

Zusammenfassung (2 Seiten):

Die Qualitätskontrolle von sowohl löslichen als auch membran-gebundenen Proteinen des sekretorischen Weges erfolgt über das Endoplasmatische Retikulum (ER) assoziierte Degradationssystem (ERAD). Die vorliegende Dissertation umfasst strukturelle und funktionelle Studien zu diversen Proteinkomplexen, welche für den ERAD Prozess verantwortlich sind.

Die ERAD Ubiquitin E3 Ligase Komplexe HRD1 und DOA10 bewerkstelligen die Erkennung fehlgefalteter Proteine, deren Transport über die ER Membran und den Prozess der Synthese von K48-verknüpften Ubiquitinketten auf Substratproteinen, um diese für den Abbau durch das Proteasom zu markieren.

In dieser Arbeit habe ich mittels NMR-Spektroskopie die Struktur der MRH Domäne von Yos9, dem ERAD-Substratrezeptor, in zwei distinkten Konformationen gelöst: in einer freien Form, sowie gebunden an ein komplexes Oligosaccharid (3 α , 6 α -Mannopentaose). Dieser Zucker weist dabei das gleiche terminale α 1,6-gebundene Mannose-Strukturmerkmal auf, welches auch auf fehlgefalteten Proteinen im ER Lumen präsentiert wird, um diese für den ERAD Prozess zu markieren. Die Struktur der MRH Domäne besteht aus einer aus neun β -Strängen bestehenden β -Fasstruktur, der eine 20 Aminosäure lange α Helix angelagert ist. Erkennung der richtig prozessierten Glykanstruktur erfolgt durch eine greifende Bewegung von drei Schleifenregionen (β 1 β 2, β 6 β 7, β 8 β 9) der MRH Domäne und involviert auch das konservierte FW-Motif.

Die Polyubiquitinierung der Substratproteine auf der zytoplasmatischen Seite der ER Membran wird durch das Zusammenwirken der Proteine Cue1, Ubc7 und Hrd1 vermittelt. Cue1 ist ein Aktivator des E2 Enzyms Ubc7 und trägt sowohl eine Ubiquitin-bindende CUE Domäne als auch eine Ubc7-aktivierende Region (U7BR). Meine NMR Titrationsstudien zeigen, dass die CUE Domäne präferentiell an das proximale, K48-verknüpfte Ubiquitin in Diubiquitin bindet. Obwohl diese Bindungspräferenz nur gering ausgeprägt ist, zeigen kinetische Studien mittels Fluoreszenz-basierten Ubiquitinierungsassays, den Einfluss und die Korrelation zwischen Ubiquitinbindung und Ubiquitinkettenelongationsraten. Zudem ist die Abbaurate des ERAD Modells substrates Ubc6 *in vivo* bei dysfunktionaler CUE Domäne verlangsamt, welches die Bedeutung von Ubiquitinbindungsprozessen beim effizienten Aufbau der Ubiquitinsignale verdeutlicht.

Die Unfähigkeit der CUE Domäne die Bildung von Diubiquitin zu fördern, Mutationen an bestimmten Stellen innerhalb einer Ubiquitinkette, sowie Experimente an chemisch vernetzten CUE-Ub Komplexen zeigen, dass der Verlängerungsprozess nur dann optimal stattfindet, wenn die CUE Domäne eine Bindestelle direkt benachbart zum distalen Akzeptorubiquitin einnimmt. Durch die Positionspräferenz organisiert Cue1 die räumliche Anordnung der enzymatischen Komponenten und beteiligten Moleküle am distalen Ende einer Ubiquitinkette und bewirkt eine effiziente Verlängerung. Diese Kettenbildungsaktivität von Ubc7 kann durch Bindung der RING Domänen der

E3 Ubiquitin Ligasen weiter moduliert und beschleunigt werden. Mittels NMR-basierter Titrationsexperimente habe ich die Interaktionsoberflächen des Donorubiquitins und der RING Domänen von Hrd1 und Doa10 auf den beteiligten Proteinen kartiert und auch ein HADDOCK Modell des Ubc7-U7BR-Hrd1(RING)-Komplexes berechnet. Fluoreszenz-basierte kinetische Messungen zeigen, dass Hrd1 deutlich aktivierender wirkt als Doa10, da Hrd1 im Gegensatz zu Doa10 allosterische Veränderungen in der Region um das katalytische Cystein von Ubc7 auslöst und so höchstwahrscheinlich die Entladung des E2 Enzyms fördert. Ubc7 ist weiterhin in der Lage transient zu dimerisieren. Ubiquitinkettenelongationsexperimente zeigen, dass Ubc7 deutlich schneller Diubiquitin aus Monoubiquitin formt als in zehnfach-höherer Konzentration vorliegende Diubiquitinketten zu verlängern. Die schnelle und präferentielle Bildung von Diubiquitin lässt sich dabei durch Dimerisierung von Ubiquitin-beladenen Ubc7 Molekülen erklären. NMR Experimente, welche auf paramagnetischer Relaxationsverstärkung basieren, unterstützen das Modell der Bildung von transienten dimeren Ubc7-Komplexen. Diese Erkenntnisse erweitern das Modell der Ubiquitinierung im ERAD Prozess dahingehend, dass Ubc7-Dimerisierung die Ketteninitiation durch Konjugation eines Diubiquitins auf ein Substrat katalysiert. Anschließend erfolgt CUE Domänen-abhängige und prozessive Kettenelongation.

Die im Rahmen des ERAD Prozesses gebildeten Ubiquitinketten weisen vorwiegend K48-Verknüpfungen zwischen den Ubiquitinen auf und dienen als Signal zur proteasomalen Degradation. In der Literatur sind zahlreiche Studien zu finden, welche sich speziell mit der Konformation dieser Kettenart beschäftigen. Jedoch liefern diese Studien nur Schnappschüsse spezifischer Konformationen, die entweder durch Kristallkontakte stabilisiert sind (Kristallstrukturen) oder basierend auf kurzreichweitigen Distanzeinschränkungen bestimmt wurden. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von gepulster Elektronen-Elektronen Doppelresonanz (PELDOR) Spektroskopie gezeigt, dass K48-verknüpfte Ubiquitinketten eine breite Konformationsverteilung einnehmen, welche durch distinkte höher populierte Regionen gekennzeichnet ist. Dieser Konformationsraum kann über interagierende Proteine verschiedenartig moduliert werden. Die CUE Domäne von Cue1 bindet die untersuchte Diubiquitinkette unter konformationeller Selektion von vorher schon hochpopulierten, offenen Konformationen, um die Zugänglichkeit des Lysinrestes des distalen Akzeptorubiquitins sicherzustellen. Im Gegensatz verschieben deubiquitinierende Enzyme das Konformations-Ensemble zu Gunsten vorher sehr gering oder sogar nicht populierten Konformationen, um sich so über einen Mechanismus der konformationellen Umgestaltung Zugang zur Isopeptidbindung zwischen den Ubiquitineinheiten zu verschaffen. Verlängerung der Ubiquitinkette erhöht die konformationelle Flexibilität und der Konformationsraum wird stark erweitert. Die gefundene hohe Flexibilität längerer Ketten scheint notwendig zu sein um beispielsweise die simultane Assoziation mit den proteasomalen Rezeptoren Rpn10 und Rpn13 zu bewerkstelligen, ohne eine weitere strukturelle Umgestaltung der Kette zu benötigen.