber hinaus durch den letalen Phänotyp von NAC Mutationen in vielzelligen Organismen unterstrichen.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war noch für keinen der Ribosomen-assoziierten Faktoren (SRP, TF, RAC/Ssb und NAC) die genaue Lokalisation am Ribosom oder die Kontakte zu ribosomalen Proteinen, die an der Bindung beteiligt sind, bekannt. Erste Ergebnisse zeigten Pool *et al.* für die Bindung von SRP54 ans Ribosom (Pool *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher mit Hilfe biochemischer Studien die Funktion von NAC am Ribosom unter besonderer Berücksichtigung des Bindungsmechanismus und der Lokalisation näher charakterisiert werden.