

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung von heterodimerem eukaryontischem NAC

3.1.1 Expression und Reinigung von humanem und Hefe NAC

Ausgangspunkt der Arbeiten an heterodimerem NAC aus *Sacharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens* waren Konstrukte von B. Beatrix zur Koexpression der beiden Untereinheiten. Die Gene für die beiden NAC Untereinheiten waren hintereinander in den Vektor pET28a von Novagen kloniert, so dass die α Untereinheit einen N-terminalen HisTag gefolgt von einer Thrombin Protease-Schnittstelle trug.

Zu Beginn der Arbeit wurde die Koexpression des heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC in verschiedenen *Escherichia coli* Stämmen und die anschließende Aufreinigung optimiert, mit dem Ziel hochreinen heterodimeren Komplex mit entferntem HisTag zu erhalten. Hauptproblem der Proteinpräparation war die Labilität des heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC. Der Komplex konnte sehr gut und in hoher Ausbeute koexprimiert werden, war aber ab dem Zellaufschluss sehr Protease-sensitiv und wurde im Verlauf der Aufreinigung stark abgebaut. Durch Optimierung des Reinigungsprotokolls konnte der heterodimere Komplex mit einer Reinheit von über 99% und einer Konzentration von bis zu 60mg/ml präpariert werden und war bei 4°C bis zu eine Woche stabil.

Der gereinigte Komplex wurde mittels Gelfiltration, SDS- und nativer PAGE, IEF, MALDI-MS und DLS auf Reinheit und Homogenität untersucht. Die Kombination dieser Methoden zeigte, dass der Komplex in hoher Reinheit (>99%) und Homogenität erhalten und konzentriert werden konnte und damit eine ideale Grundlage für die Kristallisation bildet.

Alle Versuche zur Kristallisation von NAC aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens* schlugen jedoch fehl. Der Einsatz verschiedener Kristallisationsmethoden (Hängender Tropfen, Sitzender Tropfen, Dampfdiffusion, Reverse Dampfdiffusion, im *batch*, unter Öl, Kristallisation in Kapillaren und Agarose) und verschiedenster Zusatzstoffe als auch möglicher Kofaktoren zur Stabilisierung der Struktur führten zu keinerlei kristalliner Keimbildung. Als einziges Phänomen war eine Phasentrennung oder Ölbildung und besonders bei hoher Proteinkonzentration die Bildung einer glasartigen Phase zu beobachten (siehe Anhang 7.2).

3.1.2 Eukaryontisches NAC ist intrinsisch ungeordnet

Zur genaueren Charakterisierung des rekombinanten NAC wurde als erstes versucht, mittels der CD Spektroskopie eine Abschätzung des Sekundärstrukturgehaltes des gereinigten Komplexes *in vitro* unter verschiedenen Temperaturen und Bedingungen zu erhalten. Abbildung 8 zeigt das CD Spektrum des heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC bei 25°C und 90°C. Ausgehend von dem 25°C Spektrum ergibt die Analyse des Sekundärstrukturgehalts mit dem Programm K2D 10% α -Helix, 26% β -Strang und 56% *random coil*, was relativ gut mit den Vorhersagen verschiedener Sekundärstrukturvorhersage-Programmen übereinstimmt (zum Vergleich siehe Abbildung 12). Die Genauigkeit dieser Analyse des CD Spektrums ist allerdings stark von dem verwendeten Referenz-Datensatz des Programmes abhängig und damit für ein strukturell unbekanntes Protein stark fehlerbehaftet. Es wäre beispielsweise auch möglich, dass ein Protein mit sehr hohem Anteil an durchaus strukturierten Schleifen und β -turn Elementen ein derartiges Spektrum liefert. Es ist damit also schwierig, eine exakte Aussage über den Sekundärstrukturgehalt und die Verteilung von Ordnung / Unordnung zu treffen.

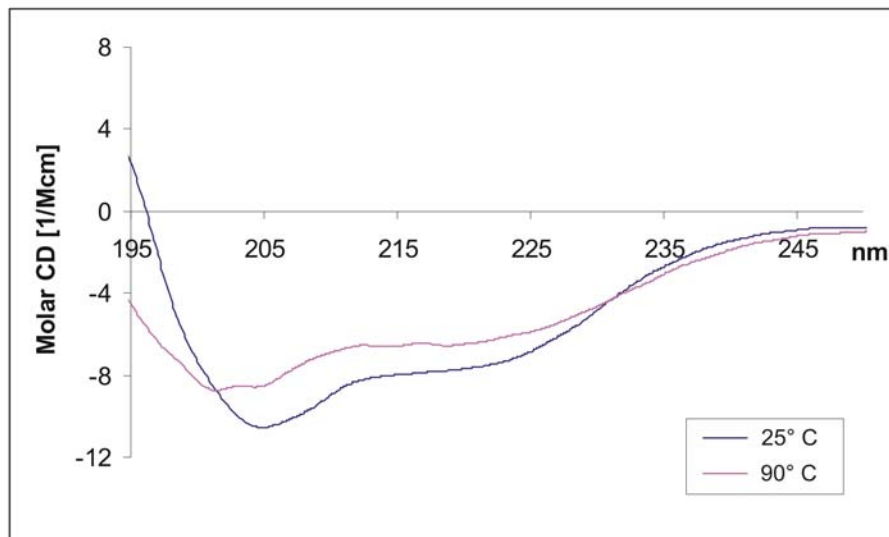


Abbildung 8 CD Spektrum von humanem heterodimerem $\alpha\beta$ -NAC. Die Spektren wurden wie in Abschnitt 2.4.5 beschrieben aufgenommen und normiert (Molar CD). Das Spektrum wurde bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen. Repräsentativ sind nur die beiden Spektren bei 25°C und 90°C dargestellt.

Das CD Spektrum für das rekombinante NAC aus *H. sapiens* zeigt eine ungewöhnliche Temperaurstabilität. Das Spektrum verändert sich nur geringfügig bis zur höchsten gemessenen Temperatur von 90°C und zeigt keine übliche sigmoidale

Entfaltungskurve. Das spricht entweder für eine für ein humanes Protein ungewöhnlich hohe Stabilität, oder für einen hohen Anteil an intrinsischer Unordnung, entsprechend der Sekundärstrukturberechnung, was aber endgültig mit der CD Spektroskopie nicht geklärt werden kann.

Zur Komplementierung der Ergebnisse aus der CD Spektroskopie wurde die Methode der ^1H 1D – NMR Spektroskopie verwendet. Im Gegensatz zum CD ermöglicht diese Methode keine Aussage über den Sekundärstrukturgehalt der Probe, ergibt aber schnell und eindeutig eine Angabe über das Vorhandensein einer definierten Tertiärstruktur (siehe Methoden 2.4.6). Das ^1H 1D-NMR Spektrum zeigt für das eukaryontische $\alpha\beta$ -NAC einen hohen Anteil an intrinsischer Unordnung, wie anhand der Ergebnisse aus der CD Spektroskopie vermutet. Das Ergebniss deutet daraufhin, dass $\alpha\beta$ -NAC einen strukturierten Kern besitzt, ein großer Teil des eukaryotischen Komplexes aber in Lösung keine definierte Tertiärstruktur ausbildet.

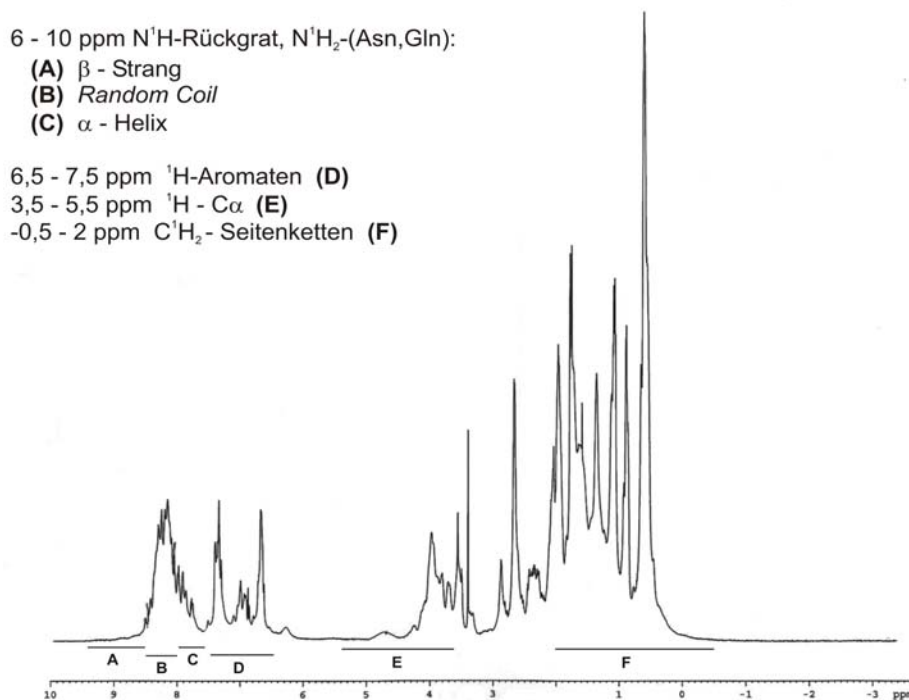


Abbildung 9 ^1H 1D-NMR Spektrum von heterodimerem humanem $\alpha\beta$ -NAC. Das Spektrum wurde wie in Abschnitt 2.4.6 beschrieben aufgenommen. Die Legende beschreibt die für die Proteinanalytik relevanten Bereiche der chemischen Verschiebung. Neben den für verschiedene Sekundärstrukturen spezifischen Verschiebungen (A – C) zeichnet sich das Spektrum eines definiert gefalteten Proteins durch eine insgesamt sehr feine Aufspaltung des Spektrums aus. Die Aufspaltung im Bereich der Aromaten deutet auf eine definierte Tertiärstruktur hin, das Fehlen einer Feinstruktur im unteren (F) und auch mittleren Bereich (E) der chemischen Verschiebung lässt auf einen hohen Grad von Unordnung schließen (siehe Methoden 2.4.6).

Die Ergebnisse aus CD und NMR Spektroskopie zeigen, dass eukaryontisches $\alpha\beta$ -NAC *in vitro* einen strukturierten Kern besitzt, über den höchstwahrscheinlich auch die Dimerisierung vermittelt wird, aber darüber hinaus zu einem Großteil intrinsisch ungefalteter vorliegt. Der ungeordnete Teil der Struktur scheint in Lösung nach den Ergebnissen der CD Spektroskopie nicht als *molten globule*, sondern eher als *random coil* oder *extended disorder* vorzuliegen, da der Zustand des *molten globule* zwar keine definierte Tertiärstruktur zeigt, aber sich durch ausgebildete Sekundärstruktur auszeichnet, die im CD ein Signal ergibt (Für die Definition und Charakterisierung von intrinsischer Unordnung siehe Dyson und Wright, 2005).

Mit Hilfe der CD Spektroskopie wurde versucht, festzustellen, inwiefern es möglich ist, durch verschiedene Zusätze oder Kofaktoren wie Salze, Metallionen, Zucker, Aminosäurederivate oder Nukleinsäuren die Struktur von eukaryontischem NAC in Lösung zu stabilisieren. Keine dieser Variationen ergab eine signifikante Änderung des CD Spektrums.

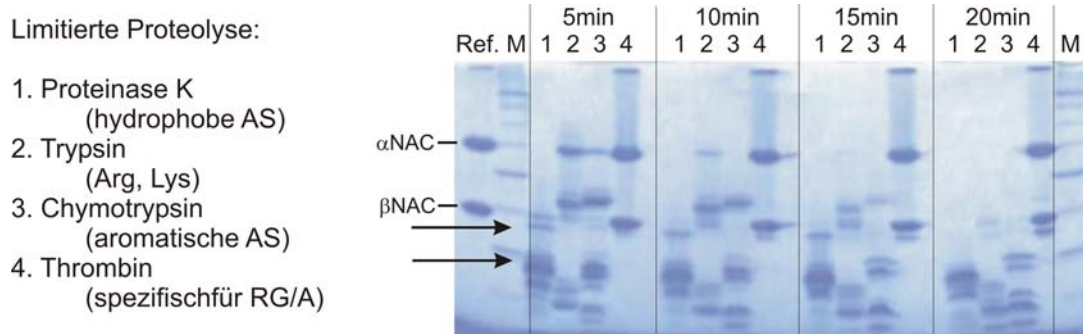


Abbildung 10 Limitierte Proteolyse von heterodimerem humanem $\alpha\beta$ -NAC. Die limitierte Proteolyse wurde wie in Abschnitt 2.4.8 beschrieben durchgeführt und die erhaltenen Fragmente mit SDS PAGE aufgetrennt. Die beiden Pfeile geben die durch N-terminale Sequenzierung identifizierten Fragmente an.

Die Ergebnisse einer limitierten Proteolyse mit vier Proteasen unterschiedlicher Spezifität unterstützen die Aussagen der CD und NMR Spektroskopie (Abbildung 10). Eukaryontisches $\alpha\beta$ -NAC wird mit sehr hoher Effizienz von allen vier Proteasen an mehreren Stellen in α - und β -NAC geschnitten. Zwei Schnittstellen des Abbaus konnten mit N-terminaler Sequenzierung als α NAC-Lys144 bzw. β NAC-Arg29 identifiziert werden. Durch Kombination dieser Ergebnisse mit Daten aus Sekundärstrukturvorhersage-Programmen und anderen Programmen, die Bereiche von

intrinsischer Unordnung vorhersagen (siehe Abbildung 11), konnte eine Vorhersage über die mögliche Domänenstruktur von eukaryontischem NAC getroffen werden (Abbildung 12)

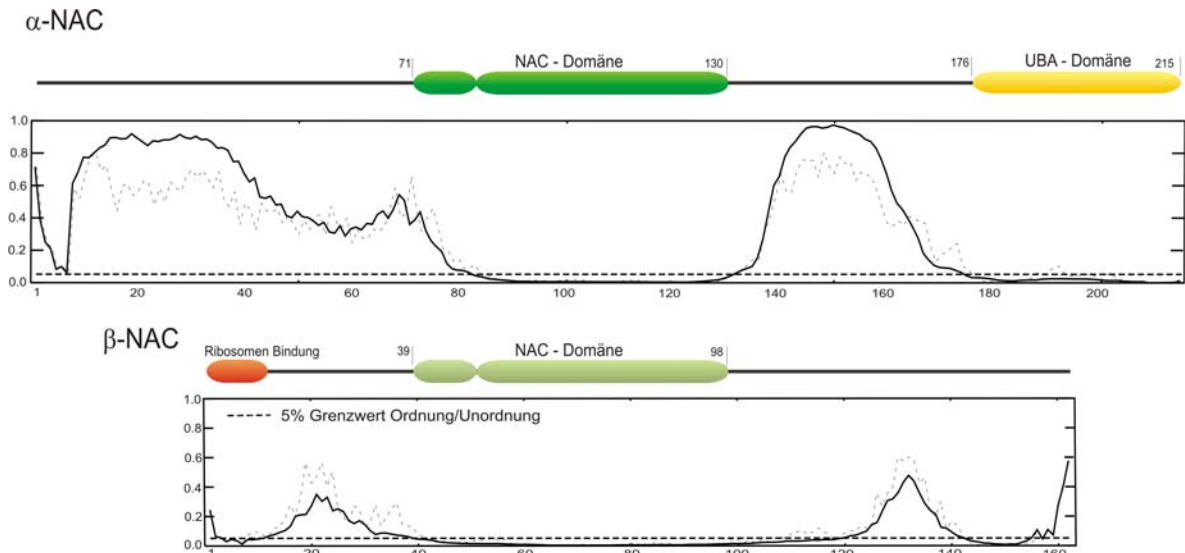


Abbildung 11 Vorhersage möglicher intrinsischer Unordnung von $\alpha\beta$ -NAC mit dem Programm DISOPRED (Ward et al., 2004). Die Graphen unter der Repräsentation der Primärstruktur von α - bzw. β -NAC geben die Wahrscheinlichkeit intrinsischer Unordnung an. Aufgetragen ist auf der Abszisse die Aminosäuresequenz und auf der Ordinate die Wahrscheinlichkeit der Unordnung auf einer Skala von 0 bis 1, entsprechend 0% und 100%. Der vom Programm angegebene Grenzwert für die Beurteilung des Übergangs Ordnung / Unordnung ist mit 5% angegeben.

Die beschriebene Charakterisierung von gereinigtem rekombinantem $\alpha\beta$ -NAC zeigte, dass NAC *in vitro* zu einem Großteil intrinsisch ungeordnet vorliegt und damit höchst wahrscheinlich in Abwesenheit eines entsprechenden Bindungspartners oder Liganden ungeeignet für die Strukturanalyse, sowohl mittels NMR als auch Röntgendiffraktion, ist. Die Struktur konnte darüber hinaus nicht durch verschiedenste Zusätze oder Kofaktoren stabilisiert werden, wie mittels der CD Spektroskopie verifiziert wurde. Nicht auszuschließen, oder sogar zu vermuten ist allerdings, dass eukaryontisches NAC sich durch Komplexbildung mit entsprechenden Bindungspartnern, beispielsweise dem Ribosom in eine definierte Tertiärstruktur faltet. Abgesehen von der spezifischen Bindung ans Ribosom ist aber für NAC bis jetzt kein weiterer Bindungspartner identifiziert worden, der entsprechende Bindungs- und Kokristallisationsstudien ermöglichen würde.

Heterodimeres Eukaryontisches $\alpha\beta$ -NAC (*H. sapiens*):

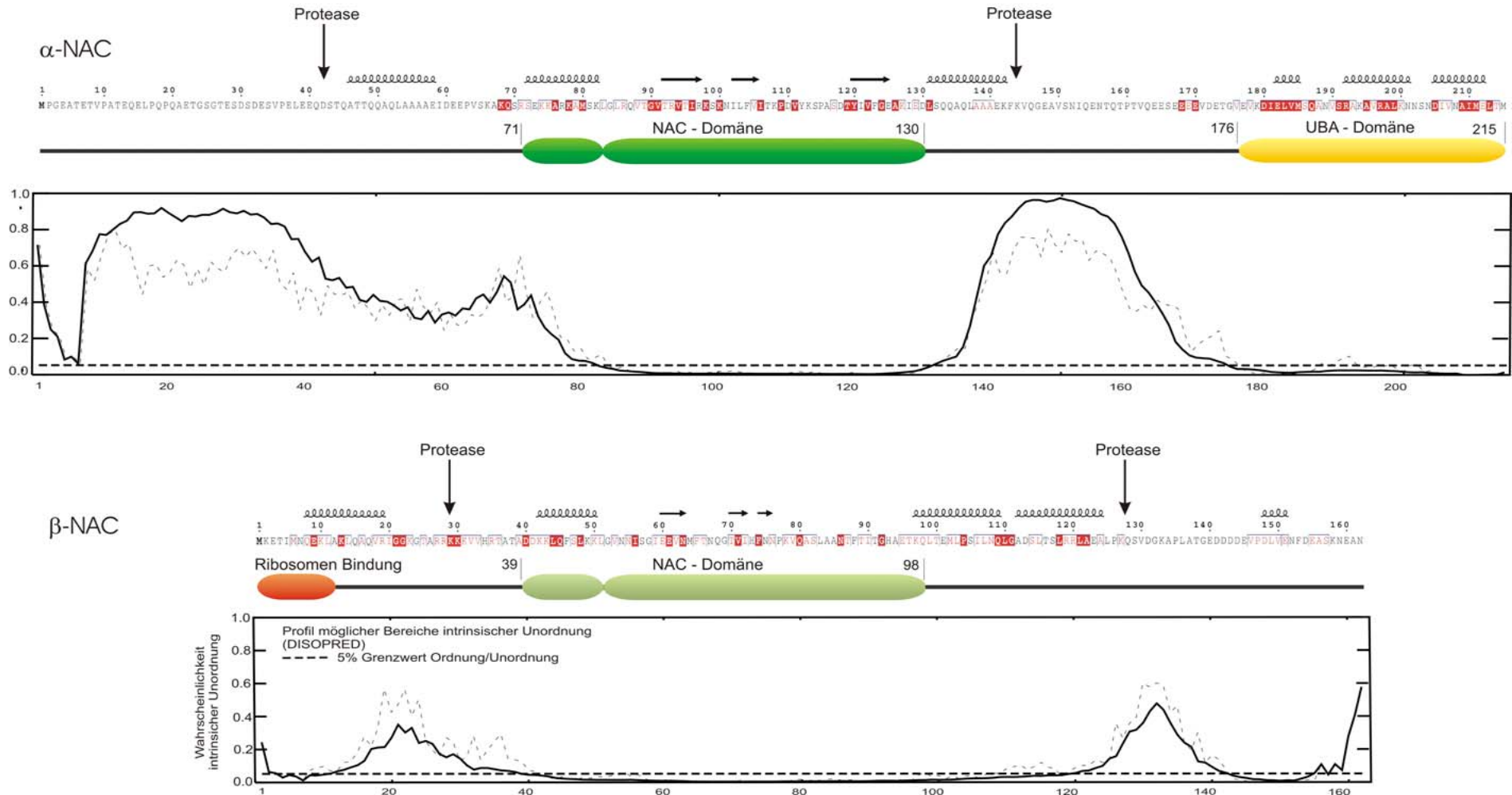


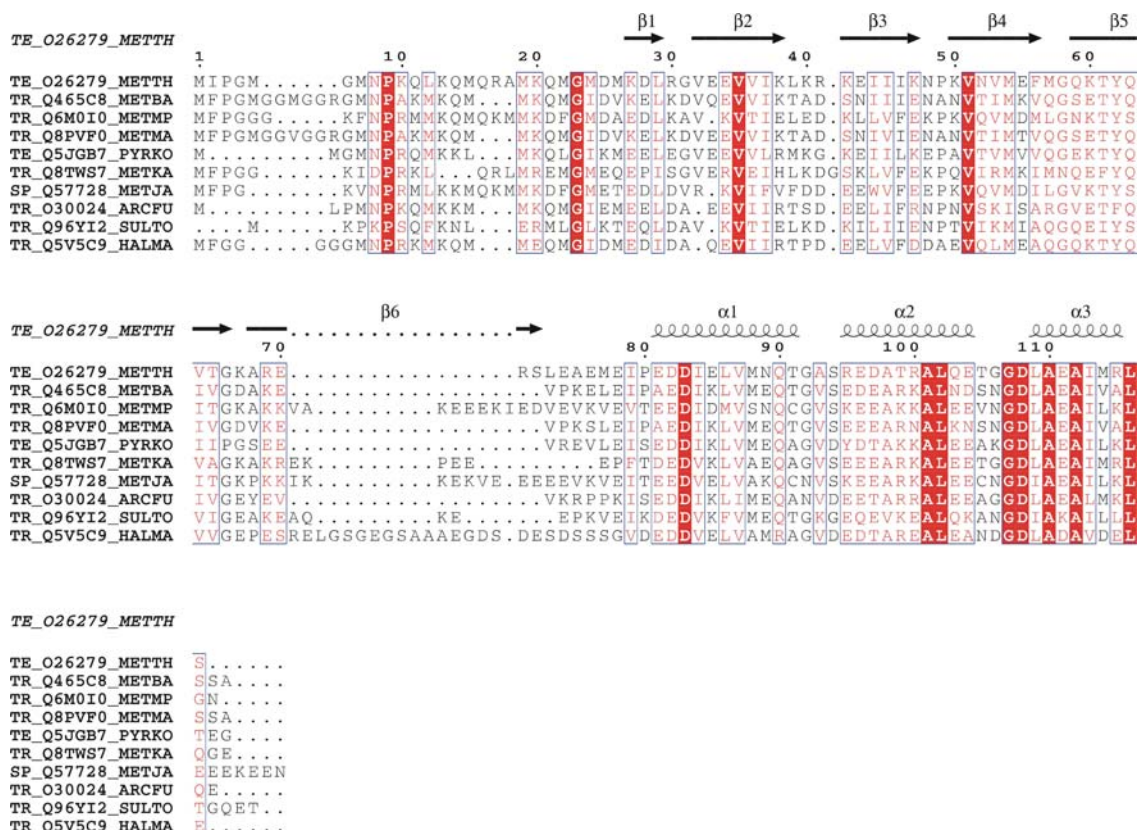
Abbildung 12 Domänenstruktur von humanem α - und β -NAC. Zusammengefasst sind die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse sowie der limitierten Proteolyse und der Vorhersage der ungeordneten Bereiche. Die Protease-Schnittstellen α NAC-Lys144 und β NAC-Arg29 sind über die limitierte Proteolyse identifiziert worden (s. Abbildung 10). Weitere Schnittstellen sind die vermeintlichen Caspase 3 Schnittstellen β NAC-Gln128 (Thiede et al., 2001) und α NAC-Asp42 (unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilungen B. Beatrix).

3.2 Identifikation und Charakterisierung eines archaebakteriellen NAC Homologs

3.2.1 Archaebakterielles α -NAC Homolog

Makarova et al. beschrieben 1999 in einer vergleichenden Studie von komplett sequenzierten Archaea Genomen das Vorhandensein eines α -NAC Homologs in Archaea (Macario und Conway De Macario, 2001; Makarova et al., 1999). Ein Sequenzvergleich zeigt, dass es in allen bisher sequenzierten Archaea ein hoch konserviertes α -NAC Homolog gibt, das die gleiche konservierte Domänenorganisation aufweist und eine hohe Konservierung der NAC-Domäne und der UBA-Domäne innerhalb und zwischen Archaea und Eukaryonten zeigt. Im archaebakteriellen NAC fehlen darüber hinaus genau die Bereiche, die im eukaryontischen α -NAC als intrinsich ungeordnet identifiziert wurden, wodurch das archaebakterielle Homolog zum bevorzugten Ziel strukturbiochemischer Untersuchungen wird (siehe Abbildung 13 und 14).

A Archaebakterielles α -NAC Homolog



B Sequenzvergleich archaebakterielles NAC (aeNAC) und eukaryontisches α -NAC

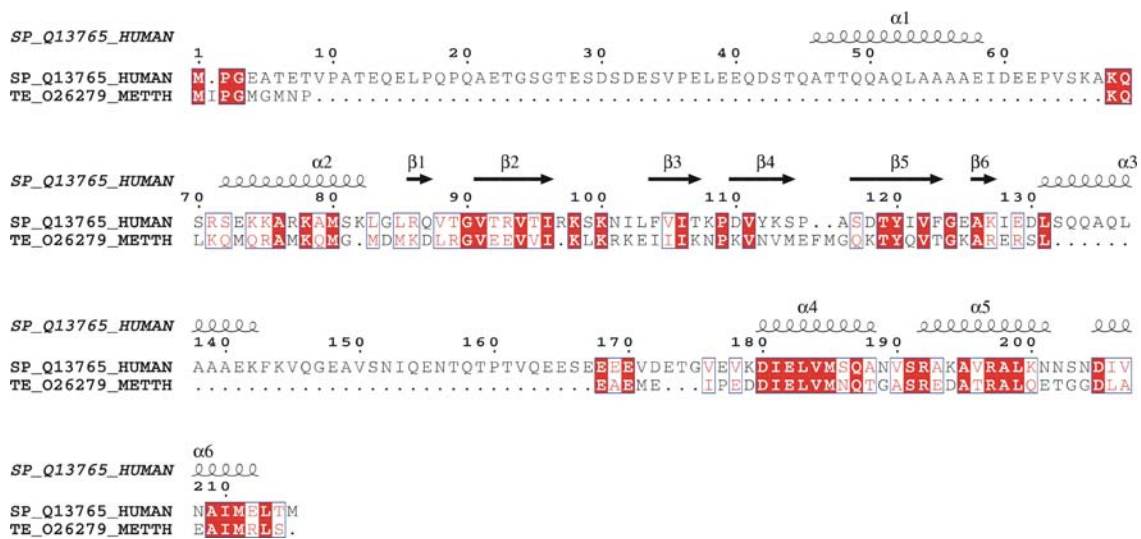


Abbildung 13 Sequenzvergleiche von archaebakteriellem NAC. **A** Sequenzvergleich der archaebakteriellen NAC Homologen. Dargestellt sind eine Kurzbeschreibung der jeweiligen Organismen mit den vorangestellten Zugangsnummern der Datenbanken Swissprot (SP_) bzw. TREMBL (TE_). **B** Sequenzvergleich von archaebakteriellem NAC aus *M. marburgensis* (aeNAC) und humanem α -NAC. Über alle Organismen konservierte Aminosäuren sind in Rot untermalt, konservierte Aminosäureaustausche sind in Rot auf Weiss dargestellt. Repräsentativ ist die mit dem Programm PHD (Rost und Sander, 1993) vorhergesagte Sekundärstruktur der obersten Sequenz illustriert.

A Archäobakterielles NAC (aeNAC) (*M. marburgensis*):



B Heterodimeres eukaryontisches $\alpha\beta$ -NAC (*H. sapiens*):

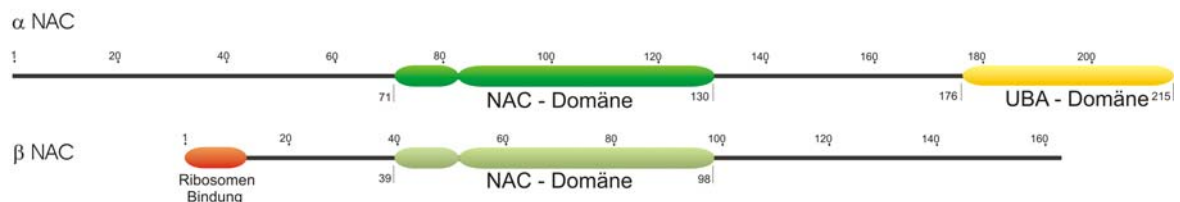


Abbildung 14 Vergleich der konservierten Domänenstruktur von humanem α - und β -NAC und dem archaebakteriellen NAC Homolog (aeNAC) aus *M. marburgensis*.

Ein β -NAC Homolog scheint es in Archaea nicht zu geben. Ein Sequenzvergleich von eukaryontischem β -NAC mit den sequenzierten Archaea Genomen zeigt keine Übereinstimmung. Darüber hinaus hat B. Beatrix mit biochemischer Methodik versucht aus dem Extrakt von *Methanothermobacter marburgensis* ein mögliches β -NAC Homolog zu identifizieren und kein Äquivalent gefunden (persönliche Mitteilungen B. Beatrix). Es ist zwar nicht auszuschließen, dass es ein β -NAC Homolog in Archaea gibt, es stellt sich aber die Frage, ob das archaebakteriell α -NAC Homologe (aeNAC) eine ähnliche biochemische Funktionen wie der eukaryontische heterodimere Komplex aus α - und β -NAC erfüllt.

3.2.2 Biochemische Charakterisierung

Das α -NAC Homolog aus dem Archäobakterium *Methanothermobacter marburgensis* (aeNAC) wurde bereits zu Beginn dieser Arbeit von B. Beatrix kloniert, und rekombinant exprimiert. Zur funktionellen Untersuchung von archaebakteriellem NAC (aeNAC) wurden in Zusammenarbeit mit B. Beatrix, Versuche, analog zu denen für die funktionelle Charakterisierung von eukaryontischem $\alpha\beta$ -NAC verwendeten Methoden, durchgeführt (Beatrix et al., 2000).

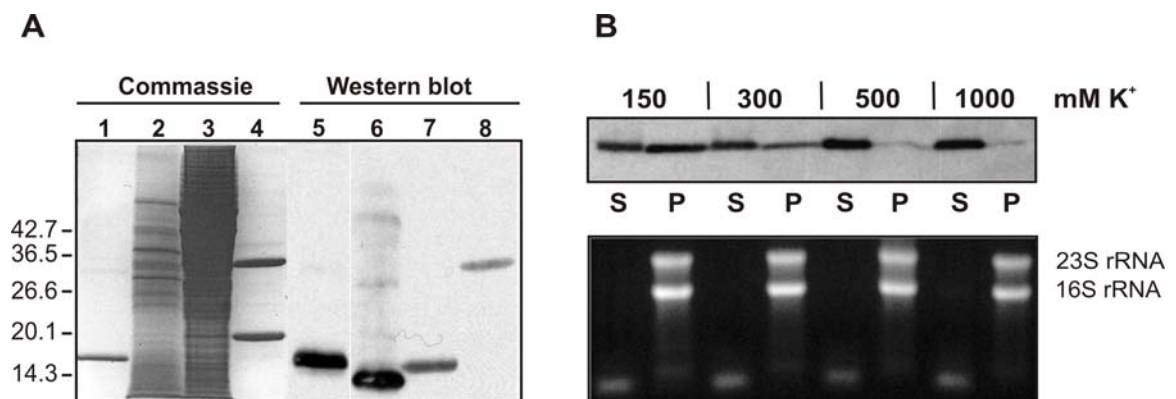


Abbildung 15 Archäobakterielles NAC (aeNAC) ist assoziiert mit Ribosomen und das funktionelle Homolog von eukaryontischem $\alpha\beta$ -NAC. **A** Coomassie gefärbte SDS-PAGE und Western-Blot mit polyklonalen Antikörpern gegen rekombinantes aeNAC. *Spuren 1 und 5*: rekombinantes, gereinigtes aeNAC mit HisTag; *Spuren 2 und 6*: Rohextrakt aus *M. marburgensis*; *Spuren 3 und 7*: Rohextrakt aus *M. jannashii*; *Spuren 4 und 8*: rekombinantes gereinigtes humanes NAC (in Spur 5 wurde 1/10 der Menge der in Spur 1 geladenen Menge verwendet). **B** Ribosomen wurden vom *M. marburgensis* S100 Extrakt über Saccharose Kissen unter verschiedenen Salzkonzentrationen pelletiert. Überstand (S) und Pellett (P) wurden über SDS-PAGE und Western-Blot mit Antikörper gegen aeNAC analysiert. rRNA wurde vom Überstand und Pellett extrahiert und im Agarosegel analysiert.

Es wurde gezeigt, dass das archaebakterielle α -NAC Homolog in *M. marburgensis* exprimiert wird und *in vivo* mit Ribosomen assoziiert ist (Abbildung 15). Darüber hinaus konnte das archaebakterielle NAC (aeNAC) zu der gebundenen Polypeptidkette am Ribosom verknüpft werden und zeigte eine Konkurrenz mit eukaryontischem NAC aus *H. sapiens* um die naszierende Polypeptidkette (Abbildung 16).

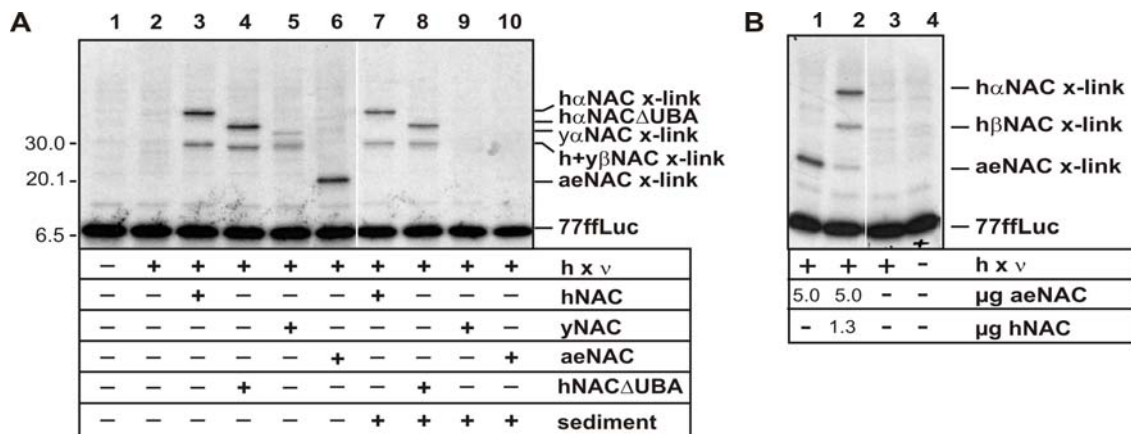


Abbildung 16 Archaebakterielles NAC (aeNAC) interagiert mit der naszierenden Polypeptidkette am Ribosom. **A** Hochsalzgereinigte 77aaffLuc RNCs wurden wie in (Gorlich et al., 1991) beschrieben mit einem photoinduzierbaren Lys-Quervernetzungs-Agens an der naszierenden, mit ^{35}S markierten Polypeptidkette hergestellt und mit humanem $\alpha\beta$ -NAC (hNAC), Hefe NAC (yNAC), humanem $\alpha\beta$ -NAC in dem die UBA-Domäne im α -NAC nach Position Glu-173 deletiert wurde (hNAC Δ UBA), oder aeNAC (aeNAC) inkubiert. Die Proben wurden mit UV-Licht aktiviert (hxv) und nach SDS-PAGE auf Radioaktivität getestet. Die zu sehenden Banden entsprechen den Querverknüpfungs-Produkten der jeweiligen NAC-Konstrukte mit der naszierenden Polypeptidkette. Die Proben in Spuren 7-10 wurden vor der Aktivierung mit UV-Licht über Saccharosekissen sedimentiert (sediment). Die Analyse zeigt, dass nach der Sedimentation Hefe (yNAC) und archaebakterielles NAC (aeNAC) nicht mehr zur naszierenden Polypeptidkette verknüpft werden kann. **B** Analog zu A vorbereitete Proben wurden mit 5-fachem Überschuss an archaebakteriellem NAC (aeNAC) und darauf folgender Zugabe von humanem $\alpha\beta$ -NAC (hNAC) inkubiert und aktiviert (hxv). Die Analyse zeigt, dass humanes $\alpha\beta$ -NAC (hNAC) erfolgreich mit archaebakteriellem NAC (aeNAC) um die Interaktion mit der naszierenden Polypeptidkette kompetitiert.

Die Ergebnisse der funktionellen biochemischen Versuche zeigen, dass das archaebakterielle α -NAC Homolog analoge Eigenschaften am Ribosom zum eukaryontischen heterodimeren $\alpha\beta$ -Komplex besitzt und damit wahrscheinlich das funktionelle Homolog des eukaryontischen heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC am Ribosom ist. Ein β -NAC Homolog wurde in keinem der sequenzierten Archaea gefunden.

Eukaryontisches α - und β -NAC zeigen innerhalb der konservierten NAC-Domäne eine hohe Homologie zueinander, was vermuten lässt, dass sich die beiden Untereinheiten möglicherweise durch Genduplikation in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben (Spreter et al., 2005).

3.3 Kristallstruktur des archaebakteriellen NAC aus

M. marburgensis

3.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung eines löslichen aeNAC

Konstruktes

Archaebakterielles NAC aus *M. marburgensis* (aeNAC) wurde rekombinant mit N-terminalem HisTag und anschließender Thrombin Schnittstelle im Vektor pET28a in *E. coli* überexprimiert. Das rekombinante Protein ließ sich in ausreichender Menge exprimieren, fiel aber nach dem ersten Aufreinigungsschritt und der anschließenden Entfernung des HisTag durch spezifischen Thrombin-Verdau, aus der Lösung und liess sich nicht ankonzentrieren. Das rekombinante Protein ohne HisTag konnte durch Variation des Reinigungsprotokolls und durch den Zusatz von 500 mM NaCl und 50 mM Betain stabilisiert werden, so dass es bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml ankonzentriert werden konnte. Obwohl das Protein in Lösung stabilisiert werden konnte, zeigte das Profil der gereinigten, ankonzentrierten Probe in der DLS unabhängig vom Zusatz verschiedenster Kofaktoren, Salze oder Detergenzien eine polymodale Verteilung. In Übereinstimmung mit den Vorhersagen aus der DLS für polymodale Verteilungen liess sich archaebakterielles wt-aeNAC nicht kristallisieren und ergab keinerlei Keimbildung in den Kristallisationsansätzen.

Limitierte Proteolyse des rekombinanten aeNAC mit Proteasen unterschiedlicher Spezifität lieferte, im Gegensatz zu der Proteolyse von eukaryontischem NAC, ein stabiles Hauptfragment (siehe Abbildung 17), was auf eine kompakte Domänenstruktur dieses Hauptfragmentes schließen lässt. Das stabile Hauptfragment wurde durch N-terminale Sequenzierung als $\Delta 18$ -aeNAC identifiziert und als neues Konstrukt in den Vektor pET28a mit N-terminalem HisTag und Thrombinschnittstelle kloniert. Das verkürzte Konstrukt ließ sich mit hoher Ausbeute

in *E. coli* exprimieren und aufreinigen und zeigte eine monomodale Verteilung in der DLS.

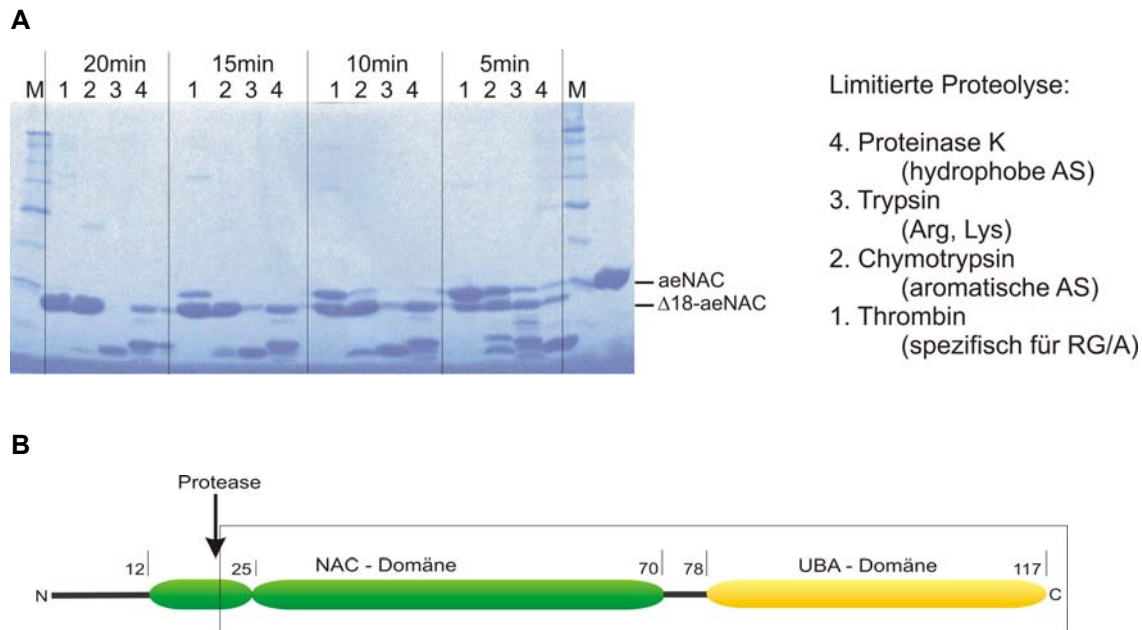


Abbildung 17 Limitierte Proteolyse von wt-aeNAC. Abbildung **A** zeigt die limitierte Proteolyse des aeNAC. Die Proteolyse führte zu einem Hauptfragment, das nach der Aminosäure 18 geschnitten wurde. **B** Darstellung der Domänenstruktur von aeNAC und der Protease-Schnittstelle aus A. Das Rechteck markiert das zur Kristallisation verwendete Konstrukt.

Nach der erfolgreichen Kristallisation von $\Delta 18$ -aeNAC (siehe Abschnitt 3.3.2) wurde zur Lösung des Phasenproblems das Selenomethionin-Derivat von $\Delta 18$ -aeNAC hergestellt. Das rekombinante Protein wurde nach einer Variation der Methode von Budisa et al., 1995 exprimiert und analog zum Methionin-Derivat aufgereinigt und zur Kristallisation verwendet. Der Vollständigkeit des Einbaus von Selenomethionin wurde durch MALDI - MS verifiziert und zeigte einen vollständigen Einbau.

3.3.2 Kristallisation von $\Delta 18$ -aeNAC und seinem Selenomethionin

Derivat

Sowohl wt-aeNAC als auch $\Delta 18$ -aeNAC wurden nach der Methode des Sitzenden und des Hängende Tropfen versucht zu kristallisieren. wt-aeNAC zeigte keinerlei Keimbildung, sondern nur Präzipitat. Die Kristallisation von $\Delta 18$ -aeNAC

ergab zwei anfängliche Bedingungen, eine unter 30% PEE (Pentaerythritol Ethoxylat 15/4-EO/OH), 50 mM Ammoniumsulfat, 50 mM BisTris (pH 6,5) und eine andere unter 2,2 M Natrium Malonat (pH 7,0). Die Kristalle der PEE Bedingung konnten durch Variation der Reservoirbedingungen optimiert werden, zeigten aber nur eine Röntgenbeugung bis $\sim 8 \text{ \AA}$ und waren damit ungeeignet zur Röntgenstrukturanalyse (Abbildung 18).



Verfeinerte Bedingung:

26% PEE (Pentaerythritol Ethoxylat)
50mM HEPES pH 7,0
50mM Ammoniumsulfat
5mM DTT
5mM EDTA

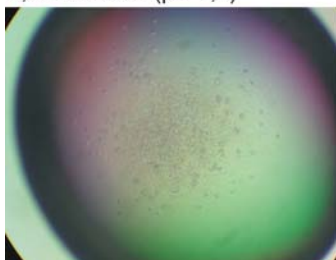
Auflösung: 8 - 10Å

Abbildung 18 Kristalle der PEE Bedingung. Die verfeinerten Bedingungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 12 mg/ml $\Delta 18$ -aeNAC angesetzt und ergaben optisch schöne Kristalle, die aber nur eine Röntgenbeugung bis $\sim 8 \text{ \AA}$ zeigten.

Die anfänglich mit Malonat erhaltenen Mikrokristalle konnten durch Variation des Reservoirs und durch Zusätze nicht verbessert werden. Durch die Methode des Mikro Seeding nach dem *streak seeding* Protokoll konnte die Keimbildung optimiert und Einzelkristalle gezüchtet werden, die eine Röntgenbeugung bis $\sim 2.3 \text{ \AA}$ zeigten (Abbildung 19).

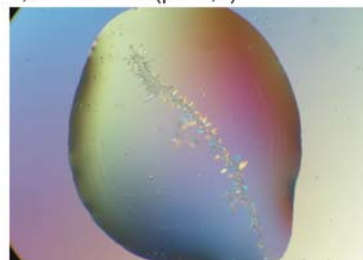
Initiale Bedingung:

2,2M Malonat (pH 7,0)



Mikro Seeding:

1,9M Malonat (pH 7,0)



1,6M Malonat (pH 7,0)

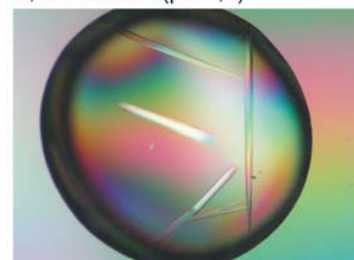


Abbildung 19 Kristallisationsansätze der Malonat (pH 7,0) Bedingung. Das linke Bild zeigt die anfänglich erhaltenen Mikrokristalle. Das mittlere Bild illustriert erfolgreiches *streak seeding* in eine Bedingung, in der keine Keimbildung, sondern nur Kristallwachstum stattfindet. Durch Variation der Vorequilibration des Tropfens ließ sich die Anzahl der über *streak seeding* eingeführten Keime reduzieren. Das Bild rechts zeigt die Ergebnisse des optimierten *seeding* Protokolls. Die verfeinerten Bedingungen wurden mit einer Proteinkonzentration von 9 mg/ml gereinigtem $\Delta 18$ -aeNAC angesetzt.

Zur Lösung des Phasenproblems wurde analog zur Kristallisation von $\Delta 18$ -aeNAC das Selenomethionin Derivat kristallisiert. SeMet- $\Delta 18$ -aeNAC konnte unter ähnlichen Bedingungen wie das native Protein mit Mikro Seeding kristallisiert werden.

3.3.3 Strukturbestimmung von $\Delta 18$ -aeNAC mit Se-MAD

Die Kristalle sowohl des $\Delta 18$ -aeNAC als auch des Selenomethionin Derivats erwiesen sich als sehr fragil. Jegliche Variation der Tropfenbedingung zur Überführung der Kristalle in eine Cryolösung führte zur Spaltung der Kristalle. Die geeignetste Bedingung war eine schrittweise Erhöhung der Malonatkonzentration auf 2,8 M, bei der allerdings viele Kristalle einen Schaden erlitten, der sich in einer Aufspaltung der Reflexe im Diffraktionsbild zeigte. Trotz der geringeren Streukraft waren die kleineren Kristalle besser für die Datenaufnahme geeignet, da sie weniger fragil gegenüber Änderungen der Pufferbedingungen waren.

An der BL1 am BESSYII wurde ein drei-Wellenlängen MAD-Datensatz aufgenommen, mit dem die Struktur des Selenomethionin Derivates von $\Delta 18$ -aeNAC ermittelt werden konnte. Die Struktur wurde gegen einen *low remote* Datensatz verfeinert, der an einem anderen SeMet Kristall gemessen wurde und bis zu höherer Auflösung streute (siehe Methoden für Details der Strukturbestimmung). Tabelle 4 fasst die Statistiken der Datensammlung, Phasierung und Verfeinerung zusammen. Die Strukturfaktoren und verfeinerten Koordinaten sind in der PDB unter der Zugangsnummer 1TR8 hinterlegt (Spreter et al., 2005).

Tabelle 4 Statistiken der Datensammlung, Strukturbestimmung und Verfeinerung des Selenomethionin $\Delta 18$ -aeNAC Derivats. Die MAD Daten wurden an der BL1 am BESSYII aufgenommen und mit den Programmen DENZO, SCALEPACK prozessiert und integriert. Zur Schweratomsuche, Phasierung, Elektronendichtemodifikation und Verfeinerung wurden PHENIX-HySS, SHARP, RESOLVE und CNS bzw. Refmac5 verwendet.

	MAD Datensatz			
	Se ₁ (<i>low remote</i>)	Se ₂ (<i>peak</i>)	Se ₂ (<i>inflection</i>)	Se ₂ (<i>high remote</i>)
Raumgruppe	P4 ₃ 2 ₁ 2		P4 ₃ 2 ₁ 2	
Zellkonstante (a, b, c, / Å α , β , γ , / °)	90,8 90,8 49,5 90 90 90		89,7 89,7 49,6 90 90 90	
Datensammlung				
Wellenlänge (Å)	0,99	0,9795	0,9797	0,9117
Auflösung (Å)	30 – 2,27	30 – 2,4	30 – 2,4	30 – 2,4
R _{sym} (%) ^{a,b}	4,5 (16,8)	7,0 (24,8)	8,1 (30,3)	5,9 (22)
I/ σ (I) ^a	8,5 (4,0)	9,6 (3,1)	8,9 (2,1)	9,5 (2,8)
Unabhängige Reflexe	10054	8307	8323	8323
Redundanz	6,2	6,9	8,2	6,8
Vollständigkeit ^a	96,4 (96,4)	99,8 (100)	99,9 (100)	99,9 (100)
Phasierung				
Mean FOM (acentrische - / centrische - Reflexe)			0,65 / 0,48	
Verfeinerung				
Auflösungsbereich (Å)	20 – 2,27			
Anzahl Modellatome	1495 (48 Wasser)			
R (%)	19,4			
R _{free} (%)	24,1			
Mean B factor (TLS)	60,2			
Rmsd Bindungslängen (Å)	0,017			
Rmsd Bindungswinkel (°)	1,412			

Se₁ und Se₂ definieren zwei unterschiedliche Kristalle des Selenomethionin Derivats von $\Delta 18$ -aeNAC. Die anfänglichen Phasen wurden anhand des MAD Datensatzes vom Kristall Se₂ berechnet und die Verfeinerung wurde gegen den *low remote* Datensatz vom Se₁ Kristall, der eine höhere Auflösung und bessere Qualität zeigt, durchgeführt

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

^b $R_{\text{sym}} = (\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|) / (\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl}))$

3.3.4 Kristallstruktur von $\Delta 18$ -aeNAC

Abbildung 20 stellt die Kristallstruktur von $\Delta 18$ -aeNAC dar:

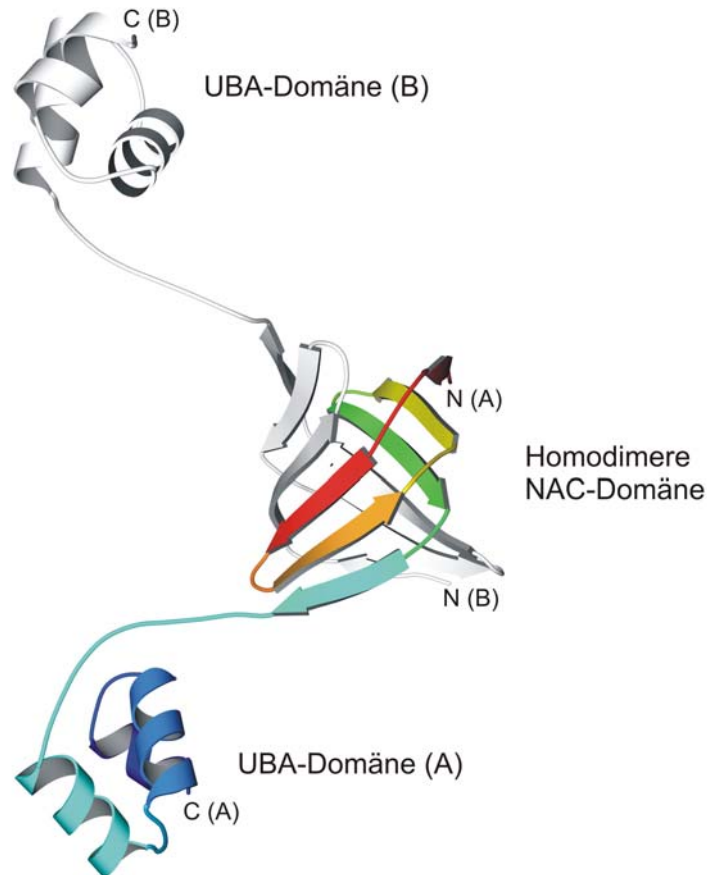


Abbildung 20 Kristallstruktur von $\Delta 18$ -aeNAC. Die Abbildung illustriert die homodimere Struktur von archaebakteriellem NAC (aeNAC). Die eine Untereinheit (A) ist entsprechend dem Verlauf der Polypeptidkette vom N-Terminus bis zum C-Terminus von Rot bis Blau in sich graduell ändernder Farbe dargestellt, die zweite Untereinheit (B) des Homodimers ist in Grau gezeigt. Die Struktur zeigt Aminosäuren 24 – 117, die in der Kristallstruktur sichtbar sind. Die N-terminalen Aminosäuren 19 – 23 sind in der Kristallstruktur ungeordnet.

Aus der Kristallstruktur wird deutlich, dass archaebakterielles NAC (aeNAC) ein Homodimer bildet. Das aeNAC Monomer ist aus zwei eigenständigen Domänen aufgebaut, einem C-terminalen drei Helix Bündel (Aminosäuren 79 – 117), das homolog zu UBA-Domänen (Ubiquitin-Assoziiated Domain) ist und der zentralen β -Faltblatt Domäne (Aminosäuren 24 – 70), die die einzigartige NAC-Domäne bildet. Die beiden Domänen des Monomers sind durch einen hoch flexiblen Bereich von 8 Aminosäuren (Aminosäuren 71 – 78) verbunden.

Die aeNAC Monomere dimerisieren über den zentralen hoch konservierten Bereich der NAC-Domäne (Aminosäuren 25 – 70) und bilden ein neues Faltungsmotiv, das keinerlei Homologie zu bisher bekannten Faltungsmotiven besitzt. Abbildung 21 zeigt eine Stereodarstellung der zentralen homodimeren NAC-Domäne mit korrespondierender Elektronendichtekarte und verdeutlicht die Faltung der neuartigen dimeren Domäne.

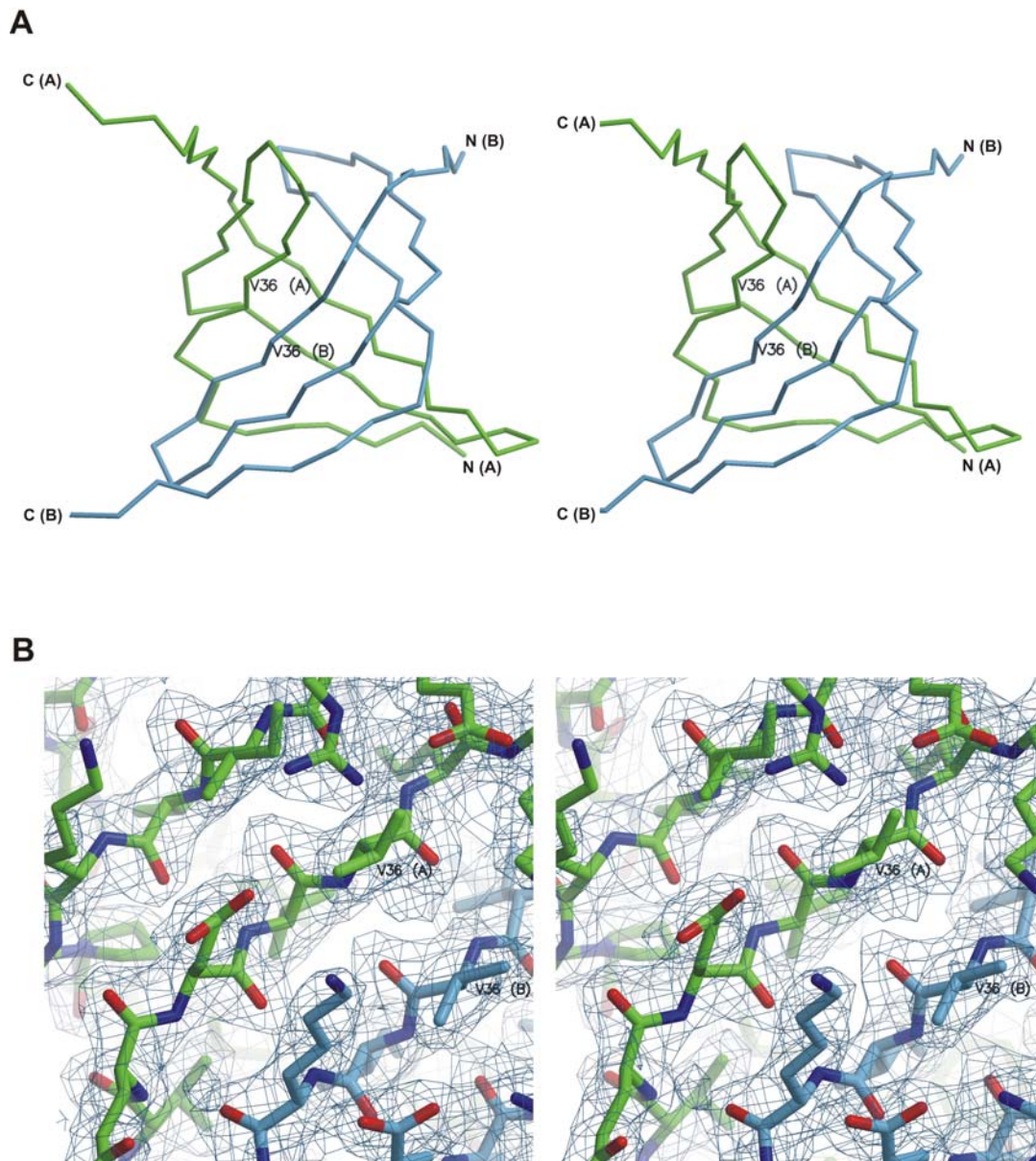
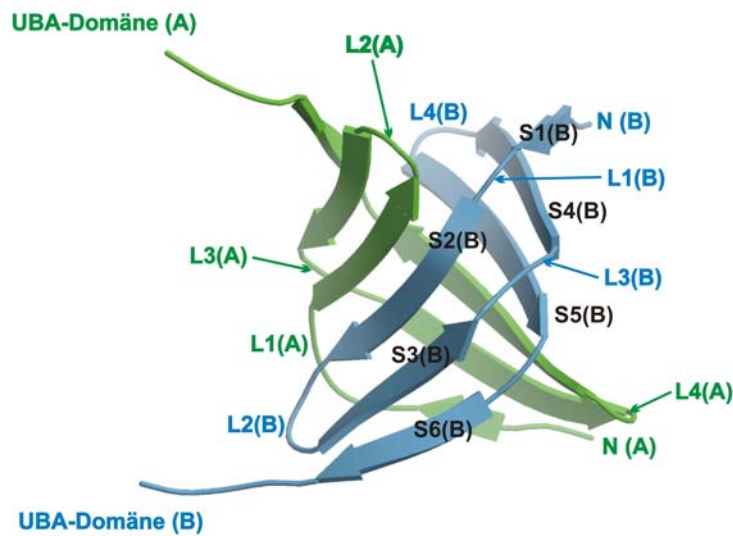


Abbildung 21 Homodimere NAC-Domäne des archaebakteriellen NAC (aeNAC). **A** Stereodarstellung des Proteinrückgrats der homodimeren NAC-Domäne. Die beiden Untereinheiten sind in Blau bzw. Grün illustriert. Zur Verdeutlichung der zweizähligen Symmetrie der homodimeren NAC-Domäne sind die Aminosäuren V36 der beiden Untereinheiten markiert, die direkt durch die zweizählige Achse ineinander überführbar sind. **B** Stereo-Abbildung eines Teils der 2.27 Å Elektronendichtekarte, konturiert bei 1σ .

A



B

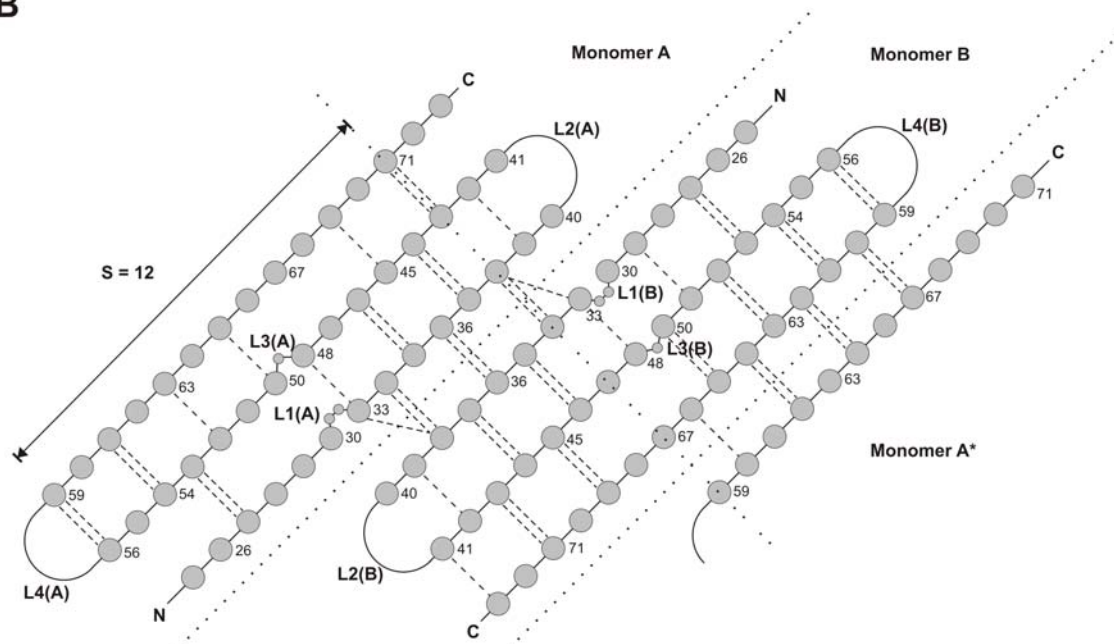


Abbildung 22 Topologische Darstellung der homodimeren, β -Fass ähnlichen NAC-Domäne von $\Delta 18$ -aeNAC. **A** Schematische Darstellung der NAC-Domäne. Die β -Stränge sind mit S1 – S6 bezeichnet und die Schleifen-Bereiche mit L1 - L4. **B** Korrespondierendes Topologiediagramm der NAC-Domäne. Die Aminosäuren sind durch graue Punkte repräsentiert und die Wasserstoffbrücken zwischen ihnen in gepunkteten Linien dargestellt. Die Schleifen-Bereiche der beiden Monomere sind entsprechend der Darstellung in A markiert. Die langen gepunkteten Linien entsprechen der Interaktionsfläche der Monomere und zur Verdeutlichung der geschlossenen Fass-Struktur sind rechts die Aminosäuren 59-71 des Monomers A wiederholt. S=12 gibt die Schernummer an, die der Anzahl der Aminosäuren entspricht, die ein durchgehender β -Strang benötigt um das β -Fass vom ‚Boden‘ zum ‚Deckel‘ zu umspannen (siehe Murzin et al., 1994 für Definition und Klassifizierung von β -Fass Strukturen).

Die dimere Faltungsdomäne bildet ein abgeflachtes β -Fass aus, das eine zweizählige Symmetrieachse, die durch die Mitte der beiden β -Faltblatt-Oberflächen des β -Fasses verläuft, besitzt und die die beiden Monomere ineinander überführt. Die neuartige dimere β -Struktur der NAC-Domäne kann, wie in der Topologiedarstellung in Abbildung 22 B verdeutlicht, als 6-strängiges pseudo β -Fass mit einer Schernummer von $S=12$ klassifiziert werden (für die Klassifizierung von β -Fass-Strukturen siehe Murzin et al., 1994).

Die NAC-Domäne bildet über diese ungewöhnliche, homodimere β -Fass-Struktur zwei konkave, topologisch sehr ähnliche β -Faltblatt-Oberflächen aus. Die eine der beiden konkaven β -Faltblatt-Oberflächen ist dabei den UBA-Domänen zugewandt und entspricht der auf den Abbildungen 20-22 gezeigten linken Seite des abgeflachten β -Fasses, während die zweite konkave β -Faltblatt-Oberfläche, die der, in den Abbildungen 20-22 dargestellten rechten Seite des abgeflachten β -Fasses entspricht, zu den in der Kristallstruktur fehlenden N-Termini exponiert ist. Die beiden konkaven β -Faltblatt-Oberflächen der abgeflachten homodimeren NAC-Domäne sind topologisch sehr ähnlich, zeigen aber eine unterschiedliche Aminosäureverteilung und es stellt sich die Frage inwiefern diese strukturell ähnlichen konkaven Seiten des abgeflachten, homodimeren β -Fasses eine unterschiedliche Funktion erfüllen.

3.4 Implikationen der Kristallstruktur von aeNAC

3.4.1 Struktur - Funktions Analyse

Biologische Einheit von $\Delta 18$ -aeNAC

Die homodimere Interaktionsfläche der NAC-Domäne von aeNAC ist dicht gepackt und zeigt eine konservierte Struktur von alternierenden hydrophoben Resten, die das Innere des β -Fasses aufbauen (Abbildung 23).

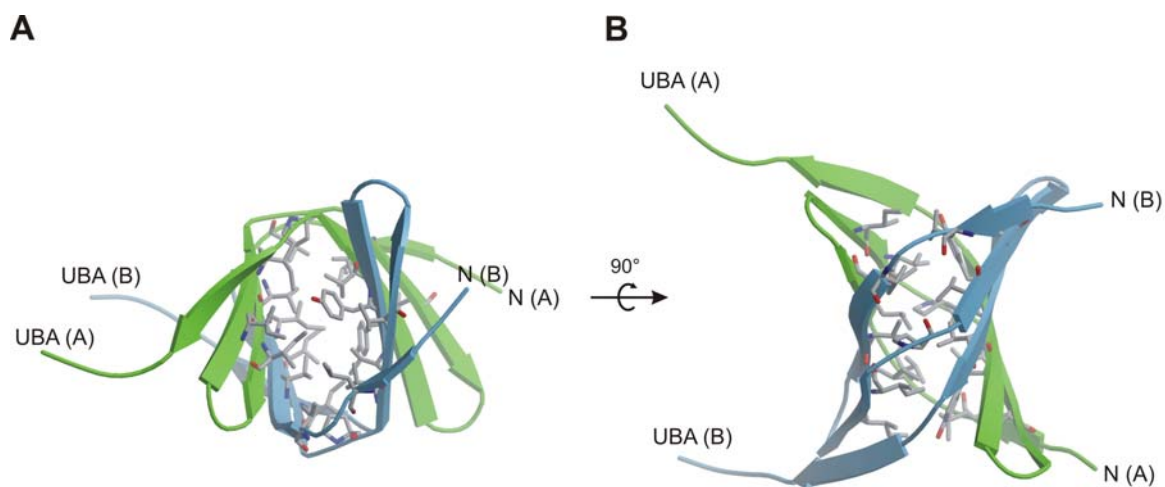


Abbildung 23 Struktur des konservierten Kerns der NAC-Domäne von aeNAC. In Grau gezeigt sind die konservierten Aminosäuren, die den dicht gepackten Kern der NAC-Domäne aufbauen und die Interaktionsfläche des Homodimers ausbilden **A** bzw. **B** repräsentieren die Sicht von oben bzw. von der Seite auf die NAC-Domäne. Gezeigt sind die Aminosäuren L29, V32, V35, I37, I44, I46, P49, V51, V53, Y62 und V64.

Die dichte Packung der dimeren NAC-Domäne und die Konservierung der hydrophoben Interaktionsfläche der Untereinheiten impliziert, dass homodimeres NAC auch die *in vivo* vorkommende Spezies ist. Interessanterweise zeigt die Kristallstruktur des $\Delta 18$ -aeNAC die Bildung eines Tetramers im Kristall. Zwei Homodimere interkalieren, wie in Abbildung 24 dargestellt, hauptsächlich über die Linker-Bereiche zwischen NAC-Domäne und UBA-Domäne und bilden einen erstaunlich grossen kristallographischen Kontakt mit einer *buried surface area* (BSA) von 1714\AA^2 und 11 Wasserstoffbrücken (siehe Referenzen für Definition der BSA). Über die beiden β -

Faltblatt-Oberflächen der NAC-Domänen werden dabei keine Kontakte ausgebildet. Die Grösse der Dimer – Dimer Interaktionsfläche alleine lässt vermuten, dass das Tetramer die biologische Einheit in Lösung sein könnte.

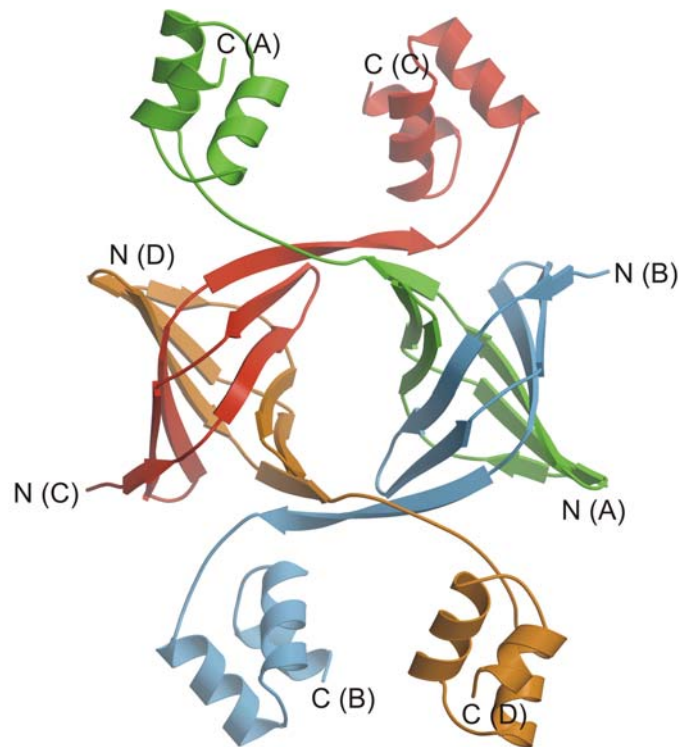


Abbildung 24 Struktur von $\Delta 18$ -aeNAC im Kristall. Dargestellt ist das im Kristall vorliegende Tetramer von $\Delta 18$ -aeNAC. Jedes Monomer (A - D) ist in einer eigenen Farbe gezeigt und die N- bzw. C-Termini der einzelnen Untereinheiten sind indiziert.

Um die biologische Relevanz von Dimer und Tetramer zu testen, wurde Analytische Ultrazentrifugation mit $\Delta 18$ -aeNAC in Lösung (20 mM Tris pH 7,5; 150 mM KCl) durchgeführt. Die Ergebnisse der Analytischen Ultrazentrifugation ergaben eine ungefähre Dissoziationskonstante von 4 μM für das Monomer – Dimer Gleichgewicht und eine Konstante von etwa 300 μM für das Dimer – Tetramer Gleichgewicht. Das Homodimer scheint nach diesen Ergebnissen die biologisch relevante Form des $\Delta 18$ -aeNAC in Lösung zu sein. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es im besonderen zellulären Kontext, wie beispielweise am Ribosom, zu einer Verschiebung des Gleichgewichts kommen kann.

Eigenschaften und mögliche Funktion der NAC-Domäne

Die homodimere NAC-Domäne bildet eine neuartige abgeflachte β -Fass-Struktur mit zwei strukturell ähnlichen, konkaven β -Faltblatt-Oberflächen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Oberflächen der NAC-Domäne stellt sich die Frage inwieweit diese beiden konkaven β -Faltblatt-Oberflächen unterschiedliche charakteristische Eigenschaften besitzen und möglicherweise andere Funktionen wahrnehmen.

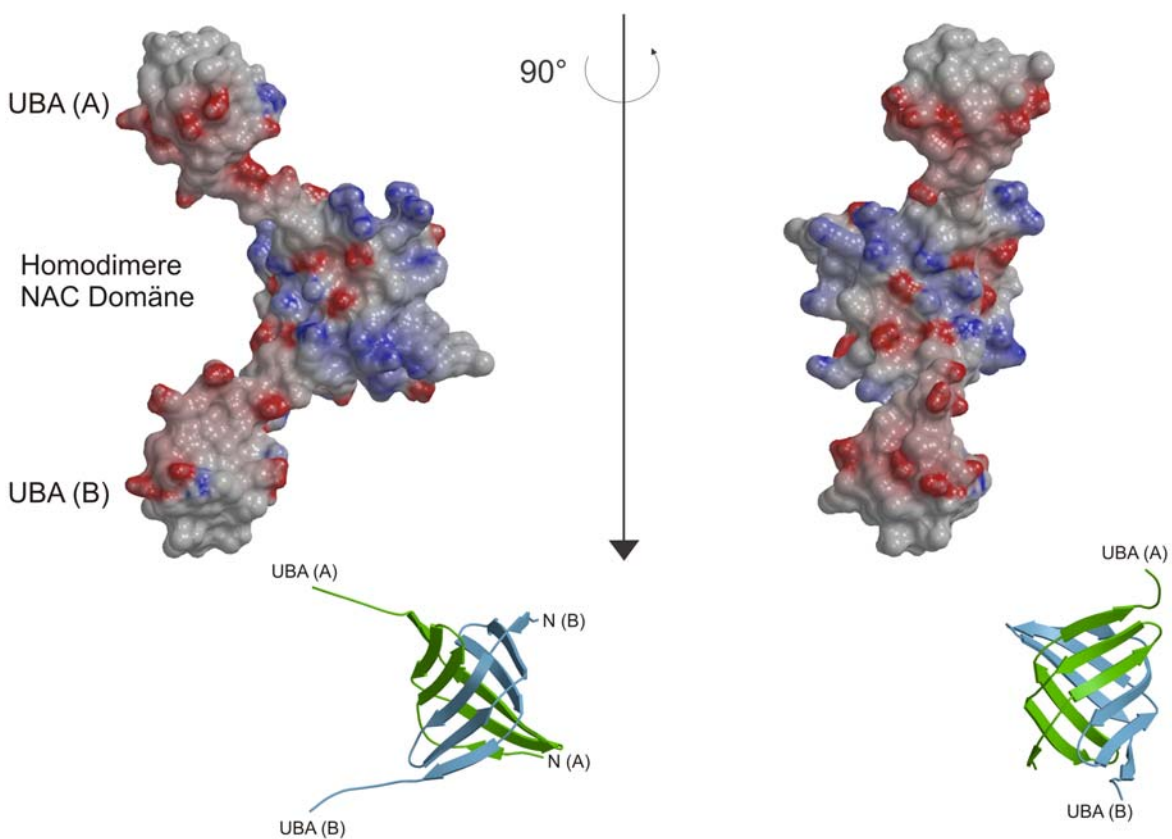


Abbildung 25 Repräsentation der Oberflächenladung von $\Delta 18$ -aeNAC. Negative Ladungen sind in Rot, positive Ladungen in Blau illustriert. Das auf der linken Seite dargestellte $\Delta 18$ -aeNAC Homodimer ist äquivalent zu Abbildung 20 orientiert, die Orientierung wird durch die unterhalb der Oberflächenrepräsentation gezeigten Darstellungen verdeutlicht. Auffällig ist das Band an positiven Ladungen, das von links oben nach rechts unten schräg über die β -Fass-Struktur verläuft.

Die Analyse der Oberflächenladung der $\Delta 18$ -aeNAC Struktur zeigt eine Anhäufung von positiv geladenen Aminosäuren auf der Seite der NAC-Domäne, die

den UBA-Domänen zugewandt ist. Die positiv geladenen Aminosäuren sind in einem langen Strang schräg über die konkave Oberfläche der NAC-Domäne angeordnet und wären möglicherweise in der Lage das negativ geladene Phosphat-Rückgrat von ribosomaler RNA zu binden (siehe Abbildung 25).

Eine Suche nach strukturell ähnlichen Proteinen mit dem DALI Algorithmus gegen die PDB liefert für die dimere NAC-Domäne als Suchmodell keine signifikanten Ergebnisse (Holm und Sander, 1993). Dennoch zeigt die konkave β -Faltblatt-Oberfläche, die den N-Termini der NAC-Domäne zugewandt ist (entsprechend der rechten Seite der Struktur in Abbildung 20) eine Ähnlichkeit zum Oligonucleotide/Oligosaccharide Binding – Fold (OB-Fold) und besonders zu dessen charakteristischer Liganden-Bindungs-Oberfläche. Unter den OB-Folds ist die Familie der Nukleinsäure-bindenden OB-Folds die grösste und zeichnet sich durch eine konservierte Liganden-Bindungs-Oberfläche aus, die charakteristische hydrophobe Aminosäuren exponiert, welche für die spezifische Bindung der unterschiedlichen Liganden relevant sind (für Übersicht zu OB-Folds siehe Arcus, 2002; Theobald et al., 2003).

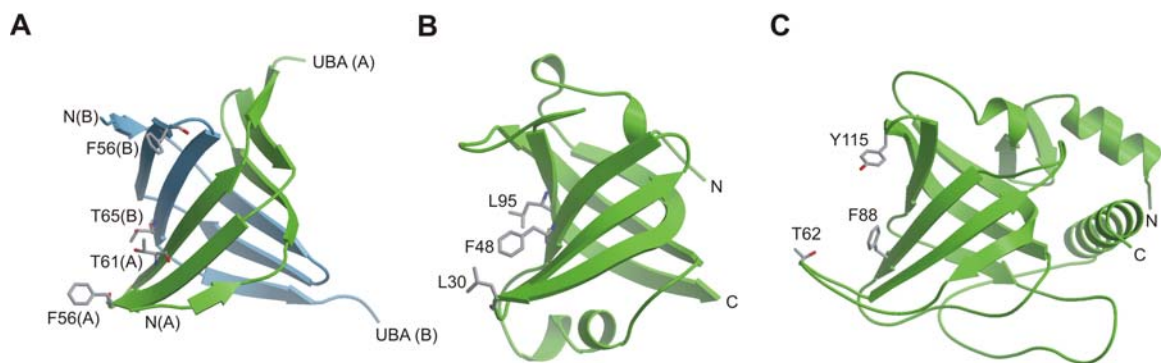
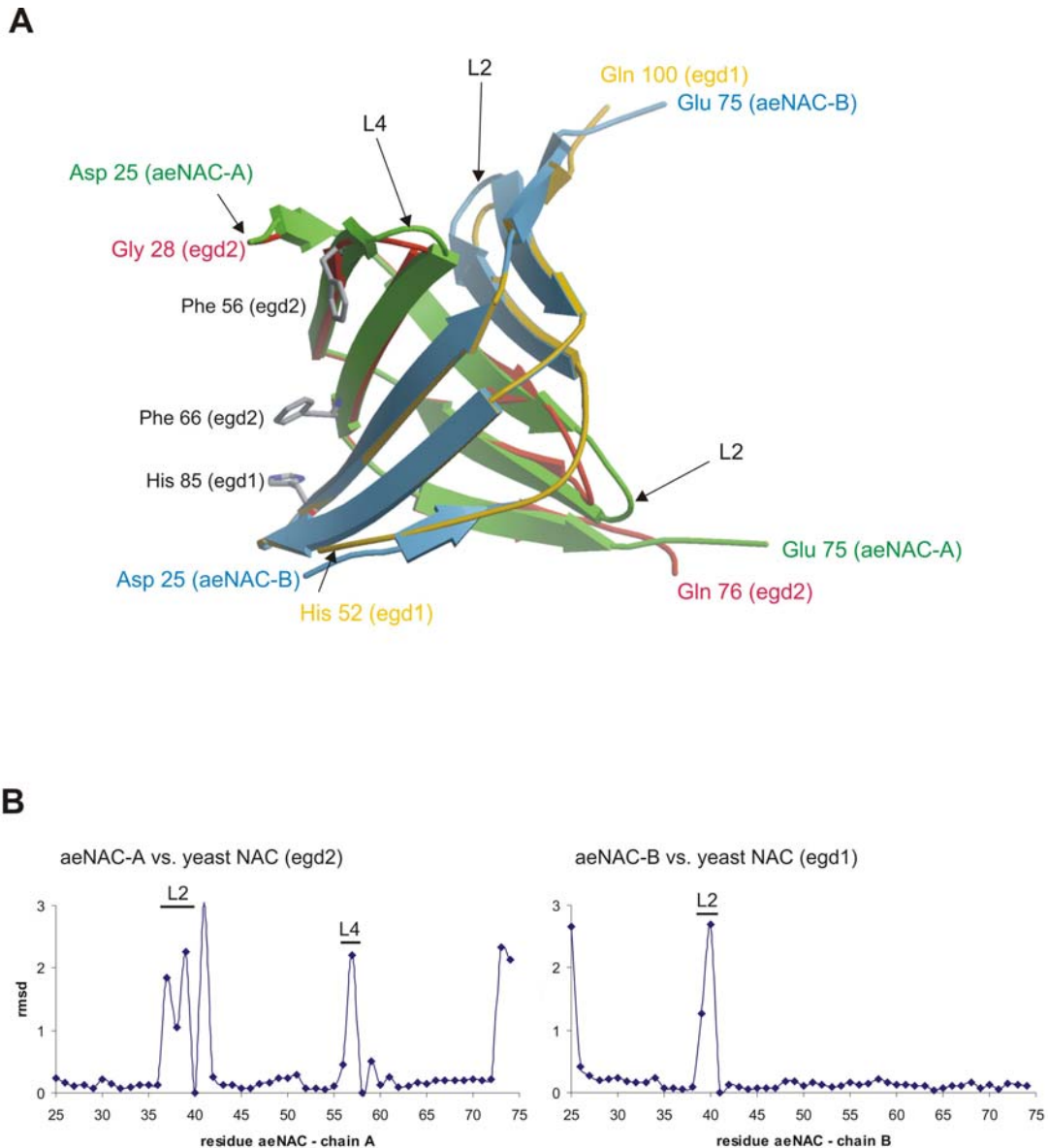


Abbildung 26 Vergleich der Oberfläche der NAC-Domäne mit dem Nukleinsäure bindenden OB-Fold. **A** Darstellung der charakteristischen Eigenschaften der, den N-Termini zugewandten konkaven β -Faltblatt-Oberfläche der NAC-Domäne von $\Delta 18$ -aeNAC. Die Struktur ist im Vergleich zu Abbildung 20 um 180° gedreht und die UBA-Domänen zeigen in dieser Orientierung vom Betrachter weg nach rechts hinten. **B** Struktur des OB-Fold von Aspartyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli*, welche den kanonischen OB-Fold repräsentiert (Eiler et al., 1999; Rees et al., 2000). **C** Struktur der N-terminalen Domäne des Protection of Telomeres 1 Proteins (Pot1) aus *S. pombe* (Lei et al., 2003). Die Seitenketten der für die Nukleinsäure-Bindung der OB-Folds aus AsptRS und Pot1 als essentiell identifizierten Aminosäuren sind in grau eingezeichnet.

Abbildung 26 zeigt den Vergleich der Oberfläche der NAC-Domäne von aeNAC zu den repräsentativen OB-Folds von Aspartyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* und Protection of Telomeres 1 Proteins (Pot1) aus *Schizosaccharomyces pombe*. Der Vergleich zeigt eine Ähnlichkeit der konkaven Oberfläche der NAC-Domäne und der Liganden-Bindungs-Oberfläche der OB-Folds in der Topologie und der charakteristischen Verteilung von hydrophoben exponierten Seitenketten.

Die Analyse der Eigenschaften der NAC-Domäne von $\Delta 18$ -aeNAC und der beiden strukturell ähnlichen, konkaven β -Faltblatt-Oberflächen zeigt, dass die beiden konkaven Oberflächen charakteristische Merkmale zeigen, die möglicherweise eine Rolle in der Interaktion mit ribosomaler RNA spielen könnten. Darüber hinaus lässt sich aber nur spekulieren, inwiefern die konkaven Oberflächen der dimere NAC-Domäne von $\Delta 18$ -aeNAC zur Interaktion von aeNAC mit dem Ribosom beitragen.

Die homodimere Faltung und die Bildung des Dimers über die NAC-Domänen impliziert andererseits, dass eukaryontisches α - und β -NAC ebenfalls über deren NAC-Domänen dimerisiert. Um diese Hypothese zu testen wurde ein Homologie-Modell für die eukaryontische heterodimere NAC-Domäne aus Hefe (egd2-egd1) ausgehend von der Struktur von $\Delta 18$ -aeNAC, berechnet. Das Homologie-Modell stützt die These, dass heterodimeres, eukaryontisches $\alpha\beta$ -NAC über die NAC-Domänen dimerisiert und zeigt darüber hinaus in Analogie zu $\Delta 18$ -aeNAC exponierte, hydrophobe Aminosäuren auf der β -Faltblatt-Oberfläche der dimeren NAC-Domäne (siehe Abbildung 27).

**Abbildung 27**

Überlagerung der homodimeren NAC-Domäne von $\Delta 18$ -aeNAC und einem Homologie-Modell der heterodimeren NAC-Domäne von Hefe NAC (egd2-egd1). Das Homologie-Modell wurde mit dem Programm SWISS-MODEL und der aeNAC Struktur als Templat berechnet, nachdem die Sequenzen gegen die Konsensus-Sequenz der NAC-Domäne nach der CDD (Conserved Domain Database) orientiert worden waren.

A Überlagerung des Homologie-Modells und der $\Delta 18$ -aeNAC Struktur. Die $\Delta 18$ -aeNAC Struktur ist in blau/grün illustriert und das Homologie in rot (egd2) und gelb (egd1). Das Homologie-Modell zeigt in Analogie zur $\Delta 18$ -aeNAC Struktur konservierte hydrophobe Reste an der Oberfläche (in grau eingezeichnet) **B** Die zu A korrespondierenden rms-Abweichungen der $\Delta 18$ -aeNAC Struktur und des Homologie-Modells. Die Hauptabweichungen sind in den Schleifenbereichen und beeinflussen deshalb die Dimerfaltung nicht.

Die Präsenz einer regulatorischen UBA-Domäne in dem Ribosom-assoziierten Faktor NAC bietet interessante Schlussfolgerungen. Beispielsweise wurde für das Protein Rad23, das in den Ubiquitin-vermittelten Abbau von Proteinen durch das Proteasom involviert ist, postuliert, dass die UBA-Domänen von Rad23 mit dem Proteasom um Substrate konkurrieren und dadurch den Ubiquitin-vermittelten Abbau verhindern und die Substrate stabilisieren (Raasi und Pickart, 2003). NAC, das in unmittelbarer Umgebung der wachsenden, noch nicht vollständig gefalteten Polypeptidkette positioniert ist, könnte über seine UBA-Domäne eine ähnliche Funktion erfüllen. Für diese mögliche Funktion von NAC spricht die Beobachtungen der kotranslationalen Ubiquitinierung der naszierenden Polypeptidkette und der daraus abgeleiteten Hypothese einer Ribosomen-gebundenen Ubiquitin-Ligase (Schubert et al., 2000; Turner und Varshavsky, 2000). Ob NAC tatsächlich die Ubiquitinierung von wachsenden Polypeptidketten am Ribosom verhindern kann, lässt sich nur durch weitere biochemische Versuche beantworten.

Kürzlich wurde festgestellt, dass die UBA-Domäne von Hefe NAC keine messbare Assoziation mit Ubiquitin zeigt (B. Beatrix persönliche Mitteilungen; Raasi et al., 2005). Raasi et al. beobachteten allerdings ebenfalls, dass es eine grosse Gruppe (~30%) der UBA-Domänen gibt, die keine direkte Assoziation mit Ubiquitin zeigen, die aber dennoch eine konservierte regulatorische Funktion besitzen. Diese Ergebnisse schließen damit eine Rolle der UBA-Domäne von NAC in der Kontrolle der kotranslationalen Ubiquitinierung nicht aus.

3.4.2 Modell für wt - aeNAC

Die Kristallstruktur von $\Delta 18$ -aeNAC präsentiert die Aminosäuren 25 – 117. Die N-terminalen 24 Aminosäuren, die zu einem Teil (aa 1-12) wahrscheinlich einen N-terminalen Schleifen-Bereich bilden und zum anderen Teil (aa 14-24) zur konservierten NAC-Domäne gehören, sind in der Kristallstruktur nicht vorhanden bzw. ungeordnet. Da für die genauere Analyse möglicher Struktur – Funktions Beziehungen auf die in der Kristallstruktur fehlenden N-terminalen Reste nicht verzichtet werden kann, wurde mittels Homologie-Modellierung bzw. Faltungserkennung versucht ein Modell für diese Reste zu entwickeln (siehe Methoden Abschnitt 2.8.2). Die wahrscheinlichsten Lösungen der Faltungserkennung deuten darauf hin, dass die ersten

12 Aminosäuren ungeordnet vorliegen und Aminosäuren 14 – 22, die zur konservierten NAC-Domäne gehören, eine α -helikale Struktur ausbilden. Mit dieser Vorhersage lässt sich ein Modell für das komplette homodimere aeNAC, entsprechend Abbildung 29 darstellen.

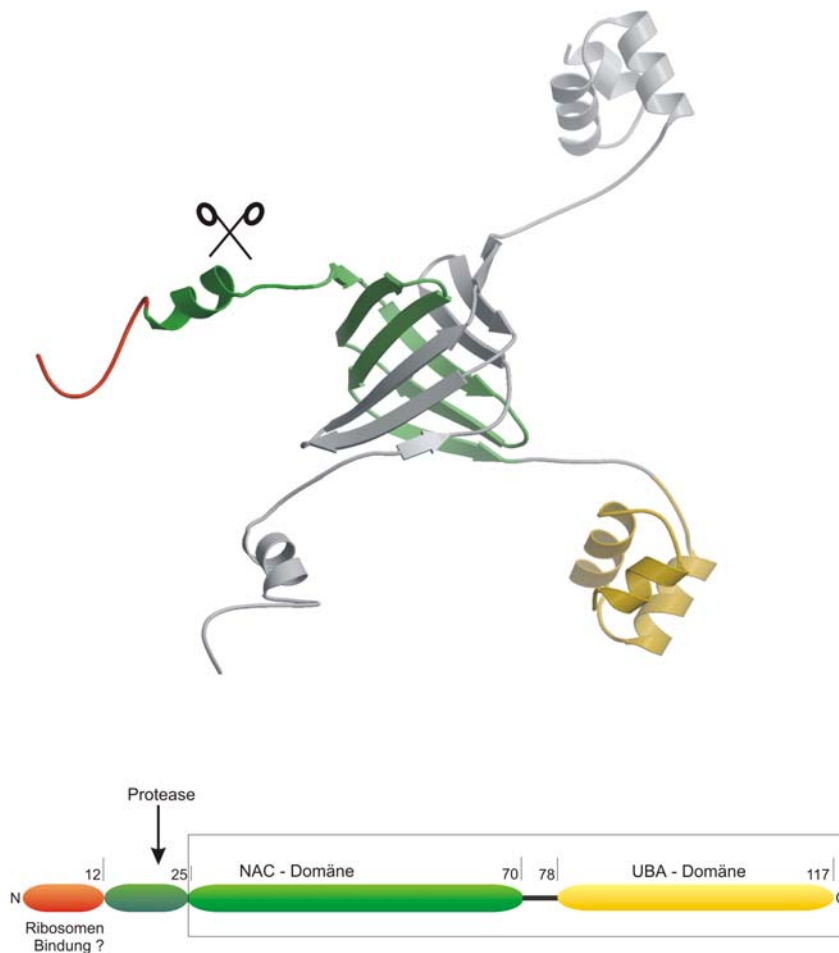


Abbildung 29 Modell für wt - aeNAC. Die Struktur zeigt die Kristallstruktur von $\Delta 18$ -aeNAC und das Modell für die N-terminalen 23 Aminosäuren. Die symbolisierte Schere zeigt die Schnittstelle der limitierten Proteolyse und den N-Terminus des kristallisierten Konstruktes. Die schematische Darstellung repräsentiert die Domänenstruktur von aeNAC; der Bereich der Kristallstruktur ist mit einem Kasten gekennzeichnet.

Die Aussagen eines solchen Modells sind sicher nur begrenzt, da die Methoden der Strukturvorhersage fehlerbehaftet sind. Es wäre damit durchaus möglich, dass der kurze N-terminale Bereich bei Komplexierung entsprechender Bindungspartner, wie beispielsweise dem Ribosom, eine unterschiedliche Struktur

ausbildet. Interessant ist aber, dass die in der Kristallstruktur fehlende N-terminale 12 Aminosäuren der hoch konservierten NAC-Domäne (Reste 12-24, in Abbildung 29 dunkelgrün dargestellt), in der Lage sind eine amphipathische α -Helix auszubilden, die auf der hydrophoben Seite 5 Methionine trägt. Die Vorzugskonformation und Orientierung dieser möglichen α -Helix zur β -Faltblatt-Oberfläche der NAC-Domäne lässt sich nicht ohne weiteres festlegen und ist höchstwahrscheinlich auch von einem möglichen Bindungspartner abhängig. Es lässt sich aber feststellen, dass dieser Bereich der NAC-Domäne zwar eine hohe Flexibilität besitzt, aber weder eine Wechselwirkung miteinander noch eine spezifische Wechselwirkung zur β -Fass-Oberfläche eingeht. Dafür spricht, dass homodimeres wt- aeNAC im Gegensatz zum Δ 18-aeNAC stark unlöslich ist und genau an der flexiblen Stelle der N-terminalen α -Helix proteolytisch geschnitten wird (siehe Abbildung 29).

Wie bereits erwähnt, kann für eine funktionelle Analyse sowohl der NAC-Domäne als auch von wt-aeNAC der fehlende N-Terminus nicht vernachlässigt werden. Der Vergleich von aeNAC mit heterodimerem eukaryontischem NAC, von dem bekannt ist, dass der N-Terminus von β -NAC die Bindung ans Ribosom vermittelt, lässt vermuten, dass der N-Terminus von aeNAC möglicherweise eine analoge Funktion erfüllt. Bisher konnte die Funktion des N-Terminus von aeNAC biochemisch aufgrund fehlender eindeutiger Versuche noch nicht bestätigt werden.

Die Kristallstruktur von Δ 18-aeNAC präsentiert die erste Struktur eines NAC und der hoch konservierten NAC-Domäne, die keinerlei Homologie zu anderen Faltungen und Proteinen zeigt. Die Struktur alleine lässt, auch aufgrund fehlender Homologien, keinen eindeutigen Schluß über die genaue strukturelle Funktion von NAC und der NAC-Domäne zu, sie ermöglicht aber neue Ansatzpunkte und daraus resultierende weitere Versuche zur Entschlüsselung der Funktion von sowohl archabakteriellem als auch eukaryontischem NAC. Die Struktur bildet die Grundlage für weitere strukturelle und Struktur-basierte Untersuchungen des eukaryontischem NAC und aeNAC, aber auch für weitergehende biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle der UBA-Domäne oder der konservierten Reste auf der Oberfläche der NAC-Domäne, die aber nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

3.5 Kristallstruktur der konservierten NAC-Domäne von heterodimerem humanem $\alpha\beta$ -NAC

3.5.1 Expression, Reinigung und Kristallisation von heterodimerem humanem $\alpha\beta$ -NAC

Die homodimere konservierte Faltung der NAC-Domäne von aeNAC impliziert eine ähnliche Faltung des heterodimeren eukaryontischen NAC und die Dimerisierung von α und β über deren NAC-Domänen. Die $\Delta 18$ -aeNAC Kristallstruktur ermöglichte so eine Aussage über den konservierten, strukturierten Kern von eukaryontischem $\alpha\beta$ -NAC und damit die genauere Planung von weiteren Konstrukten zur strukturellen Untersuchung von heterodimerem eukaryontischem $\alpha\beta$ -NAC. Abbildung 30 zeigt den Vergleich von aeNAC und humanem NAC mit der vorhergesagten Sekundärstruktur und den möglichen Bereichen intrinsischer Unordnung (siehe auch Abschnitt 3.1, Abbildung 12). Davon ausgehend wurden verschiedene Konstrukte geplant, die einen möglichst großen Anteil an strukturierten Elementen enthielten und somit als geeignet für die Kristallisation erschienen. Die verschiedenen verkürzten $\alpha\beta$ -NAC Varianten wurden mit sehr unterschiedlicher Ausbeute exprimiert und wurden daher in Bezug auf die effektive Koexpression des heterodimeren Komplexes optimiert. Als entscheidend für die erfolgreiche Koexpression erwies sich die Orientierung der für die α bzw. β Untereinheiten kodierenden Gene und das Vorhandensein einer Ribosom-Bindung-Stelle (RBS) vor dem *downstream* liegenden Gen. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der Reinigung und Kristallisationsversuche der erfolgreich koexprimierten Gene zusammen.

In Analogie zum heterodimeren wt- $\alpha\beta$ -NAC, das ausführlich im Abschnitt 3.1 beschreiben ist, ließen sich alle Konstrukte, deren Sequenzen für beide Untereinheiten über die NAC-Domäne hinausgingen, gut aufreinigen und ebenfalls gut ankonzentrieren. Die Kristallisationsversuche zeigten allerdings in allen Fällen das für wt- $\alpha\beta$ -NAC beschriebene Phänomen eines glasartigen Niederschlags (siehe Anhang 6.2).

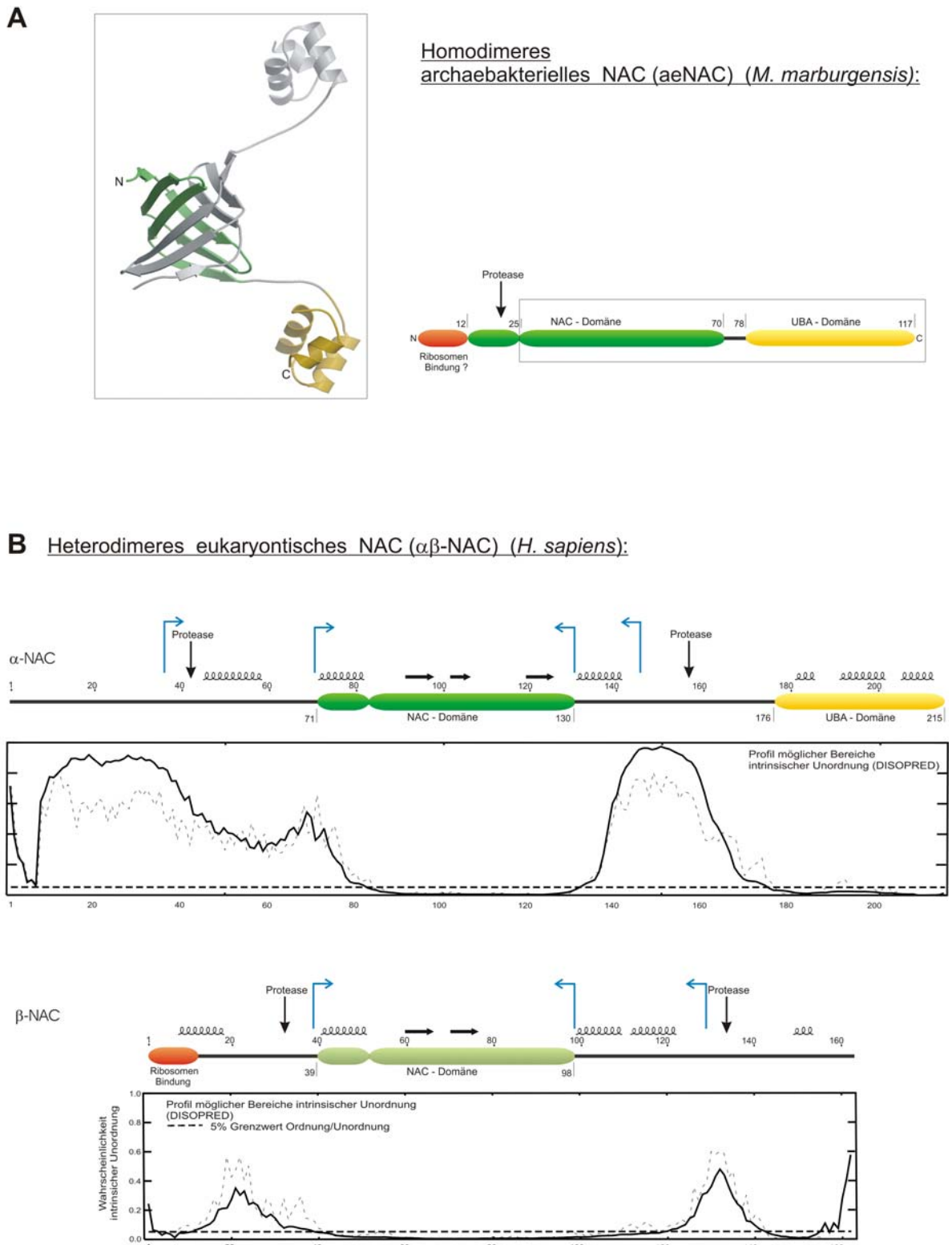


Abbildung 30

Vergleich von homodimerem aeNAC und heterodimerem humanem NAC zur Darstellung der möglichen Domänenstruktur von humanem $\alpha\beta$ -NAC.

A Schematische Darstellung der Domänenstruktur von aeNAC und entsprechende Darstellung der Kristallstruktur von $\Delta 18$ -aeNAC. **B** Übersicht über die konservierten Domänen, die vorhergesagte Sekundärstruktur, die möglichen Bereiche intrinsischer Unordnung (berechnet nach DISOPRED) und den bekannten Protease-Schnittstellen (siehe Abschnitt 3.1) für α - und β -NAC. Die für die Planung weiterer Konstrukte gewählten Domänengrenzen sind durch die blauen Pfeile gekennzeichnet.

Tabelle 5 Auswahl der erfolgreich koexprimierten und zur Kristallisation verwendeten Konstrukte von heterodimerem humanem $\alpha\beta$ -NAC (siehe auch Abbildung 30). Die Konstrukte wurden alle wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, in den Vektor pET28a (Novagen) mit N-terminalem HisTag und Thrombin Schnittstelle kloniert und in den *E. coli* Stämmen ER2566 (NEB) oder Rosetta(DE3) (Novagen) exprimiert. Die Ergebnisse der Reinigung und der Kristallisationsversuche sind zusammengefasst.

Konstrukte:		Klonierung – Orientierung der Gene	Expression / Reinigung	Kristallisation
α NAC	β NAC			
1 - 215	WT - NAC: 1 - 162	pET28a, HisTag an α , RBS vor β	Expression in ER2566, hohe Expressionsrate, hohe Löslichkeit, Protease-sensitiv	Keine Keimbildung, Phasenseparation und Glasbildung
1 - 215	38 - 162	s.o.	s.o.	s.o.
1 - 215	38 - 130	s.o.	s.o.	s.o.
35 - 145	38 - 162	s.o.	Expression in ER2566, mittlere Expressionsrate, hohe Löslichkeit, Protease-sensitiv	s.o.
35 - 145	38 - 130	s.o.	Expression in ER2566, mittlere Expressionsrate, hohe Löslichkeit, Protease-sensitiv	s.o.
71 - 145	38 - 162	s.o.	Expression in ER2566, mittlere Expressionsrate, hohe Löslichkeit, geringere Protease-Sensitivität	s.o.
71 - 145	38 - 130	s.o.	s.o.	s.o.
71 - 130	38 - 98	pET28a, HisTag an β , RBS vor α	Expression in Rosetta(DE3), mittlere Expressionsrate, geringe Löslichkeit,	Niederschlag, Kristalle

Das Konstrukt α NAC(71-130) – β NAC(38-98), das nur die NAC-Domäne von humanem $\alpha\beta$ -NAC umfasst (Vergleiche Abbildung 30), war im Gegensatz zu allen längeren heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC Konstrukten nicht gut löslich. Es konnte mit N-terminalem HisTag in ausreichender Menge in löslicher Form exprimiert werden, nach dem ersten Aufreinigungsschritt und dem Thrombinverdau präzipitierte ein Großteil des Komplexes innerhalb weniger Stunden. Es war nur mögliche das Protein durch Zusatz

von Detergenz, in diesem Fall 1 mM LDAO (Lauryldimethylamin-Oxid), zu stabilisieren. Andere Zusätze, wie Salze, Metallionen, Aminosäuren oder Zucker bewirkten nur eine minimal erhöhte Löslichkeit. Die Kristallisationsansätze des durch Detergenz stabilisierten Komplexes ergaben keine Kristallisationskeime.

3.5.2 Kristallisation und Strukturbestimmung der heterodimeren NAC-

Domäne von $\alpha\beta$ -NAC

Die Ergebnisse der Reinigung und Kristallisationsversuche der unterschiedlichen verkürzten $\alpha\beta$ -NAC Konstrukte zeigen, dass die heterodimere NAC-Domäne vom $\alpha\beta$ -NAC alleine wenig löslich ist, sich aber nach der Stabilisierung mit Detergenz nicht kristallisieren lässt. Jedes weitere Konstrukt, das über die NAC-Domäne hinaus verlängert ist, ist gut löslich, scheint dagegen aber so flexibel zu sein, dass eine Kristallisation wahrscheinlich nur mit dem entsprechenden Bindungspartner möglich ist.

Trotz der geringen Löslichkeit des Konstruktes α NAC(71-130) – β NAC(38-98), konnte der Komplex kristallisiert werden, indem die Reinigungsschritte direkt nacheinander durchgeführt wurden und die Kristallisationsversuche unmittelbar nach der Konzentration des aufgereinigten Komplexes angesetzt wurden. Die anfänglich erhaltenen Kristalle konnten nur schwer reproduziert und optimiert werden (siehe Abbildung 31). Dennoch konnten die Kristalle vermessen und am BESSYII ein Datensatz mit 3.15Å Auflösung aufgenommen werden.

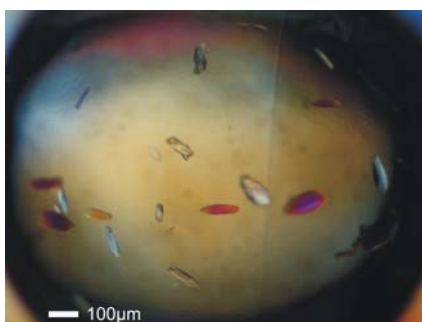


Abbildung 31 Kristalle der heterodimeren NAC-Domäne von $\alpha\beta$ -NAC aus *H. sapiens* [α NAC(71-130) – β NAC(38-98)]. Die Kristalle wurden in 100 mM HEPES (pH 7,5) und 2,0 M Ammoniumsulfat im sitzenden Tropfen nach der Dampdiffusionsmethode erhalten. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 9 mg/ml.

Die Kristalle wurden vor der Datenaufnahme in Cryopuffer von 100 mM HEPES (pH 7,5), 2,5 M Ammoniumsulfat und 15% Glycerin überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die nativen Daten wurden an der BL2 am BESSYII, Berlin bei einer Wellenlänge von 0,95 Å aufgenommen. Als problematisch bei der Datensammlung erwies sich die geringe Streukraft der sehr kleinen Kristalle über den gesamten Auflösungsbereich (siehe $I/\sigma(I)$ in Tabelle 6).

Tabelle 6 Zusammenfassung der kristallographischen Statistiken der Datensammlung und Verfeinerung. Die Daten wurden mit dem Programm XDS integriert und skaliert. Die Lösung des Molekularen Ersatzes wurde mit dem Programm PHASER gefunden, mit DM Elektronendichtemodifikation durchgeführt und das Modell wurde durch manuelles Bauen mit Coot und Verfeinerung mit CNS und Refmac5 vervollständigt.

Raumgruppe	P6 ₁ 22
Zellkonstanten (a, b, c, / Å)	76,8 76,8 100,19
Datensammlung	
Auflösung (Å)	20 – 3,15
Vollständigkeit (%) ^a	99,8 (99,7) ^a
R _{merge} (%) ^{a,b}	19,8 (53,2)
R _{p.i.m.} (%) ^{a,c}	5,3 (15,2)
$I/\sigma(I)$ ^a	4,0 (1,36)
Redundanz	16,8
Verfeinerung	
R (%)	26,7
R _{free} (%)	31,0
Durchschnittlicher B Faktor (Å ²)	22,4
Lösungsmittelgehalt (%)	67,6
Rmsd Bindungslängen (Å)	0,011
Rmsd Bindungswinkel (°)	1,4

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale (3.2 – 3.15 Å).

^b $R_{\text{sym}} = (\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|) / (\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl}))$

^c $R_{\text{p.i.m.}} = (\sum_{\text{hkl}} [1/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|) / (\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl}))$, für detaillierte Diskussion siehe (Weiss, 2000)

Da sich die Kristalle aber als stabil erwiesen, konnte ein hoch redundanter Datensatz (bis zu 20-facher Redundanz) aufgenommen werden und damit die Genauigkeit der gemessenen Reflexe trotz des geringen Signal zu Rausch Verhältnisses $[I/\sigma(I)]$ erheblich verbessert werden, was sich in der Darstellung der verschiedenen R-Faktoren zeigt (Der R_{sym} erhöht sich artifiziell mit zunehmender Redundanz, obwohl die Qualität der Daten sich verbessert; der $R_{\text{p.i.m.}}$ repräsentiert im Gegensatz zum R_{sym} einen Redundanz reduzierten R-Faktor und ist deshalb ein besseres Maß zur Beurteilung der Qualität von hoch redundant gemessenen Daten; für eine detaillierte Diskussion der Berechnung und Analyse von R-Faktoren siehe Weiss, 2000). Die Struktur konnte mit der Methode des Molekularen Ersatzes mit dem Programm PHASER (Storoni et al., 2004) und einem Polyalanin-Modell der homodimeren archaebakteriellen NAC-Domäne, an dem die Schleifenbereiche entfernt wurden, gelöst werden. Die kristallographischen Statistiken sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

3.5.3 Kristallstruktur der konservierten heterodimeren NAC-Domäne von $\alpha\beta$ -NAC

Die Kristallstruktur der heterodimeren NAC-Domäne von $\alpha\beta$ -NAC aus *H. sapiens* präsentiert den hoch konservierten Kern des eukaryontischen $\alpha\beta$ -NAC und zeigt eine zu homodimerem aeNAC analoge β -Fass-Struktur (siehe Abbildung 32). Trotz des heterodimeren Charakters bildet eukaryontisches NAC die gleiche aussergewöhnliche Dimerfaltung und Topologie wie homodimeres aeNAC aus. In der Kristallstruktur ist außerdem der N-terminale α -helikale Bereich der NAC-Domäne sichtbar, der im kristallisierten $\Delta 18$ -aeNAC Konstrukt, aufgrund der Unlöslichkeit des wt-aeNAC entfernt wurde. In der Kristallstruktur sind die Aminosäuren 76 – 129 der α Untereinheit und die Aminosäuren 43 – 93 der β Untereinheit sichtbar, die fehlenden Reste liegen im Kristall ungeordnet vor.

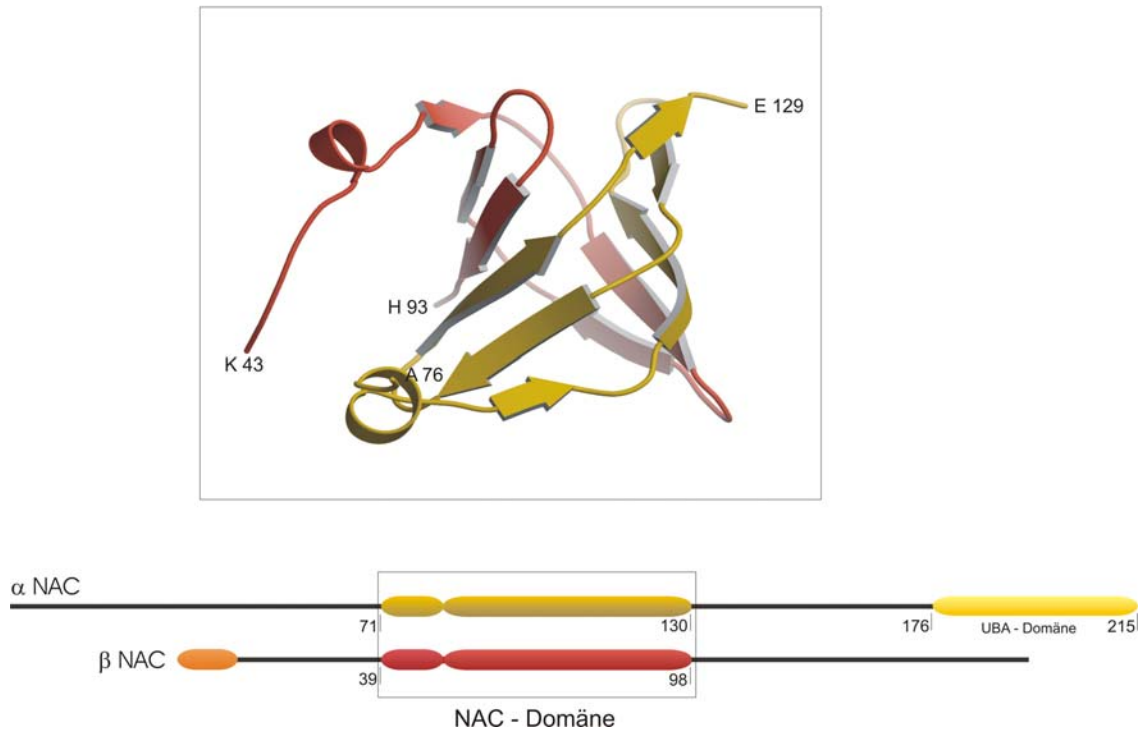


Abbildung 32 Kristallstruktur der konservierten heterodimeren NAC-Domäne von $\alpha\beta$ -NAC aus *H. sapiens*. Die in Rot dargestellte Polypeptidkette entspricht β -NAC bzw. die in Gelb dargestellte Polypeptidkette α -NAC. Das korrespondierende Diagramm der Domänenstruktur verdeutlicht den kristallisierten Bereich der Gesamtstruktur von $\alpha\beta$ -NAC. Die in der Struktur markierten Aminosäuren entsprechen dem in der Kristallstruktur sichtbaren Bereich und kennzeichnen die entsprechenden N- bzw. C-terminalen Reste.

Die Überlagerung der β -Fass-Struktur der dimeren NAC-Domäne von humanem und aeNAC zeigt die hauptsächlichen Abweichungen bzw. Insertionen in den Schleifen-Bereichen der NAC-Domänen (siehe Abbildung 33). Die heterodimere eukaryontische NAC-Domäne präsentiert die analoge charakteristische β -Fass-Faltung der NAC-Domäne mit zwei konkaven β -Faltblatt-Oberflächen auf den beiden Seiten des abgeflachten β -Fasses. Abgesehen von der Gesamtfaltung scheint somit die Konformation der konkaven β -Faltblatt-Oberflächen der NAC-Domäne konserviert zu sein, während die Schleifen-Bereiche stärkerer Variation unterliegen.

Neben dem dimeren β -Fass ist in der Kristallstruktur auch der ebenfalls hoch konservierte N-terminale α -helikale Bereich der NAC-Domäne für die α und β Untereinheit zu sehen, der in der Struktur von $\Delta 18$ -aeNAC fehlt. Die Struktur zeigt damit erstmals ein Bild der kompletten, hoch konservierten NAC-Domäne und erlaubt eine weitergehende Analyse möglicher Struktur – Funktions Beziehungen.

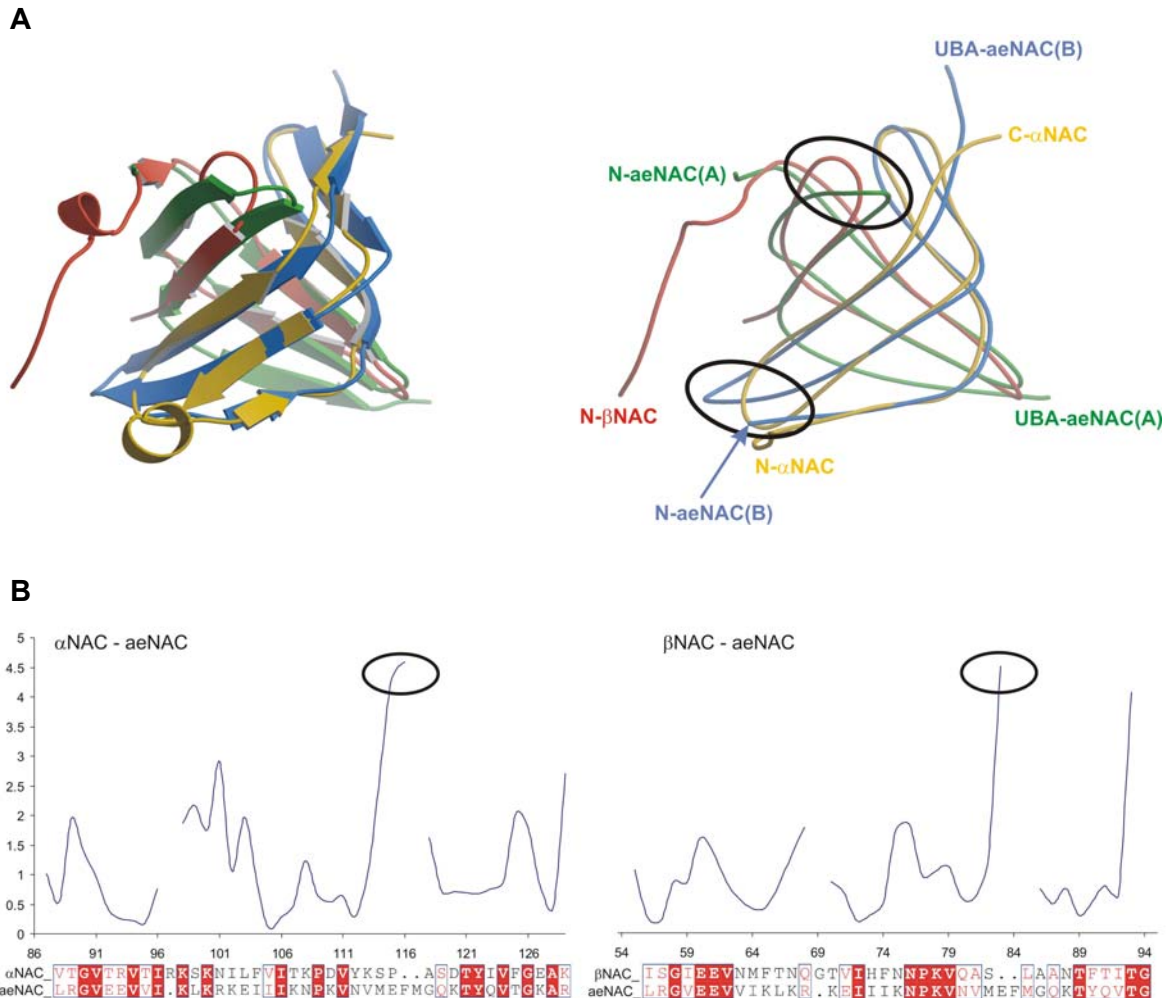


Abbildung 33 Überlagerung der Kristallstrukturen von homodimerem $\Delta 18$ -aeNAC und heterodimerem humanem $\alpha\beta$ -NAC. Abbildung **A** zeigt die überlagerten Strukturen; die Untereinheiten des homodimeren aeNAC sind in Grün bzw. Blau gezeigt, α -NAC ist in Gelb und β -NAC in Rot illustriert. Die Schleifen-Bereiche, die die größte Abweichung zeigen sind in Schwarz markiert **B** Der Graph gibt die rms-Abweichungen in Å der C_{α} Atome der überlagerten Strukturen an. Auf der Abszisse sind die überlagerten Aminosäuren von humanem bzw. aeNAC aufgetragen und deren Konservierung durch roten Hintergrund indiziert, die angegebene Nummerierung der Aminosäuren entspricht der der humanen NAC Untereinheiten. Die Unterbrechung der Kurven kommt durch die im Sequenzvergleich indizierten Insertionen zustande, die aber nur in wenig konservierten Schleifen-Bereichen sind.

Die N-terminalen Aminosäuren der NAC-Domäne, sowohl der α als auch der β Untereinheit bilden anschließend an die β -Fass-Struktur eine kurze amphipatische α -Helix aus. Diese beiden konservierten N-terminalen α -Helices der NAC-Domäne falten interessanterweise in eine sehr ähnliche Struktur und sind an der zur konkaven β -Faltblatt-Oberfläche zugewandten Seite hydrophob und an der andere Seite positiv geladen (siehe Abbildung 34).

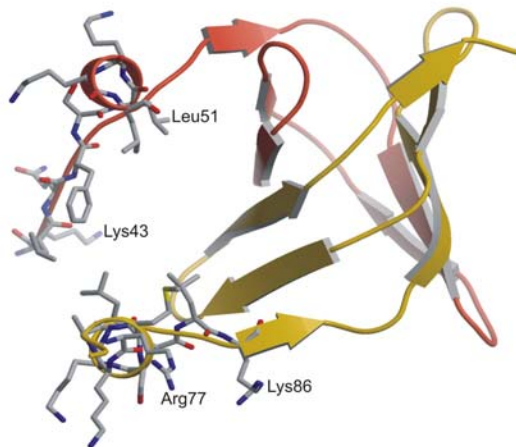


Abbildung 34 Charakteristika der N-terminalen α -Helices der humanen NAC-Domäne. Die Abbildung zeigt die Kristallstruktur der humanen NAC-Domäne. Die N-terminalen Aminosäuren der α - und β -NAC sind in Grau eingezeichnet. Die Hauptkette von β -NAC ist in Rot, die von α -NAC in Gelb dargestellt.

Die präsentierte Kristallstruktur ermöglicht somit erstmals eine Analyse des konservierten N-terminalen, α -helikalen Bereichs der NAC-Domäne, der in der Struktur von $\Delta 18$ -aeNAC nicht vorhanden ist. Schwierig ist allerdings eine Aussage über die tatsächliche bzw. biologisch aktive Konformation der N-terminalen α -Helices. Mit hoher Wahrscheinlichkeit falten die N-terminalen Aminosäuren in Lösung jeweils in eine kurze amphipatische α -Helix, die eine hohe Flexibilität besitzt. Die beiden α -Helices scheinen darüber hinaus keine Wechselwirkung miteinander oder zur β -Faltblatt-Oberfläche der NAC-Domäne einzugehen. Für die Flexibilität der α -Helices sprechen die Ergebnisse der limitierten Proteolyse von aeNAC, die eine bevorzugte proteolytische Spaltstelle im flexiblen N-terminalen Teil der NAC-Domäne zeigten. Die geringe Löslichkeit des kristallisierten Konstruktes in Wasser, das nur für die humane heterodimere NAC-Domäne kodiert, lässt außerdem darauf schließen, dass der hydrophobe Teil der α -Helices in Lösung exponiert ist und dass die α -Helices keine Wechselwirkung miteinander oder mit der β -Faltblatt-Oberfläche machen, da sonst eine bessere Löslichkeit zu erwarten wäre.

Im Kristall interkalieren zwei Heterodimere und bilden über die hydrophoben Oberflächen der α -Helices ein kristallographisches Tetramer (siehe Abbildung 35). Die Orientierung der α -Helices im Kristall ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Artefakt

und entspricht nicht der natürlichen Konformation. Interessant ist in dem Zusammenhang, dass die durch Detergenz stabilisierte heterodimere NAC-Domäne von $\alpha\beta$ -NAC im Gegensatz zu dem Komplex ohne Detergenz nicht kristallisiert werden konnte (Vergleiche 3.5.2). Das Phänomen lässt sich verstehen, wenn man von einer hohen Flexibilität der N-terminalen α -Helices der NAC-Domäne ausgeht, deren hydrophobe Oberfläche durch das Detergenz abgedeckt wird und diese dadurch aber zu flexibel bleiben, um zu kristallisieren. Das Phänomen spricht damit indirekt ebenfalls für die Flexibilität der N-terminalen α -Helices der NAC-Domäne.

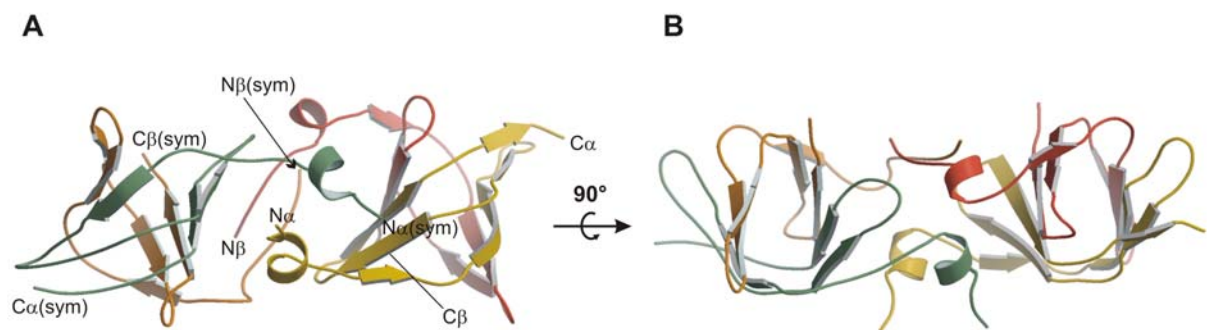


Abbildung 35 Intermolekulare Kontakte in der Kristallstruktur der heterodimeren humanen NAC-Domäne. Zwei NAC Heterodimere bilden in der Kristallpackung ein Tetramer und fixieren die flexiblen α -helikalen Enden der NAC-Domäne. Die Untereinheiten sind mit unterschiedlichen Farben dargestellt; α -NAC in Gelb bzw. Grün für das symmetrieverwandte α -NAC, β -NAC und das symmetrieverwandte β -NAC in Rot bzw. Orange. Die N- und C- Termini des symmetrieverwandten Komplexes sind mit dem Zusatz (sym) gekennzeichnet.

Obwohl die Kristallstruktur der heterodimeren humanen NAC-Domäne im Bezug auf die Orientierung der N-terminalen Aminosäuren eher eine artifizielle Konformation präsentiert, zeigt sie dennoch erstmals eine Struktur der kompletten heterodimeren NAC-Domäne und ermöglicht eine Aussage über die konservierten, charakteristischen Eigenschaften der Domäne. Eine Aussage über die biologisch relevante Orientierung der N-Termini lässt sich darüber hinaus höchst wahrscheinlich nur durch Komplexierung des entsprechenden Bindungspartners, wie beispielsweise des Ribosoms erreichen und wäre damit durch eine Kristallstruktur des löslichen NAC auch nicht zu erwarten.

3.6 Implikationen der Kristallstruktur der humanen heterodimeren NAC-Domäne

3.6.1 Konservierung der Faltung und der Dimerisierung über die NAC-Domäne

Wie in Abbildung 36 illustriert, ist das Innere der heterodimeren NAC-Domäne aus rein hydrophoben Seitenketten aufgebaut und bildet über diese hydrophobe Interaktionsfläche einen hoch affinen Komplex. Die in der Abbildung gezeigten für die Dimerisierung verantwortlichen Aminosäurereste sind sowohl in der α als auch entsprechend in der β Untereinheit der NAC-Domäne konserviert. Der Vergleich zu homodimerem archaebakteriellem NAC (siehe Abbildung 23), das eine analoge alternierende Verteilung hydrophober, konservierte Aminosäuren, die das Dimer aufbauen, zeigt, weist auf eine universelle Konservierung der Dimerfaltung der NAC-Domäne von Archaea bis zum Menschen hin.

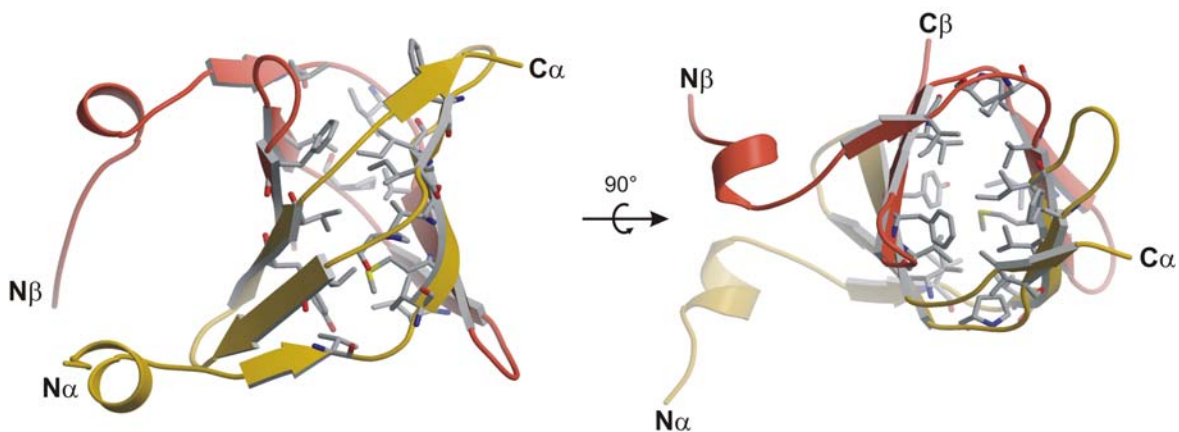


Abbildung 36 Konservierte Reste der Dimer Kontaktfläche der humanen NAC-Domäne. Die Abbildung illustriert die Struktur der humanen heterodimeren NAC-Domäne (α NAC in Gelb, β NAC in Rot) in zwei unterschiedlichen Orientierungen. In Grau eingezeichnet sind die konservierten Aminosäuren, deren Seitenketten ins Innere der heterodimeren NAC-Domäne zeigen und das Dimer aufbauen (α NAC: V88, V91, V94, I96, F104, I106, P109, V111, Y120, V122; β NAC: I56, I59, V62, M64, I72, P77, V79, F88).

Diese Konservierung unterstreicht die Bedeutung der einzigartigen Faltung der NAC-Domäne sowohl in Archaea als auch in Eukaryonten und unterstützt die These, dass homodimeres aeNAC das funktionelle Homolog des heterodimeren eukaryontischen $\alpha\beta$ -NAC am Ribosom ist. Der Vergleich impliziert einerseits die Konservierung der Eigenschaft der NAC-Domäne als Dimerisierungsdomäne, andererseits scheint ebenfalls die Topologie und Konformation der konkaven β -Faltblatt-Struktur konserviert zu sein und damit der NAC-Domäne mehr als nur eine Funktion als Dimerisierungsmotiv zuzukommen.

Die Konservierung der Eigenschaft der NAC-Domäne als Dimerisierungsmotiv eröffnet eine Reihe von Spekulationen zu den unterschiedlichen beobachteten Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten von NAC. Eine Deletion von β -NAC würde wahrscheinlich zur Dimerisierung von α -NAC führen, dass dann nicht mehr Ribosomen-assoziiert ist und eine weitere Funktion erfüllen könnte. Ergebnisse aus Gelfiltration und Quervernetzungsstudien zeigen, dass rekombinantes α -NAC als Dimer vorliegt (persönliche Mitteilungen M. Pech). Die heterodimere Struktur lässt zwar keinen Schluss auf einen möglichen posttranslationalen Mechanismus der Bildung des Homodimers aus dem Heterodimer zu, liefert aber eine Erklärung für die Möglichkeit der unterschiedlichen Funktionen von NAC und den NAC Untereinheiten. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass β -NAC ein Substrat für Caspase 3 ist (Thiede et al., 2001, B. Beatrix persönliche Mitteilungen). Die proteolytische Spaltung von β -NAC könnte möglicherweise zur Dissoziation des Komplexes führen und α -NAC für eine eigenständige Funktion freisetzen.

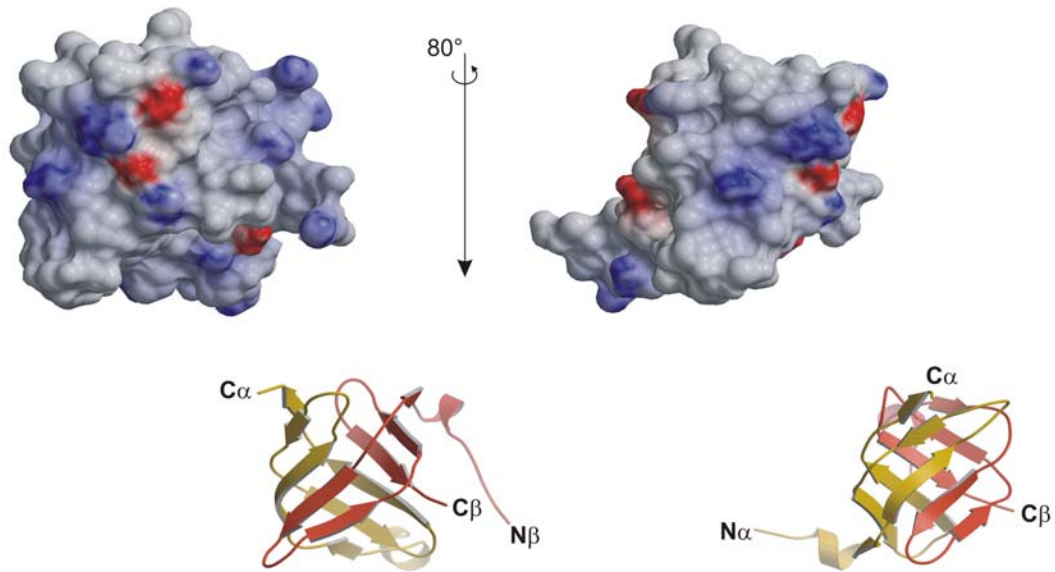
Heterodimeres $\alpha\beta$ -NAC, das Ribosomen assoziiert ist, scheint aber in höheren Eukaryonten der hauptsächlich zu beobachtende Komplex zu sein. Das lässt sich am ehesten aus den Ergebnissen schließen, dass die beschriebene Aktivität von α -NAC als Transkriptions-Koaktivator nur unter der Überexpression von α -NAC oder der Untersuchung von α -NAC alleine zu beobachten war. Bei Koexpression von β -NAC konnte keine Aktivität von α -NAC mehr gemessen werden und lässt auf eine bevorzugte Bildung des Heterodimers schließen (Yotov et al., 1998).

3.6.2 Elektrostatische Oberfläche der NAC-Domäne

Die heterodimere humane NAC-Domäne besitzt in Analogie zu aeNAC zwei konkave β -Faltblatt-Oberflächen die eine große strukturelle Ähnlichkeit zeigen. Für aeNAC konnten zwar charakteristische Eigenschaften der beiden konkaven β -Faltblatt-Oberflächen identifiziert werden, es war aber nur bedingt möglich den Oberflächen eine mögliche Funktion zuzuordnen, da einerseits keine Homologien zu bekannten Proteinen existieren und andererseits die $\Delta 18$ -aeNAC Struktur nur eine unvollständige NAC-Domäne darstellt (Vergleiche Abschnitt 3.4.1). Die den UBA-Domänen zugewandte konkave β -Faltblatt-Oberflächen der homodimeren NAC-Domäne von aeNAC zeigt ein ausgeprägtes Band positiver Ladungen (siehe Abbildung 25 zum Vergleich), dem eine mögliche Interaktion mit dem negativ geladenen rRNA Phosphatrückgrat zugeordnet werden könnte. Der Vergleich zum elektrostatischen Potential der entsprechenden β -Faltblatt-Oberfläche der heterodimeren humanen NAC-Domäne weist zwar positive Ladungen auf der äquivalenten Oberfläche auf, lässt aber das ausgeprägte Band positiver Ladung, das die NAC-Domäne von aeNAC zeigt, vermissen (siehe Abbildung 37).

Obwohl eine Relevanz der positiven Reste für die Interaktion mit Bindungspartnern nicht auszuschließen ist, lässt sich ausgehend von diesem Vergleich keine signifikante Konservierung einer positiven Ladung auf der den N-terminalen α -Helices abgewandten Seite der NAC-Domäne erkennen und keine weitergehende Aussage über eine mögliche konservierte Funktion treffen.

A Heterodimere NAC-Domäne des humanen $\alpha\beta$ -NAC



B Archaeobakterielles NAC ($\Delta 18$ -aeNAC)

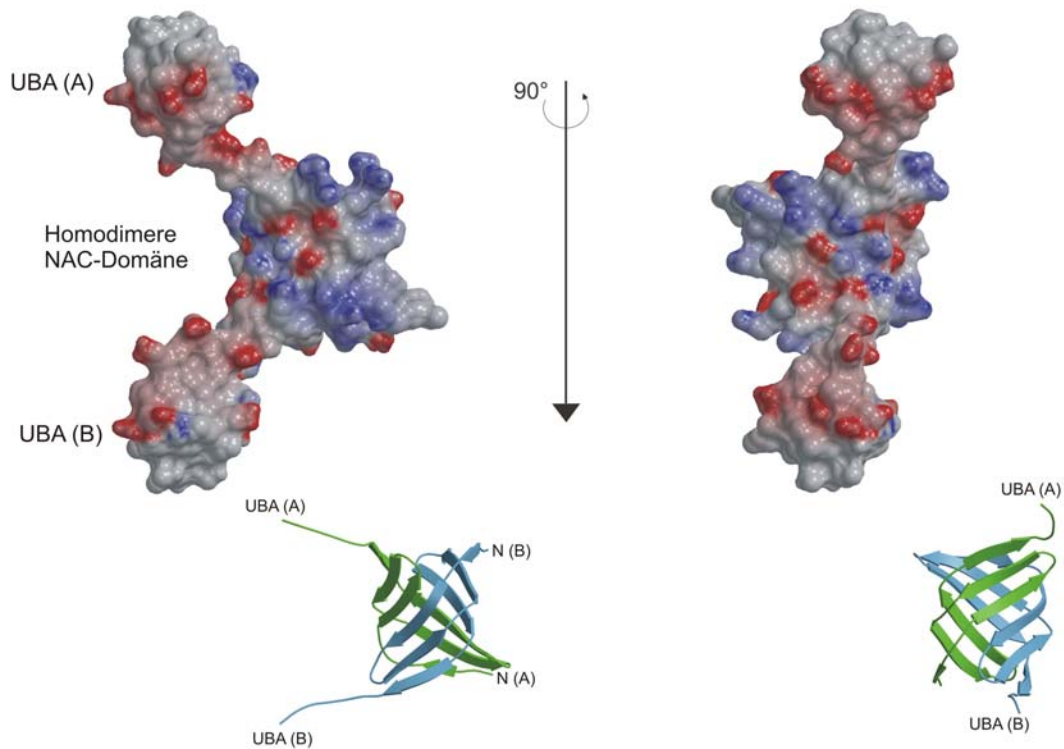


Abbildung 37 Vergleich der elektrostatischen Oberfläche der heterodimeren humanen NAC-Domäne und der homodimeren NAC-Domäne von aeNAC. **A** Die Abbildung repräsentiert die elektrostatische Oberfläche der heterodimeren humanen NAC-Domäne; die positive Ladung ist in Blau, die negative Ladung in Rot dargestellt. Die kleinere Bänderdarstellung unterhalb der Oberflächendarstellung veranschaulicht die Orientierung der NAC-Domäne. **B** Die Darstellung entspricht Abbildung 25. Die Strukturen der humanen NAC-Domäne und des aeNAC auf der linken Seite sind identisch orientiert.

3.6.3 Konservierte hydrophobe Oberfläche der NAC-Domäne

Eine detailliertere Analyse der den N-terminalen α -Helices zugewandten Oberfläche der heterodimeren humanen NAC-Domäne ergibt eine Anhäufung von konservierten hydrophoben Aminosäuren auf dieser Oberfläche. Die konservierten Reste bilden zusammen mit der hydrophoben Oberfläche der amphipatischen N-terminalen Helices eine ausgeprägte hydrophobe Tasche auf der Oberfläche der NAC-Domäne. Abbildung 38 illustriert die hydrophobe Tasche und zeigt die entsprechenden konservierten Reste von α - und β -NAC (siehe Anhang 7.3 für einen Sequenzvergleich der Konservierung der hydrophoben Reste).

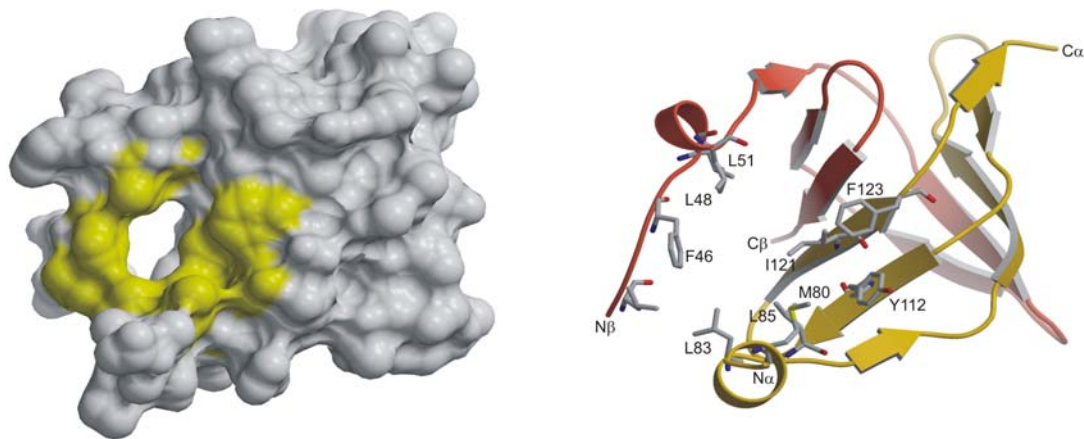


Abbildung 38 Konservierte hydrophobe Oberfläche der heterodimeren humanen NAC-Domäne. Die Darstellung links repräsentiert die hydrophobe Oberfläche der heterodimeren NAC-Domäne. Hydrophobe Aminosäuren sind in Gelb dargestellt, alle anderen in Grau. Die Bänderdarstellung der heterodimeren NAC-Domäne auf der rechten Seite ist entsprechend der Oberflächenrepräsentation links orientiert, die konservierten hydrophoben Reste sind in Grau eingezeichnet.

Zum Vergleich der Konservierung der hydrophoben Eigenschaften der NAC-Domäne wurde ein Modell für die in der archaebakteriellen Struktur fehlenden N-terminalen Aminosäuren der NAC-Domäne entwickelt. Das Modell für die N-terminalen Helices wurde durch Homologie-Modellierung mit der heterodimeren humanen NAC-Domäne als Templat berechnet. Das Homologie-Modell zeigt, dass die N-terminalen Aminosäuren der hoch konservierten NAC-Domäne von aeNAC höchst wahrscheinlich in eine der humanen NAC-Domäne analoge amphipatische Helix falten.

Abbildung 39 stellt den Vergleich der konservierten hydrophoben Oberflächenreste der humanen und der archaebakteriellen NAC-Domäne dar. Der Vergleich veranschaulicht, dass die humane und archaebakterielle NAC-Domäne eine sehr ähnliche konservierte hydrophobe Oberfläche zeigen, die aus den amphipatischen α -Helices und der β -Faltblatt-Oberfläche der dimeren NAC-Domäne gebildet wird. Das Modell für die NAC-Domäne von aeNAC zeigt eine auffällig hohe Anzahl von 12 exponierten Methioninen, die die flexible hydrophobe Tasche präsentieren. Diese Methionine sind mit hoher Wahrscheinlichkeit exponiert und bilden keinen spezifischen Kontakt zueinander aus, da die Aminosäuren 19–24 in der $\Delta 18$ -aeNAC Kristallstruktur ungeordnet vorliegen und diese Seite der NAC-Domäne nicht durch Kristallkontakte behindert ist.

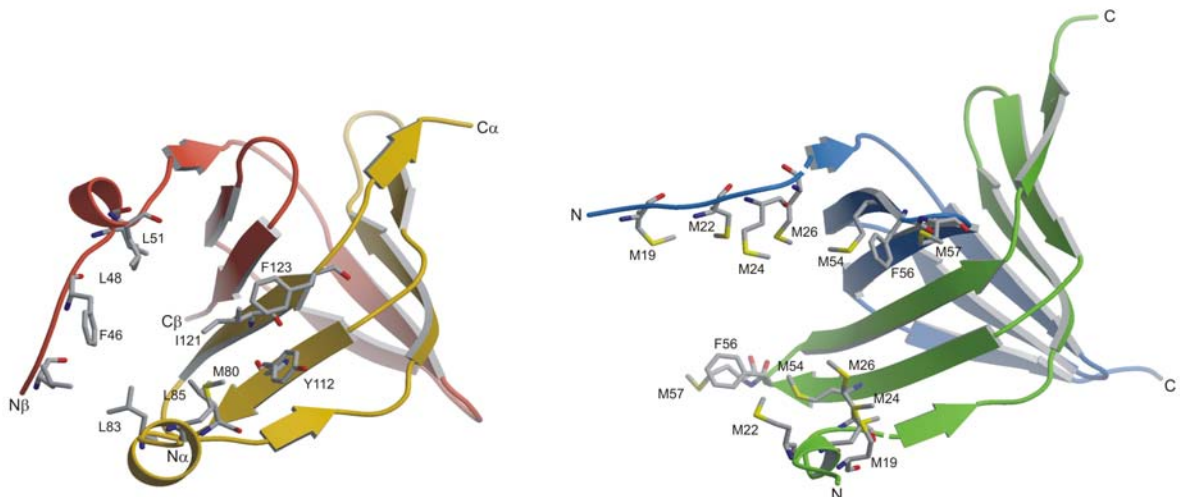


Abbildung 39 Vergleich der konservierten Oberflächenreste der NAC-Domäne von humanem $\alpha\beta$ -NAC und aeNAC. Links ist die Bänderdarstellung der heterodimeren humanen NAC-Domäne analog zu Abbildung 38 gezeigt. Rechts ist zum Vergleich die Struktur der homodimeren NAC-Domäne von $\Delta 18$ -aeNAC und den konservierten hydrophoben Resten dargestellt. Die N-terminalen Aminosäuren der NAC-Domäne von aeNAC, die in der Kristallstruktur nicht zu sehen sind, wurden zum Vergleich durch Homologie-Modellierung mit der humanen Struktur als Templat, berechnet. Der Übergang von der $\Delta 18$ -aeNAC Struktur zum Homologie-Modell ist durch eine kurze Unterbrechung des Protein Rückgrats dargestellt.

Wie schon im Abschnitt 3.5.3 ausgeführt kann die genaue Orientierung der amphipatischen α -Helices und damit auf die Konformation und Dimension der konservierten hydrophoben Tasche nicht aus der Kristallstruktur geschlossen werden.

Unabhängig davon zeigen die Struktur und der Vergleich zur archaebakteriellen NAC-Domäne allerdings eine Konservierung dieser exponierten hydrophoben Seitenketten und damit die Konservierung dieser hydrophoben Eigenschaft der NAC-Domäne.

3.7 Vergleich zum Trigger Faktor und Modell der NAC-Domäne am Ribosom

NAC zeigt weder auf struktureller noch auf Sequenzebene eine Homologie zu anderen Proteinen oder Komplexen und ermöglicht so keine direkte Struktur-Funktions Analyse. Im vorherigen Abschnitt wurde versucht trotz fehlender Homologien eine Aussage über die konservierten Eigenschaften der hoch konservierten NAC-Domäne zu treffen. Die Analyse der Kristallstrukturen von $\Delta 18$ -aeNAC und der humanen heterodimeren NAC-Domäne macht deutlich, dass hauptsächlich zwei Eigenschaften der dimeren NAC-Domäne konserviert wurden: zum einen die Dimerisierung über die einzigartige dimere β -Fass-Struktur; zum anderen die konkave β -Faltblatt-Oberfläche und die sich N-terminal anschließenden flexiblen amphipatischen α -Helices, die zusammen mit der β -Faltblatt-Oberfläche eine vielseitige hydrophobe Tasche bzw. Oberfläche präsentieren. Die Tatsache der Konservierung einer flexiblen hydrophoben Tasche an der konservierten Domäne eines Ribosomen-assoziierten Faktors, dessen Untereinheiten beide zur naszierenden Polypeptidkette verknüpft werden können, lässt zwar Raum für Spekulationen über eine mögliche Assoziation dieser Oberfläche mit der naszierenden Polypeptidkette, ermöglicht aber keine eindeutige Aussage über eine solche mögliche Funktion der NAC-Domäne.

3.7.1 Vergleich zur Ribosomen-Bindungs-Domäne von Trigger Faktor

Es wird häufig diskutiert, dass eukaryontisches $\alpha\beta$ -NAC das funktionelle Homolog des eubakteriellen Trigger Faktors ist. Trigger Faktor ist in Eubakterien der erste Ribosomen-assoziierte Faktor, der die naszierende Polypeptidkette kontaktiert und in Eubakterien gibt es kein NAC Homolog (siehe Abschnitt 1.3.3 für detaillierte Beschreibung des TF). In Eukaryonten und Archaea gibt es kein Trigger Faktor Homolog, der erste Ribosomen-assoziierte Faktor, der die naszierenden Polypeptidkette

kontaktiert ist hier NAC (siehe Abschnitt 1.2). Die Tatsache, dass $\alpha\beta$ -NAC wie TF spezifisch ans Ribosom binden und die ersten Faktoren sind, die zur naszierenden Polypeptidketten verknüpft werden können und diese abschirmen, führte dazu, dass für $\alpha\beta$ -NAC eine funktionelle Homologie zum TF postuliert wurde.

Jeder genauere Vergleich der Ribosomen-assoziierten Faktoren in Prokaryonten und Eukaryonten zeichnet ein weitaus differenzierteres Bild der Prozesse und Faktoren am eukaryontischen versus prokaryontischen Ribosom. Abschnitt 1.3 fasst die Ribosomen-assoziierten Faktoren und die bekannten Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryonten zusammen. Es wird deutlich, dass es für die kotranslationale Kontrolle der Proteinfaltung direkt am Ribosom in Prokaryonten nur den Trigger Faktor gibt, während es in Eukaryonten neben NAC einen Ribosomen-assoziierten spezialisierten Hsp70/Hsp40 Komplex gibt. Eukaryonten besitzen damit im Unterschied zu Prokaryonten einen Ribosomen-assoziierten Komplex von spezialisierten Chaperonen, die direkt am Ribosom in ATP kontrollierter Manier die richtige Faltung der Proteine sicherstellen. Die Proteinfaltung in Eukaryonten scheint vielleicht aufgrund der komplexeren Multi-Domänen-Struktur vieler eukaryontischer Proteine anspruchsvoller zu sein als in Prokaryonten und damit auch ein komplexeres Repertoire an Chaperonen zu erwarten. Obwohl klar wird, dass die Ribosomen-assoziierten Faktoren in Eukaryonten aufgrund der komplexeren Aufgabenstellung wahrscheinlich eine vielfältigere oder eher spezialisierte Funktion erfüllen als die in Prokaryonten, ist nicht auszuschließen, dass es eine teilweise funktionelle Überlappung der auf sequenzniveau nicht homologen Proteine gibt. Insofern ist es interessant einen Vergleich zwischen NAC und TF, den beiden ersten nicht ribosomalen Faktoren, die die naszierende Polypeptidkette kontaktieren, zu ziehen und nach möglicherweise konservierten Strategien zu suchen.

In diesem Zusammenhang stellen die erst kürzlich veröffentlichten Daten zum strukturellen Modell des TF am Ribosom eine auffällige Analogie zur konservierten hydrophoben Tasche der dimeren NAC-Domäne dar. Die von Schlunzen et al. und Baram et al. präsentierten Strukturen der TF-Ribosomen-Bindungs-Domäne (TF-BD) zeigen eine große strukturelle Änderung der TF-BD bei Bindung ans Ribosom, infolge dessen eine konservierte hydrophobe Oberfläche zum Tunnelausgang hin exponiert wird (siehe Abbildung 40 für eine schematische Darstellung dieser Bewegung; Baram et al., 2005; Cate, 2005; Schlunzen et al., 2005).

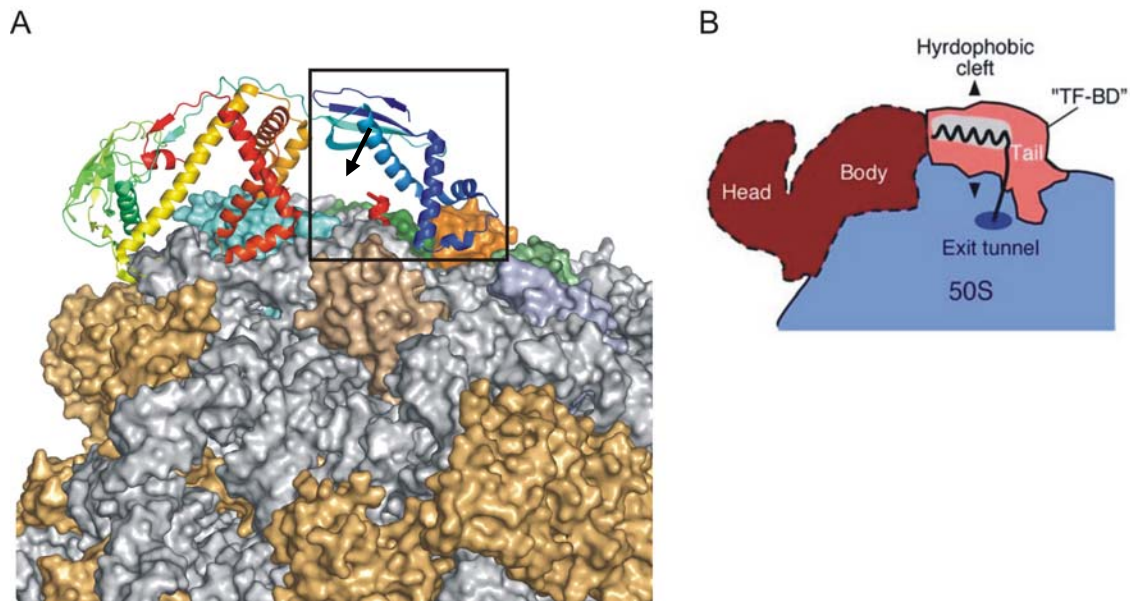


Abbildung 40 Modell des Trigger Faktors (TF) am Ribosom. **A** Die Abbildung zeigt das ursprüngliche Modell des Trigger Faktors am archaebakteriellen Ribosom wie in Ferbitz et al., 2004 beschrieben. Die Box markiert die in Blau gezeigte N-terminale Ribosomen-Bindungs-Domäne (TF-BD) des TF. Der Pfeil deutet die bewegliche α -Helix und die beobachtete Bewegung dieser α -Helix bei Bindung des TF ans bakterielle Ribosom an (Schlunzen et al., 2005). Die Bewegung der α -Helix exponiert eine konservierte hydrophobe Oberfläche des β -Faltblattes zum Tunnelausgang, wie in Abbildung B schematisch verdeutlicht. Die Oberfläche des archaebakteriellen Ribosoms aus *H. marismortui* ist dargestellt, die RNA ist in Grau, die ribosomalen Proteine in Hellbraun illustriert. Die ribosomalen Proteine um die Austrittsstelle der naszierenden Polypeptidkette sind in den Farben Orange (L23), Dunkelgrün (L29), Hellgrün (L19), Hellblau (L24), Dunkelbraun (L22) und Graublau (L31) eingezeichnet und die naszierende Polypeptidkette ist durch die hypothetische rote α -Helix modelliert. **B** Schematische Darstellung des Komplexes aus TF-BD und der 50S ribosomalen Untereinheit aus *D. radiodurans*, adaptiert von Cate, 2005. Das Modell illustriert die beobachtete Konformationsänderung in der TF-BD. Die hydrophobe Tasche, dargestellt in Grau, öffnet sich durch die Bindung ans Ribosom, wie durch die Pfeile dargestellt. Die naszierende Polypeptidkette ist in Schwarz skizziert

Diese konservierte hydrophobe Tasche liegt direkt über dem ribosomalen Tunnelausgang und könnte die naszierende Polypeptidkette unmittelbar nach Verlassen des Tunnels binden und von der Umgebung abschirmen. Dieses Modell und die Bedeutung der TF-BD wird durch biochemische Daten von Kramer et al. unterstützt, die zeigen konnten, dass die TF-BD alleine den letalen Phänotyp der TF / DnaK-Doppeldeletion verhindert (Kramer et al., 2004). Darüber hinaus schirmt die TF-BD alleine immer noch die Polypeptidkette ab und kann zur naszierenden Polypeptidkette verknüpft werden. Die TF-BD zeigt allerdings im Gegensatz zum wt-TF keine

Chaperon-Aktivität (Kramer et al., 2004). Diese Beobachtung stimmt mit der Theorie überein, dass TF und DnaK eine teilweise redundante Funktion als Chaperon erfüllen und spricht für das Modell, dass die TF-BD für die initiale Erkennung und Protektion der naszierenden Polypeptidkette zuständig ist, die eigentliche Chaperon-Aktivität aber in Kombination mit der hydrophoben Tasche unter dem ‚Körper‘ des TF vermittelt wird (siehe Abbildung 40 und Abbildung 6, Abschnitt 1.3 zum Vergleich).

Die Kristallstrukturen der Komplexe aus TF-Ribosomen-Bindungs-Domäne (TF-BD) und der grossen ribosomalen Untereinheit lassen die Frage offen was *in vivo* bei Bindung an ein Ribosom mit naszierender Polypeptidkette und der Wechselwirkung mit der wachsenden Polypeptidkette passiert. Dennoch zeigen Schluenzen et al. die Struktur eines homologen TF-BD-50S Komplexes, d.h. die Struktur eines Komplexes von TF aus *D. radiodurans* mit der großen ribosomalen Untereinheit aus dem selben Organismus, und präsentieren damit im Gegensatz zu Ferbitz et al., die einen heterologen Komplex aus der *E. coli* TF-BD und der ribosomalen 50S Untereinheit aus dem Archaeobakterium *H. marismortui*, das kein TF Homolog besitzt, zeigen, eine mögliche funktionelle Konformation der TF-BD am Ribosom. Unabhängig von der funktionellen Relevanz dieser Konformation impliziert die Struktur darüber hinaus eine interessante strukturelle Eigenschaft der TF-BD: Der Vergleich der Kristallstrukturen zeigt, dass die TF-BD und speziell die Konformation der α -Helix zur hydrophoben β -Faltblatt-Oberfläche keine rigide Struktur darstellt und impliziert eine hohe Beweglichkeit der Domäne. Das bedeutet, dass die TF-BD die Eigenschaft einer flexiblen hydrophoben Tasche besitzt, die je nach Orientierung der beweglichen α -Helix mehr oder weniger exponiert ist und wahrscheinlich ein dementsprechend grosses Konformationsspektrum zeigt. Nach dem Modell von Schluenzen et al. besitzt die TF-BD somit eine flexible hydrophobe Tasche, die in der Lage ist, die unterschiedlichen naszierenden Polypeptidketten bei Verlassen des ribosomalen Tunnels in Empfang zu nehmen und abzuschirmen, bis die Polypeptidkette dann entweder mit DnaK, SRP oder dem Körper des TF assoziiert und entsprechend weitergeleitet wird (siehe Abbildung 40).

Dieses differenzierte Modell der Funktion des TF am Ribosom und die mögliche Funktion der hydrophoben Tasche der TF-BD eröffnet einen funktionellen und strukturellen Vergleich zur konservierten NAC-Domäne und dessen hydrophober Tasche. NAC zeigt insofern eine funktionelle Homologie zur TF-BD, indem es als erster Ribosomen-assoziiertes Faktor mit geringer Sequenzspezifität zu naszierenden

Polypeptidketten verknüpft werden kann, kurze Polypeptidketten abschirmt, aber keine Aktivität als Chaperon zeigt. Diese Übereinstimmung lässt vermuten, dass es strukturelle Details zwischen $\alpha\beta$ -NAC und der TF-BD gibt die Ähnlichkeiten aufweisen und stellt die Frage nach möglicherweise analogen Strategien zur Wechselwirkung mit der naszierenden Polypeptidkette oder zur spezifischen Bindung ans Ribosom. Eine Homologie der Gesamtstrukturen wäre dagegen nicht zu erwarten und wird auch nicht gefunden (siehe Abbildung 41, und vergleiche Abschnitt 3.8 zur Gesamtstruktur von wt- $\alpha\beta$ -NAC).

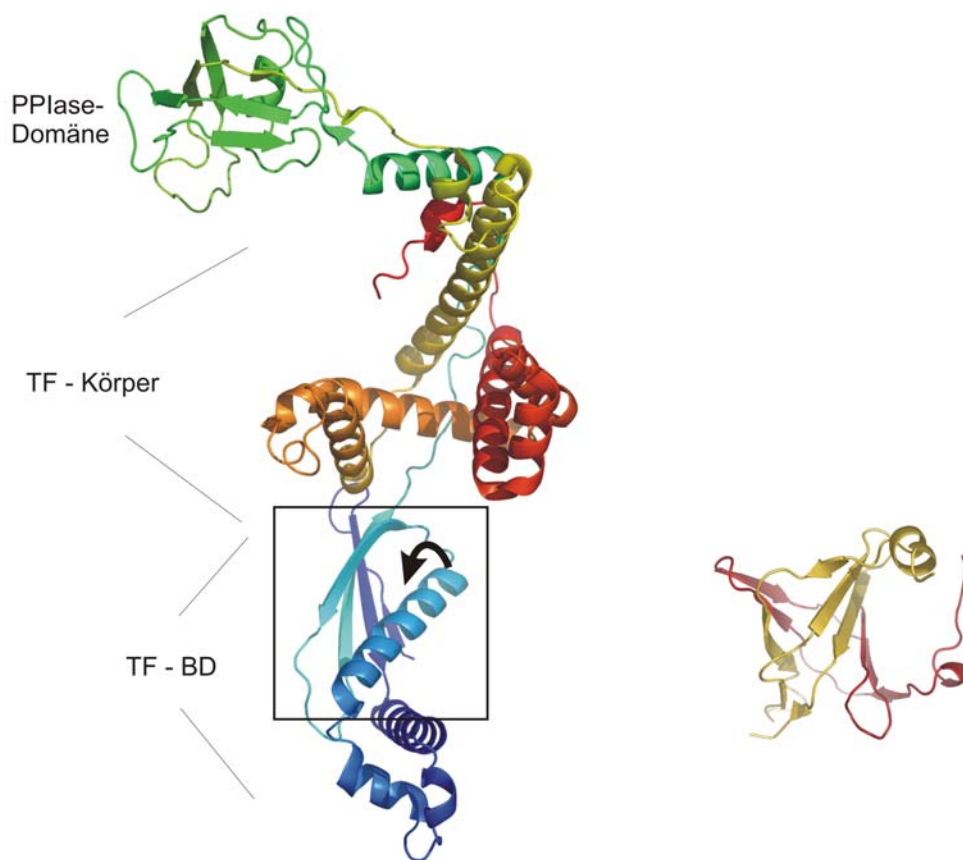


Abbildung 41 Vergleich der Strukturen von Trigger Faktor und heterodimerer humaner NAC-Domäne. Der Trigger Faktor ist auf der linken Seite gezeigt und in sich graduell ändernder Farbe, beginnend mit Blau am N-Terminus bis hin zum C-Terminus in Rot, dargestellt (TF-Kristallstruktur nach Ferbitz et al., 2004). Die schwarze Box markiert den Teil der N-terminalen Ribosomen-Bindungs-Domäne (TF-BD), der mit der Polypeptidkette interagiert. Der schwarze Pfeil zeigt schematisch die Bewegung der α -Helix bei Bindung der TF-BD ans Ribosom. Neben der TF – Ribosomen-Bindungs-Domäne ist die Struktur der heterodimeren humanen NAC-Domäne dargestellt.

Die Kristallstruktur der eukaryontischen NAC-Domäne stellt zwar den am höchsten konservierten Kern des NAC dar, trotzdem fehlt in der Struktur ein großer, in Lösung

ungeordnet vorliegender Teil. Beispielsweise fehlt der N-terminale Bereich von β -NAC, der für die Bindung ans Ribosom verantwortlich ist (Beatrix et al., 2000; Franke et al., 2001). Die Tatsache, dass das archaebakterielle NAC, das ebenfalls spezifisch mit dem Ribosom assoziiert ist und mit der naszierenden Polypeptidkette wechselwirkt, nur die homologe NAC-Domäne und wenige N-terminale Aminosäuren besitzt, lässt vermuten, dass die Wechselwirkung zur Polypeptidkette über die hoch konservierte NAC-Domäne vermittelt wird. Abbildung 41 zeigt eine Gegenüberstellung der Strukturen des TF und der NAC-Domäne.

Der genauere Vergleich der TF-BD und der heterodimeren NAC-Domäne zeigt für beide Strukturen eine ähnliche hydrophobe β -Faltblatt-Struktur. Wie in Abbildung 42 dargestellt haben beide Domänen auf der exponierten β -Faltblatt-Oberfläche konservierte hydrophobe Reste und bilden darüber eine konservierte hydrophobe Tasche. Diese Ähnlichkeit einer konservierten hydrophoben Tasche unterstützt die Annahme, dass die heterodimere NAC-Domäne in Analogie zur hydrophoben Tasche der TF-BD, der Teil der NAC Struktur ist, der mit der naszierenden Polypeptidkette wechselwirkt und diese bei Verlassen des ribosomalen Tunnels in Empfang nimmt.

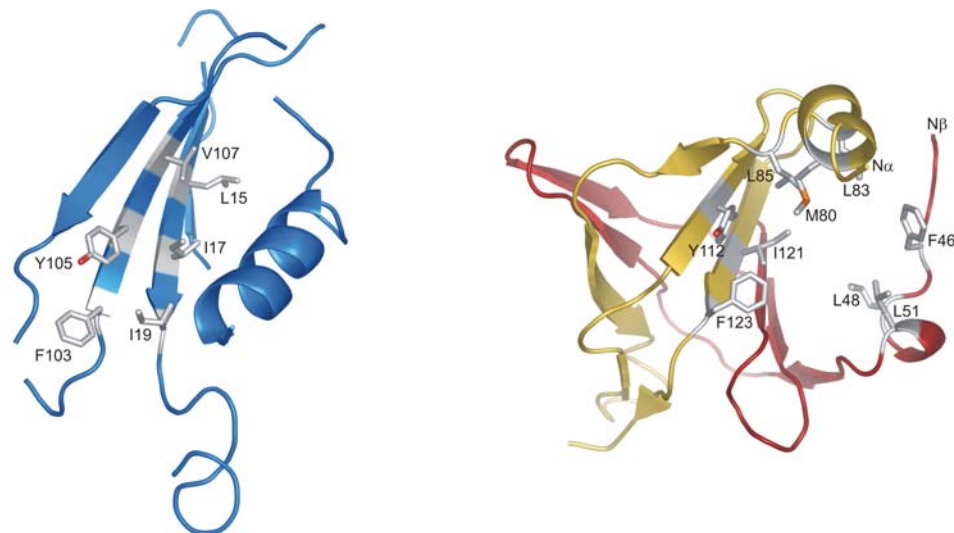


Abbildung 42 Vergleich der TF-BD und der heterodimeren humanen NAC-Domäne. Links ist die β -Faltblatt-Oberfläche der TF-BD mit den konservierten hydrophoben Resten dargestellt (Die Struktur entspricht dem in Abbildung 41 mit einem schwarzen Kasten markierten Teil des TF). Rechts ist die korrespondierende konservierte hydrophobe Oberfläche der heterodimeren humanen NAC-Domäne gezeigt.

3.7.2 Modell der konservierten heterodimeren NAC-Domäne am Ribosom

Der Vergleich der hydrophoben Oberfläche der heterodimeren NAC-Domäne zur TF-BD ermöglicht eine Überlagerung der β -Faltblatt-Strukturen. Abbildung 43 zeigt die überlagerten Strukturen der heterodimeren NAC-Domäne und der TF-BD am Ribosom. In dieser Orientierung präsentiert die heterodimere NAC-Domäne in Analogie zur TF-BD die flexible hydrophobe Tasche über dem Tunnelausgang und verdeutlicht so das postulierte Modell der NAC-Domäne am Ribosom und die mögliche Interaktion mit der naszierenden Polypeptidkette.

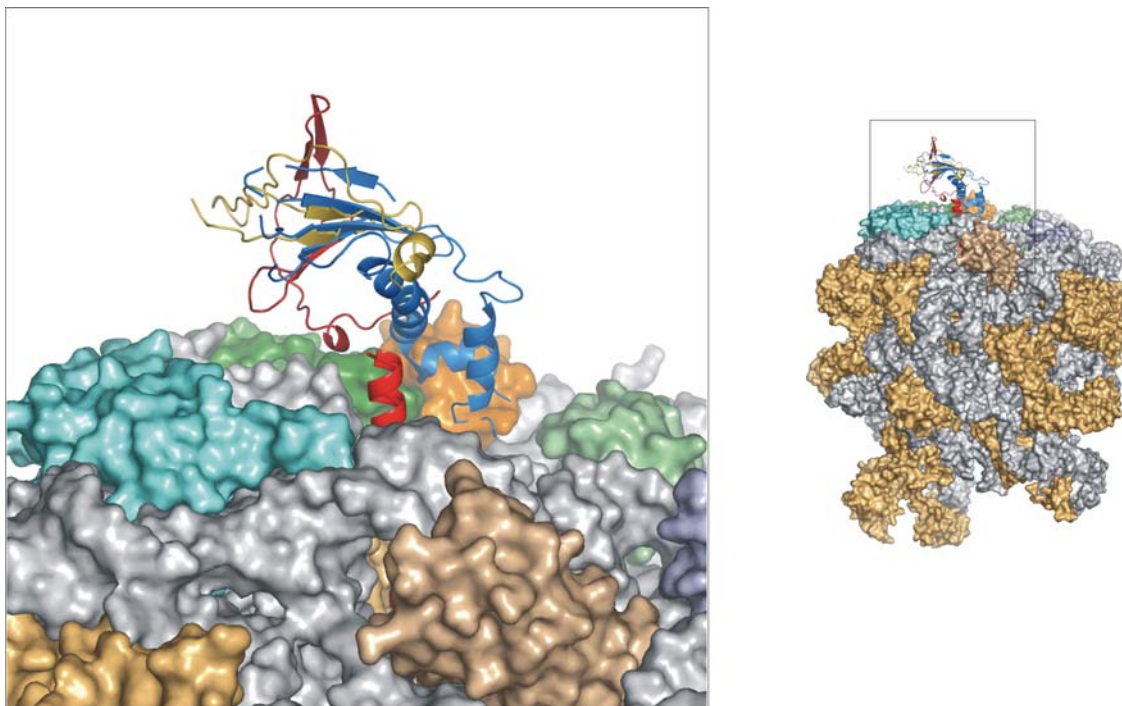


Abbildung 43 Überlagerung der TF-BD an der 50S ribosomalen Untereinheit und der heterodimeren humanen NAC-Domäne. Die Oberfläche des archaebakteriellen Ribosoms aus *H. marismortui* ist dargestellt, die rRNA ist in Grau, die ribosomalen Proteine in Hellbraun illustriert. Die ribosomalen Proteine um die Austrittsstelle der naszierenden Polypeptidkette sind in den Farben Orange (L23), Dunkelgrün (L29), Türkis (L24), Dunkelbraun (L22), Blau (L31) und Hellgrün (L19) eingezeichnet (Vergleiche Abbildung 4 zur Übersicht der ribosomalen Proteine am Tunnelausgang) und die hypothetische naszierende Polypeptidkette ist durch die rote α -Helix modelliert.

Die Positionierung der heterodimeren NAC-Domäne am Ribosom ist in diesem strukturellen Vergleich hypothetisch, da die NAC-Domäne alleine sicher nicht für die spezifische Bindung ans Ribosom zuständig ist, sondern diese wahrscheinlich

über die N-terminale Sequenz von β -NAC vermittelt wird. Zwei erst kürzlich veröffentlichte Studien zeigten, dass Hefe NAC zum ribosomalen Protein L25 verknüpft werden kann und dass die Bindung von $\alpha\beta$ -NAC ans Ribosom wahrscheinlich zu einem gewissen Teil über L25 vermittelt wird (Grallath et al., 2005; Wegrzyn et al., 2005). Andere, detailliertere Studien zeigen allerdings, dass Hefe NAC zusätzlich mit anderen ribosomalen Proteinen assoziiert ist und lassen daher eher vermuten, dass NAC über mehr als eine spezifische Interaktionsstelle am Ribosom fixiert ist (B. Beatrix, M. Pech persönliche Mitteilungen). Obwohl durch die bisher veröffentlichten Quervernetzungs-Studien von Hefe NAC zu ribosomalen Proteinen ebenfalls keine genaue Positionierung von $\alpha\beta$ -NAC und der NAC-Domäne am Ribosom möglich ist, wird klar, dass NAC in unmittelbarer Umgebung des Tunnelausgangs positioniert sein muss. Nur so lassen sich sowohl die veröffentlichten Daten zur Interaktion mit L25, als auch die sehr frühe Interaktion mit der Polypeptidkette verstehen.

Für die Annahme, dass außerdem die heterodimere NAC-Domäne und nicht nur etwaige Schleifen-Bereiche des heterodimeren $\alpha\beta$ -NAC in unmittelbarer Umgebung zum Tunnelausgang und der Polypeptidkette positioniert ist, spricht die Tatsache, dass beide Untereinheiten von $\alpha\beta$ -NAC gleichermassen zur Polypeptidkette verknüpft werden können. Die heterodimere NAC-Domäne bildet sowohl den strukturierten Kern des ansonsten in Lösung hauptsächlich ungeordnet vorliegenden $\alpha\beta$ -NAC, als auch die Domäne über die die Untereinheiten symmetrisch dimerisieren. Die NAC-Domäne bietet damit eine symmetrische heterodimere Interaktionsfläche zur Wechselwirkung mit der Polypeptidkette. Andererseits zeigt der Vergleich zum aeNAC, dass die konservierte dimere NAC-Domäne der Teil der Struktur sein muss, der mit der naszierenden Polypeptidkette assoziiert. Wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, zeigt der Vergleich, dass aeNAC im Unterschied zu eukaryontischem $\alpha\beta$ -NAC nur die NAC-Domäne, einen kurzen N-terminalen Schleifen-Bereich und die UBA-Domäne besitzt, aber ebenfalls spezifisch mit dem Ribosom assoziiert ist und die Polypeptidkette unmittelbar nach Verlassen des Tunnels kontaktiert. Für eukaryontisches $\alpha\beta$ -NAC konnten wir zeigen, dass die UBA-Domäne keinen Einfluss auf die Bindung ans Ribosom und die Verknüpfung zur Polypeptidkette hat. In Analogie dazu bleibt zur Erklärung der spezifischen Bindung ans Ribosom und der Assoziation mit der Polypeptidkette für das aeNAC nur die NAC-Domäne und die 12 N-terminalen Aminosäuren.

Ausgehend davon ermöglicht die Analyse der konservierten Eigenschaften der dimeren NAC-Domäne und der Vergleich zum Modell der TF-BD die Erstellung eines Modells für die Funktion der dimeren NAC-Domäne am Ribosom. In Abschnitt 3.6 konnte argumentiert werden, dass eine der konservierten Eigenschaften der NAC-Domäne die vielseitige hydrophobe Tasche ist, die aus dem β -Faltblatt und den amphipathischen α -Helices gebildet wird. Diese konservierte Eigenschaft einer flexiblen hydrophoben Tasche der heterodimeren NAC-Domäne zusammen mit der Annahme, dass die NAC-Domäne für die Wechselwirkung mit der naszierenden Polypeptidkette verantwortlich ist, führt zu dem Modell der Interaktion und Abschirmung der wachsenden Polypeptidkette über diese flexible Tasche. In diesem Modell wäre NAC in der Lage über diese flexible hydrophobe Oberfläche der NAC-Domäne mit geringer Sequenzspezifität mit den hydrophoben Bereichen der vielseitigen wachsenden Polypeptidketten, die mehr oder weniger schon Sekundärstrukturen ausgebildet haben, zu interagieren und von der Umgebung abzuschirmen. Dieses Modell lässt nicht vermuten, dass NAC Aktivität als Chaperon besitzt und spezifisch mit ungefalteten hydrophoben Bereichen interagiert und so die Faltung unterstützt. Abgesehen von einer kürzlich von Grallath et al. veröffentlichten Studie, konnte für NAC keine Chaperon Aktivität festgestellt werden (Grallath et al., 2005). Grallath et al. konnten mit Rhodanase als Substrat eine Verhinderung der Aggregation durch NAC feststellen, was dem Modell der hydrophoben Oberfläche der NAC-Domäne allerdings nicht grundsätzlich widerspricht.

Das Modell der heterodimeren NAC-Domäne am Ribosom steht in guter Übereinstimmung mit dem im letzten Abschnitt beschriebenen Modell für die Funktion der TF-BD am Ribosom. Da sowohl die TF-BD als auch NAC als erste Ribosomen-assoziierte Faktoren die Polypeptidkette kontaktieren und kurze Sequenzen schützen, aber keine Chaperonaktivität zeigen und beide über eine konservierte, flexible hydrophobe Tasche verfügen, liegt die Schlussfolgerung einer teilweisen funktionellen Homologie der TF-BD und der dimeren NAC-Domäne nahe. Diese Schlussfolgerung ist durchaus interessant und ermöglicht die Überlegung, inwiefern trotz des unterschiedlichen Repertoires an Ribosomen-assoziierten Faltungshelfern, Prokaryonten und Eukaryonten ähnliche Strategien zur initialen Wechselwirkung mit der naszierenden Polypeptidkette entwickelt haben. Nach dieser Überlegung würde sowohl der heterodimeren NAC-Domäne in Eukaryonten als auch der TF-BD in Prokaryonten die Rolle der initialen Wechselwirkung mit der wachsenden Polypeptidkette bei

Verlassen des ribosomalen Tunnels zukommen, bevor diese durch das weitere Chaperonnetzwerk oder Faktoren wie SRP gebunden und zielgesteuert werden.

Zur Überprüfung dieser möglichen funktionellen Homologie stehen bis jetzt leider keine *in vivo* Daten zur Verfügung. Die Expression von eukaryontischem $\alpha\beta$ -NAC in *E. coli* TF/DnaK-Deletionsstämmen wurde bisher nicht berichtet und Deletionsmutanten von NAC in Hefe zeigen keinen Phänotyp oder sind stark abhängig von den verwendeten Hefe-Stämmen (Wegrzyn et al., 2005). Darüber hinaus ist der für einige Stämme beobachtete Phänotyp der NAC Deletion nicht notwendigerweise auf den Verlust der Funktion von NAC am Ribosom zurückzuführen, sondern könnte eher auf eine Funktion der individuellen Untereinheiten deuten.

In dem Zusammenhang dieser möglichen speziellen funktionellen Homologie ist es interessant zu erwähnen, dass es in Archaea kein funktionelles Homolog des TF gibt, sondern bis jetzt wurde nur das aeNAC Homolog zu NAC entdeckt. Darüber hinaus besitzen die mesophilen Archaea ein dem DnaK/DnaJ analoges cytosolisches Hsp70/40 Chaperon System (Macario und Conway De Macario, 2001). Wenn man davon ausgeht, dass die Proteinfaltung, im Unterschied zu Eukaryonten, in mesophilen Archaea der in Prokaryonten analog ist und mesophile Archaea und Prokaryonten, abgesehen von TF bzw. NAC, über ein sehr ähnliches Chaperonnetzwerk verfügen, stellt sich tatsächlich die Frage welche funktionellen Eigenschaften TF in Prokaryonten und NAC in Archaea als erste und einzige Ribosomen-assoziierten Faktoren am ribosomalen Tunnelausgang teilen.

Die Wechselwirkung von NAC mit der naszierenden Polypeptidkette über die konservierte hydrophobe Oberfläche der dimeren NAC-Domäne und eine dementsprechende Orientierung der dimeren NAC-Domäne am Ribosom präsentiert eine Hypothese zur Funktion der konservierten NAC-Domäne am Ribosom. Das Modell ist in der Lage die biochemischen Ergebnisse der Wechselwirkung von NAC mit der naszierende Polypeptidkette und der Abschirmung von kurzen Sequenzen zu erklären, ein tatsächlicher Beweis für dieses Arbeitsmodell kann allerdings in dieser Arbeit nicht geliefert werden. Dafür wären Daten zur genauen Positionierung von NAC am Ribosom notwendig und ein biochemischer Versuch, der eine Interaktion der Polypeptidkette mit genau dieser Oberfläche beweist. Darüber hinaus darf bei dem Vergleich und der möglichen Analogie zwischen der TF-BD und der dimeren NAC-Domäne nicht vergessen werden, dass die bisherigen Vergleiche nur die NAC-Domäne in Betracht zogen. Das eukaryontische $\alpha\beta$ -NAC ist im Gegensatz zum aeNAC ein

heterodimerer Komplex und die NAC-Domäne stellt nur den konservierten, strukturierten Kern des Gesamtproteins dar (Vergleiche Abschnitt 3.7.4 zur Gesamtstruktur von wt-NAC).

3.7.3 Vergleich des Modells am Ribosom zu archaebakteriellem NAC

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Paola Fucini, Dr. Daniel Wilson und Dr. Frank Schlünzen vom MPI für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem wurde versucht durch Kokristallisations-Studien eine Struktur von NAC am Ribosom zu erhalten. Die hier präsentierten Daten stellen nur vorläufige und unvollständige Ergebnisse dar, sollen aber dennoch kurz erwähnt werden, da sie das vorgestellte Modell der NAC-Domäne am Ribosom unterstützen und eine vorläufige Positionierung der dimeren NAC-Domäne am Ribosom erlauben.

In der Gruppe von Dr. Paola Fucini wurde ein um die UBA-Domäne C-terminal verkürztes Konstrukt des archaebakteriellen NAC aus *M. marburgensis* (Δ UBA-aeNAC) mit der 50S ribosomalen Untereinheit aus *H. marismortui* kokristallisiert. Bis jetzt konnte nur ein 60% vollständiger Datensatz bis ~ 4 Å aufgenommen und prozessiert werden. Die in Abbildung 44 gezeigte Differenz-Elektronendichtekarte wurde anhand dieses 60% vollständigen Datensatzes von Dr. Frank Schlünzen nach der in Schlünzen et al. beschriebenen Vorgehensweise berechnet (Diaconu et al., 2005). Diese Elektronendichte kann aufgrund der geringen Vollständigkeit und der niedrigen Auflösung nur als qualitatives Ergebnis zur Positionierung des aeNAC Modells verwendet werden und erlaubt keine Erkennung und Positionierung von Sekundärstrukturmerkmalen.

Das auffälligste Ergebnis dieser Versuche ist, dass trotz der unzureichenden Qualität der Daten Differenzelektronendichte im ribosomalen Tunnel und in direkter Umgebung des konservierten ribosomalen Proteins L23 zu sehen ist (siehe in Schwarz umrahmte Bereiche in Abbildung 44 B und C). Auch wenn nicht eindeutig festzulegen ist welcher Teil von NAC im ribosomalen Tunnel und an L23 positioniert ist, lässt sich feststellen, dass das archaebakterielle NAC und die dimere NAC-Domäne direkt am ribosomalen Tunnelausgang bindet und ein Teil der Struktur in den Ausgangstunnel reicht. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den biochemischen Daten, die eine Interaktion von NAC mit der gebundenen Polypeptidkette noch im Tunnel implizieren und den kürzlich veröffentlichten Daten zur Bindung ans L23 (bzw. L25 in

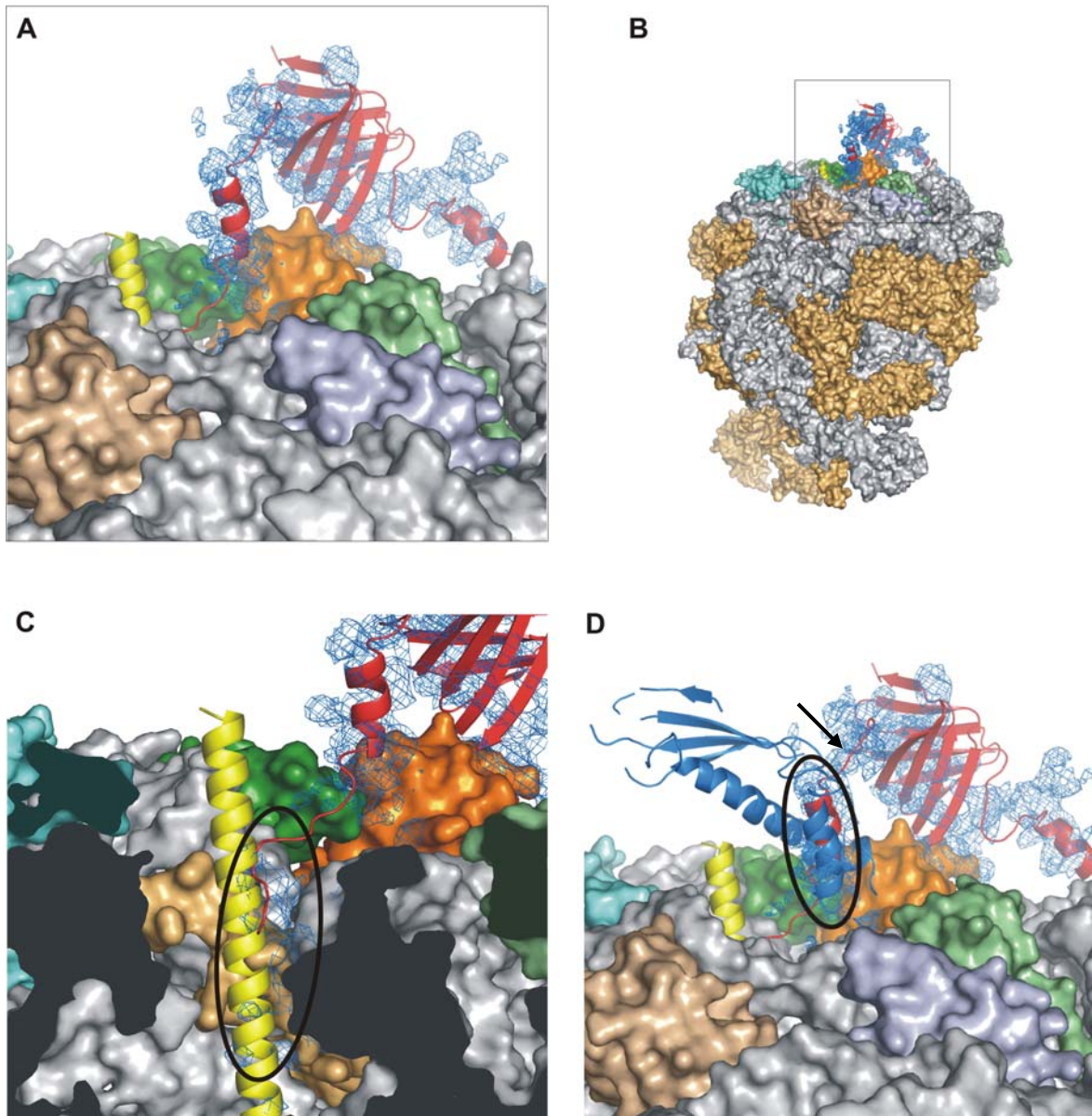


Abbildung 44

Struktur von Δ UBA-aeNAC aus *M. marburgensis* an der 50S ribosomalen Untereinheit aus *H. marismortui*. **A** Die Abbildung zeigt einen Teil der 50S Untereinheit und die von F. Schlünzen berechnete σ A gewichtete Differenz-Elektronendichtekarte (in Blau) des kokristallisierten Δ UBA-aeNAC-H50S Komplexes. In die Differenzdichte ist das Modell von homodimerem Δ UBA-aeNAC positioniert (in Rot dargestellt). Die ribosomalen Proteine L23 und L29 sind in Orange bzw. Grün dargestellt. **B** Übersichtsdarstellung der großen ribosomalen Untereinheit, analog zu A. Die Abbildungen **C** und **D** zeigen in dem in Schwarz umrahmten Bereichen den Teil der aeNAC Differenzdichte, der nicht durch Kristallkontakte gestört ist. Der restliche Teil des Δ UBA-aeNAC Modells ist stark durch Kristallkontakte behindert und stellt wahrscheinlich einen unspezifischen Kontakt dar. Die β -Fass Struktur des aeNAC ist flexibel mit den N-terminalen Helices verknüpft (durch den Pfeil angedeutet) und es ist vorstellbar, dass die genaue Orientierung der β -Fass Domäne erst durch die korrekte Wechselwirkung an der ribosomalen Oberfläche fixiert wird, welche in dieser Struktur durch Kristallkontakte verhindert wird. **C** Querschnitt durch die 50S ribosomale Untereinheit zur Verdeutlichung des ribosomalen Tunnelausgangs und der Elektronendichte im ribosomalen Tunnel. Die schwarzen Bereiche zeigen die Schnittstellen. **D** Vergleich des Δ UBA-aeNAC Modells zur Kristallstruktur der TF-BD (in Dunkelblau dargestellt) am Ribosom (Schlunzen et al., 2005).

Hefe), wobei für diesen Vergleich nicht vergessen werden darf, dass die biochemischen Ergebnisse das Hefe System beschreiben und die Kristallstruktur das archaebakterielle.

Das in Abbildung 44 hypothetisch positionierte Modell für aeNAC ist einmal aufgrund der unzureichenden Daten, die keine Erkennung von Sekundärstrukturen zulässt, fraglich, zum anderen ist in der Kristallstruktur ein großer Teil der ribosomalen Proteine um den Tunnelausgang durch Kristallkontakte behindert. Da NAC höchst wahrscheinlich über mehr als eine Bindungsstelle am Ribosom fixiert ist, ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der spezifischen Bindungsstellen am Ribosom durch Kristallkontakte behindert ist und damit der zweite Kontakt von NAC am Ribosom, abseits der Bindung direkt am Tunnelausgang, unspezifisch ist und eine artifizielle Situation präsentiert (siehe Beschreibung zu Abbildung 44). Da die dimere β -Fass-Struktur der NAC-Domäne flexibel mit dem N-terminalen α -helikalen Teil, der ans Ribosom bindet, verknüpft ist, wäre ebenfalls eine Reihe von anderen Orientierungen der dimeren β -Fass-Struktur der NAC-Domäne möglich und die tatsächliche Orientierung wäre von der Fixierung über zwei Bindungsstellen am Ribosom abhängig.

Diese vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass zwar das Modell des aeNAC am Ribosom und besonders die Orientierung der NAC-Domäne aus diesen Daten nicht festgelegt werden kann, sie präsentieren dennoch eine spezifische Bindungsstelle des archaebakteriellen NAC direkt am ribosomalen Tunnelausgang und geben auch im Vergleich zur TF-BD, Anhaltspunkte für die Positionierung der flexiblen hydrophoben Tasche der dimeren NAC-Domäne über dem Tunnelausgang.

3.8 Modell für eukaryontisches wt - NAC

Die bisher beschriebene Struktur von eukaryontischem $\alpha\beta$ -NAC umfasst nur die heterodimere NAC-Domäne. Die NAC-Domäne ist zwar der am höchsten konservierte Bereich des $\alpha\beta$ -NAC Komplexes, er repräsentiert aber nur einen Teil der Gesamtstruktur und es stellt sich die Frage welche Funktion der Rest der Struktur erfüllt und ob es möglich ist ein Modell für den Gesamtkomplex zu entwickeln.

In Abschnitt 3.1 wurde ein Großteil der Struktur als intrinsisch ungeordnet identifiziert. Wie in Abschnitt 3.1 hervorgehoben ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die dimere NAC-Domäne der strukturierte Kern des Komplexes und der Rest der Sequenz faltet in modular verknüpfte Sekundärstrukturelemente oder Schleifen-Bereiche, die zusammen keine definierte Tertiärstruktur ausbilden. Ausgehend von der Kristallstruktur der heterodimeren NAC-Domäne und Modellen der individuellen Sekundärstrukturelemente wurde entsprechend der Sekundärstrukturvorhersage, ein Modell für eukaryontisches wt- $\alpha\beta$ -NAC in Lösung entwickelt (siehe Abbildung 45). Das Modell präsentiert sicherlich nur eine wenig zureichende Beschreibung der Gesamtstruktur in Lösung und es sind eine Vielzahl von Orientierungen der einzelnen Sekundärstrukturelemente möglich, von denen hier nur beispielhaft eine gezeigt wird.

Der Vergleich der Sequenzen der eukaryontischen NAC Homologen zeigt eine Konservierung von charakteristischen Eigenschaften der ungeordneten Sequenzbereiche. Wie in Abbildung 45 dargestellt sind für einen Großteil der ungeordneten Sequenzbereiche nicht direkt die Sequenz, aber eine charakteristische Aminosäurezusammensetzung konserviert und es stellt sich die Frage warum ein so großer Teil der Struktur eines Ribosomen-assoziierten Faktors eine scheinbar konservierte Verteilung von intrinsisch ungeordneten Bereichen besitzt.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass in den letzten Jahren mehr und mehr Proteine identifiziert wurden, die in Lösung Bereiche von intrinsischer Unordnung aufweisen, das heißt diese Proteine besitzen Sequenzbereiche mit über 40 Aminosäuren Länge, die in Lösung, ohne den entsprechenden Bindungspartner in einer ungeordneten Struktur, wie beispielsweise *random coil*, *extended disorder* oder *molten globule* vorliegen, die keine definierte Tertiärstruktur bilden (Dunker et al., 2002; Uversky, 2002). Entgegen dem Paradigma kodieren aber genau diese Bereiche für eine definierte Funktion. Je komplexer der Organismus, desto höher scheint die Zahl der intrinsisch ungeordneten Bereiche zu sein, in höheren Eukaryonten wird vermutet, dass über 30% der Proteine solche funktionell ungeordneten Bereiche enthalten (Dunker et al., 2001). Diesen ungeordneten Strukturelementen kommt in den meisten Proteinen eine regulatorische Funktion zu und sie sind involviert in Prozessen wie Regulation der Transkription, Translation und Signal-Transduktion (für detaillierte Übersicht und Beispiele siehe Dyson und Wright, 2005).

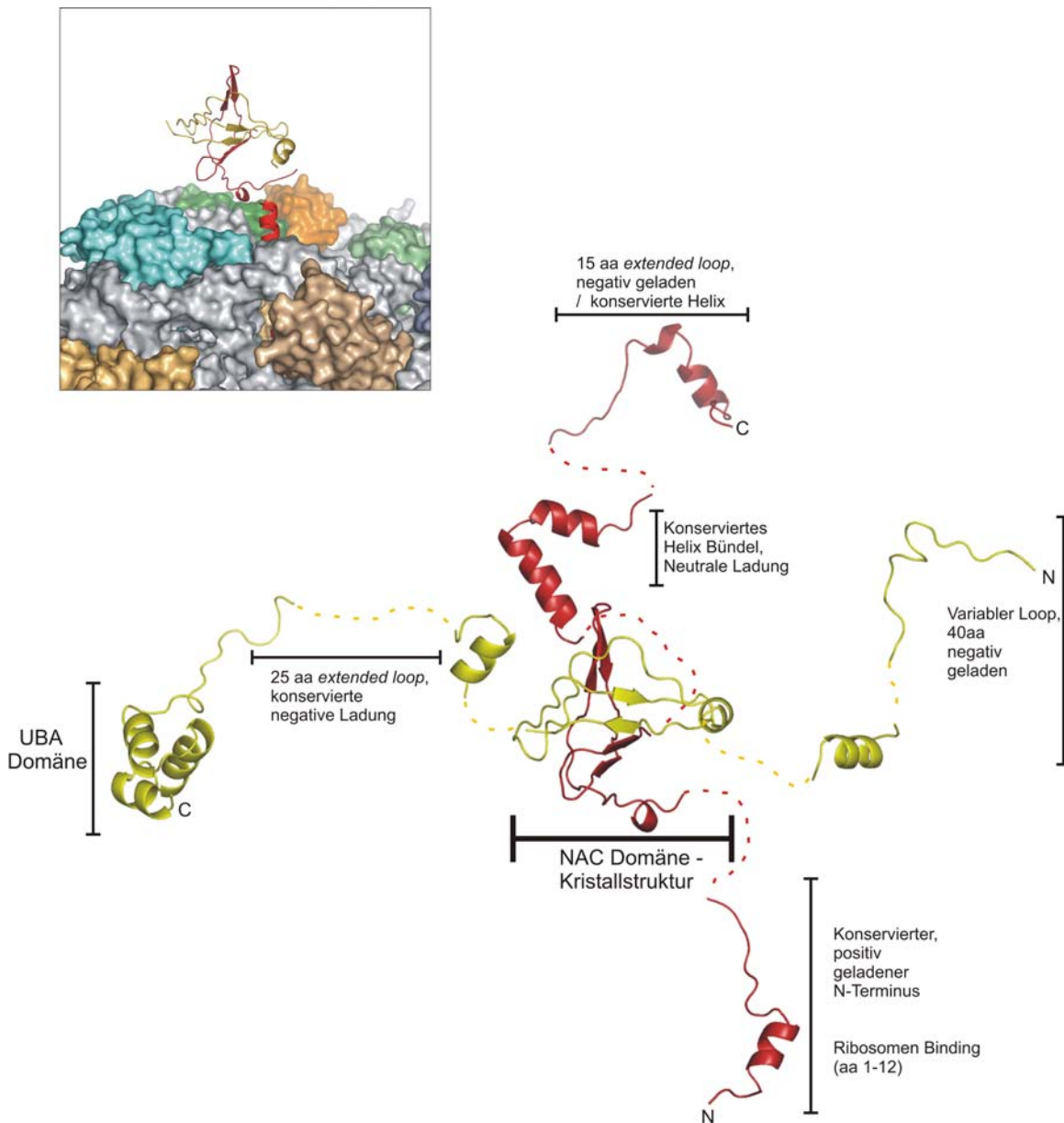


Abbildung 45 Modell für eukaryontisches wt- $\alpha\beta$ -NAC. Das Modell zeigt in der Mitte die Kristallstruktur der heterodimeren humanen NAC-Domäne. Der übrige Teil der Struktur wurde entsprechend der Sekundärstrukturvorhersage und den als intrinsisch ungeordnet identifizierten Bereichen modelliert. Die charakteristische Aminosäureverteilung der einzelnen Bereiche ist hervorgehoben. Links oben ist zum Vergleich das Modell der heterodimeren NAC-Domäne am Ribosom dargestellt

Der Vorteil der ‘ungeordneten Domänen’ gegenüber globulären Domänen in regulatorischen Prozessen ist, dass diese Elemente durch eine Kopplung von Faltung und Bindung mehrere Bindungspartner mit hoher Spezifität aber niedriger Affinität binden können und damit besser als grosse globuläre Domänen für regulatorische

kurzzeitige Wechselwirkungen mit einer Reihe von Bindungspartnern geeignet sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass die ungeordneten Bereiche durch posttranslationale Modifikationen leicht selbst reguliert werden können (Dyson und Wright, 2005; Uversky, 2002).

Für den Ribosomen-assoziierten Faktor NAC bleibt die Frage, wieso im Gegensatz zum archaebakteriellen Homolog ein großer Teil der Struktur ungeordnet vorliegt. Als Bindungspartner für NAC ist bis jetzt nur das Ribosom gesichert. Ein Teil der ungeordneten Sequenzen wird sich wahrscheinlich durch die Bindung ans Ribosom falten und die Bindung vermitteln. Wie erwähnt ist der N-Terminus von β NAC essentiell für die Bindung ans Ribosom, aber nach dem vorgeschlagenen Modell wären mindestens zwei Bindungsstellen am Ribosom zur Positionierung der NAC-Domäne notwendig.

Trotzdem sind mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht alle ungeordneten Bereiche an der Bindung ans Ribosom beteiligt und der für einen Ribosomen-assoziierten Faktor ungewöhnlich hohe Anteil an ungeordneten Sequenzbereichen wirft die Frage auf inwieweit NAC über diese ungeordneten Bereiche eine stärker regulatorische Funktion erfüllt. Es ist beispielsweise denkbar, dass NAC als erster Faktor der am Ribosom mit der wachsenden Polypeptidkette wechselwirkt, eine regulatorische Komponente in der Rekrutierung der weiteren Faktoren des Chaperonnetzwerkes und der Proteinzielsteuerung zukommt und damit der komplexeren Proteinfaltung in Eukaryonten Rechnung trägt. Grallath et al. berichtet in diesem Zusammenhang kürzlich eine Wechselwirkung von NAC und SRP (Grallath et al., 2005). Genauso ist es allerdings möglich, dass NAC eine bis jetzt unbekannte zusätzliche Funktion am Ribosom oder im Cytosol zukommt. Unabhängig von der tatsächlichen Funktion deutet die Präsenz dieses ungewöhnlich hohen Anteils an ungeordneten Sequenzbereichen und darüber hinaus die Identifikation der UBA-Domäne von α -NAC auf eine zusätzliche regulatorische Komponente von NAC hin.