

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

Abteilung Molekulare Strukturbiologie

Substrat-Translokation im 20S Proteasom aus
Thermoplasma acidophilum

Sarah Magdalena Breuer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf
Prüfer der Dissertation:

1. Hon.-Prof. Dr. W. Baumeister
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 07. September 2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 25. November 2010 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	8
Zusammenfassung	12
Summary	14
1. Einleitung	15
1.1 Das 20S Proteasom	16
1.1.1 Struktur des 20S Proteasoms	16
1.1.2 Katalytischer Mechanismus des 20S Proteasoms	18
1.2 Das regulatorische Partikel PAN	20
1.2.1 Funktion des regulatorischen Partikels PAN	20
1.2.2 Struktur des regulatorischen Partikels PAN	20
1.3 Translokation von Substraten	22
1.4 Aufgabenstellung	23
2. Material und Methoden	26
2.1. Material	26
2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	26
2.1.2. Geräte.....	26
2.1.3. Kits und Standards.....	26
2.1.4. Enzyme und Antikörper.....	28
2.1.5. Bakterienstämme und Medien	29
2.1.6. Puffer und Lösungen	29
2.1.6.1. <i>Lösungen für molekularbiologische Arbeitsmethoden</i>	30
2.1.6.2. <i>Lösungen für biochemische Arbeitsmethoden</i>	30
2.1.6.3. <i>Lösungen für immunologische Arbeitsmethoden</i>	33
2.1.7. Plasmide.....	33
2.1.8. Primer	33
2.2. Molekularbiologische Methoden	34
2.2.1. Herstellung hitzekompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	34
2.2.2. Hitzeschocktransformation	34
2.2.3. Zielgerichtete Mutagenese.....	35
2.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	37
2.2.5. Restriktionsverdau	37
2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.7. Gelelution und Ligation.....	39
2.2.8. DNA-Sequenzierung	39
2.3. Biochemische Arbeitsmethoden	39
2.3.1. Expression von Strukturgenen	40
2.3.1.1. <i>Rekombinante Expression in E.coli mit IPTG-Induktion</i>	40
2.3.2. Zellaufschluss von <i>E.coli</i>	41
2.3.3. Chromatographie	41
2.3.3.1. <i>Ni-Affinitätschromatographie</i>	42
2.3.3.2. <i>Gelfiltrationschromatographie</i>	42
2.3.4. Automatisierte Reinigung mittels <i>ÄKTA Explorer-Kit</i>	42
2.3.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44

2.3.6.1.	<i>SDS-PAGE</i>	44
2.3.6.2.	<i>Native PAGE</i>	45
2.3.7.	Coomassie-Färbung.....	46
2.3.8.	Konzentrationsbestimmung	46
2.3.8.1.	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung</i>	46
2.3.8.2.	<i>Kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	48
2.3.9.	Konzentration und Umpuffern von Proteinlösungen	48
2.3.10.	Inhibition des 20S Proteasoms durch clasto-Lactacystin β -lacton.....	49
2.3.11.	Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen.....	49
2.3.12.	Herstellung von Host-Guest-Komplexen	50
2.4.	Immunologische Arbeitsmethoden	50
2.5.	Bestimmung der enzymatischen Aktivität	51
2.5.1.	Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit Suc-LLVY-Amc und Mca-RPPGFSAFK(Dpn)-OH.....	51
2.5.2.	Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit Casein	53
2.5.	Mikroskopie.....	54
2.5.1.	Konfokale Mikroskopie	54
2.5.2.	Transelectronenmikroskopie.....	55
2.6.	CD Spektroskopie	56
2.7.	Kristallisation für die Röntgenstrukturanalyse	57
2.8.	Massenspektrometrie.....	57
3.	Ergebnisse	58
3.1.	Übersicht.....	58
3.2.	Ergebnisse molekularbiologischer Arbeiten.....	61
3.2.1.	Mutagenese-PCR.....	61
3.2.2.	Klonierung	61
3.3.	Proteinexpression und Reinigung	61
3.3.1.	Expression und Reinigung von 20S Proteasommutanten und Hybridproteinen 61	
3.3.2.	Expression und Reinigung von α -Synuclein.....	63
3.4.	Substratverteilung im 20S Proteasom	63
3.4.1.	Fluoreszenzuntersuchungen von Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene.....	64
3.4.2.	Untersuchung von Hybridproteinen des 20S Proteasoms und α -Synuclein	68
3.5.	Einfluß der Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten auf die Substrattranslokation	73
3.5.1.	Kinetische Analysen des <i>wt</i> 20S Proteasoms mit verschiedenen Substraten ...	76
3.5.2.	Kinetische Analyse von 20S Proteasom-Mutationen an den Kontaktflächen ..	83
3.5.3.	Kristallisation von 20S Proteasommutanten und Host-Guest-Komplexen	93
3.6.	Versteifung der 20S Proteasomstruktur	95
4.	Diskussion und Ausblick	103
4.1.	Substratverteilung im 20S Proteasom	104
4.1.1.	Fluoreszenzuntersuchungen von Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene.....	104
4.1.2.	Untersuchungen von Hybridproteinen des 20S Proteasoms und α -Synuclein	105
4.2.	Einfluß der Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten auf die Substrattranslokation	106
4.3.	Versteifung der 20S Proteasomstruktur	110

5. Anhang	112
5.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	112
5.2. Geräte	116
5.3. Plasmide	118
5.4. Primer	121
5.5. Massenspektrometrische Analyse der Schnittstellen in Bodipy FL Casein zu verschiedenen Verdauzeitpunkten	125
5.6. Kinetische Analyse verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms	130
Danksagungen	144

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Å	Angström, 10^{-10} m
AAA	„ATPases associated with various cellular activities“
Amc	7-Amino-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
AU	engl. <i>arbitrary units</i> , beliebige Einheit
A_λ	Absorption bei der Wellenlänge λ
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat / Nitro blue Tetrazolium
bp	engl. <i>base pair</i> , Basenpaar
BSA	engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> , bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CCD	engl. <i>charge coupled device</i>
d	Schichtdicke
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DOL	engl. <i>degree of labeling</i> , Markierungseffizienz
ds	engl. <i>double stranded</i> , doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
ϵ_λ	molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EM	engl. <i>electron microscopy</i> , Elektronenmikroskop(ie)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HGC	„Host-Guest“ Komplex
His ₆	Hexahistidin
HMW	engl. <i>high molecular weight</i> , hohes Molekulargewicht
HPLC	engl. <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
k	kilo (10 ³)
k _{kat}	katalytische Konstante
K _M	Michaelis-Menten Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
μ	mikro (10 ⁻⁶)
M	molar (mol/l)
MW	Molekulargewicht
m	Meter
m	als Vorsilbe: milli (10 ⁻³)
Milli-Q	deionisiertes Wasser
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MWCO	engl. <i>molecular weight cut-off</i> , Ausschlussmolekulargewicht
n	nano (10 ⁻⁹)
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> , magnetische Kernspinresonanz
Ntn	engl. <i>N-terminal nucleophile</i>
OD _λ	optische Dichte bei einer Wellenlänge λ
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDB	engl. <i>protein data bank</i> , Protein Datenbank
pH	
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	engl. <i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SLS	engl. <i>Swiss Light Source</i>
ss	engl. <i>single stranded</i> , einzelsträngig
Suc-LLVY- Amc	N-Succinyl-LLVY-7-amino-4-methylcoumarin

Abkürzungsverzeichnis

TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	engl. <i>tris-buffered saline</i> , Tris gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
™	engl. <i>trademark</i>
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vis	sichtbares Licht
w/v	Gewicht pro Volumen
<i>wt</i>	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung g ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)

Aminosäuren				Nukleobasen	
Ala, A	Alanin	Leu, L	Leucin	A	Adenin
Arg, R	Arginin	Lys, K	Lysin	C	Cytosin
Asn, N	Asparagin	Met, M	Methionin	G	Guanin
Asp, D	Aspartat	Phe, F	Phenylalanin	T	Thymin
Cys, C	Cystein	Pro, P	Prolin		
Gln, Q	Glutamin	Ser, S	Serin		
Glu, E	Glutamat	Thr, T	Threonin		
Gly, G	Glycin	Trp, W	Tryptophan		
His, H	Histidin	Tyr, Y	Tyrosin		
Ile, I	Isoleucin	Val, V	Valin		

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1.0.1:	Cryoelektronenmikroskopische Struktur des <i>Drosophila melanogaster</i> 26S Proteasoms	S.15
Abb. 1.1.1.1:	Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus <i>Ta</i>	S.17
Abb. 1.1.1.2:	Röntgenkristallstruktur der beiden Untereinheiten des 20S Proteasoms aus <i>Ta</i>	S.17
Abb. 1.1.2.1:	Vorgeschlagener Mechanismus der auto-katalytischen Prozessierung des Propeptids zur Generierung der katalytisch aktiven β -Untereinheit des 20S Proteasoms	S.18
Abb. 1.1.2.2:	Vorgeschlagenes Schema zum katalytischen Mechanismus des 20S Proteasoms	S.19
Abb. 1.2.2.1:	Auf der Röntgenkristallstruktur der Subkomplexe I und II basierendes Modell des regulatorischen Partikel PAN	S.21
Abb. 1.2.2.2:	Verengungen innerhalb des Kanals von Subkomplex I und II	S.22
Abb. 1.3:	Modell zur Funktionsweise des PAN / 20S Komplexes	S.23
Abb. 3.1.1:	Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs zur Herstellung der im Rahmen der Arbeit benötigten Proteine in Form eines Flussdiagramms	S.60
Abb. 3.3.1.1:	Ausschnitt aus dem Gelfiltrationschromatogramm der Mutante S95A Q98A E99A	S.62
Abb. 3.4.1.1:	Schematische Darstellung eines markierten Host-Guest-Komplexes	S.65
Abb. 3.4.1.2:	Exemplarische Scans des konfokalen Rasterfluoreszenzmikroskops bei unterschiedlichen Anregungs- und Detektionswellenlängen	S.66
Abb. 3.4.2.1:	Schematische Darstellung der Hybridproteine für die NMR-Messungen	S.69
Abb. 3.4.2.2:	SDS PAGE vom Verdau von α -Synuclein wt und α -Synuclein aa 70 -140 durch das 20S Proteasom bei 60°C	S.70
Abb. 3.4.2.3:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Hybridproteine	S.71

Abb. 3.5.0.1:	Superposition des Aminosäurerückgrats der Untereinheiten aus der Röntgenkristallstruktur des „leeren“ 20S Proteasoms und des Host-Guest-Komplexes in Liniendarstellung	S.73
Abb. 3.5.0.2:	Kontaktflächen zwischen den α -Untereinheiten sowie zwischen den α - und β -Untereinheiten der Röntgenkristallstruktur des Host-Guest-Komplex	S.74
Abb. 3.5.0.3:	Aminosäuren auf den α_1 - α_2 Kontaktflächen und deren zugehörige Interaktionspartner der Host-Guest-Komplex Röntgenkristallstruktur in Aufsicht	S.75
Abb. 3.5.0.4:	Aminosäuren auf den α_1 - β , α_2 - β Kontaktflächen und deren zugehörige Interaktionspartner der Host-Guest-Komplex Röntgenkristallstruktur	S.75
Abb. 3.5.1.1:	Verdau von Suc-LLVY-A durch das wt 20S Proteasom in Abhängigkeit von Salzen und chaotropen Denaturanzien	S.77
Abb. 3.5.1.2:	Verdau von Bodipy FL Casein durch das wt 20S Proteasom in Abhängigkeit von Salzen und chaotropen Denaturanzien	S.78
Abb. 3.5.1.3:	CD Spektren von Casein (normiert und geglättet)	S.79
Abb. 3.5.1.4:	Substratumsatz bei verschiedenen Substratkonzentrationen	S.80
Abb. 3.5.1.6:	Durch massenspektrometrische Untersuchungen identifizierte Spaltstellen in Nona- und Tetrapeptid	S.81
Abb. 3.5.2.1:	SDS- und Native PAGE von einem Satz 20S Proteasommutanten und dem dazugehörigen wt Probe	S.83
Abb. 3.5.2.2:	Mutationen der α_1 - β Kontaktfläche und in deren Nähe	S.85
Abb. 3.5.2.3:	Mutationen der α_2 - β Kontaktfläche	S.86
Abb. 3.5.2.4:	Mutationen der R86 und Porenregion sowie der Oberflächen der zylindrischen Enden (E205 und E206)	S.87
Abb. 3.5.2.5:	Mutationen S2 –S3 loop Region und in deren Nähe	S.88
Abb. 3.5.2.6:	Verdau von Bodipy FL Casein durch das wt 20S Proteasom und die Mutante E99A bei verschiedenen GuHCl-Konzentrationen	S.92
Abb. 3.5.3.1:	Typische Kristalle von nach der hanging-drop Methode kristallisierten 20S Proteasomen	S.93

Abb. 3.6.1:	Schematische Darstellung des 20S Proteasoms in Form eines Zylinders und Cartoondarstellung von zwei α - und drei β -Untereinheiten	S.96
Abb. 3.6.2:	Native PAGE der gereinigten 20S Cysteindoppelmutanten zur Verknüpfung der Untereinheiten sowie der Alaninmutanten	S.97
Abb. 3.6.3:	Reduzierende SDS PAGE der gereinigten Cysteindoppelmutanten zur Verknüpfung der Untereinheiten sowie der Alaninmutanten	S.97
Abb. 3.6.4:	Nicht-reduzierendes SDS-PAGE der gereinigten Cysteindoppelmutanten zur Vernetzung der Untereinheiten	S.98
Abb. 3.6.5:	SDS-PAGE und Western Blots zur Detektion des His ₆ -tag von β -Untereinheiten des 20S Proteasoms	S.99
Abb. 3.6.6:	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Alaninmutante F133A	S.100
Abb. 3.6.7:	Aktivitätsmessungen zu den Cysteindoppelmutant zur Vernetzung der Kontaktflächen, Aktivitätsstudien zu den Alaninmutanten	S.101

Tabellen

Tab. 2.1.:	Stocklösungen für die rekombinante Expression von Strukturgenen	S.30
Tab. 2.2.:	Zusammensetzung der Schägger-SDS-Page	S.31
Tab. 2.3.:	Reaktionsgemisch für die zielgerichtete Mutagenese zur Generierung von Mutanten des 20S Proteasoms	S.35
Tab. 2.4.:	Programm des Thermocyclers für die ziel-gerichtete Mutagenese in zwei Stufen	S.35
Tab. 2.5.:	Reaktionsgemisch für den Restriktionsverdau der verwendeten Plasmide zur Überprüfung der Transformation	S.38
Tab. 2.6.:	Reaktionsgemisch für den Restriktionsverdau von Midi-Prep Plasmid-DNA für Klonierungen	S.38
Tab. 2.7:	Molare Extinktionskoeffizienten von Proteinen und Fluoreszenzfarbstoffen	S.47

Tab. 3.4.1.1:	Ermittelte durchschnittliche Markierungs-effizienzen (DOL) der für die Host-Guest-Komplexe Herstellung verwendeten markierten Proteine	S.65
Tab. 3.4.1.2:	Auswertung der Kollokalisations- und FRET Untersuchungen von Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene	S.67
Tab. 3.4.2.1:	Molekulargewichte der gereinigten Proteine in kDa	S.70
Tab. 3.4.2.2:	Ergebnisse zur Assemblierung der Proteasomanteile der Hybridprotein	S.71
Tab. 3.5.1.1:	Proteine, von denen Peptidfragmente in der massenspektrometrischen Analyse des Bodipy FL Casein Verdaus identifiziert wurden	S.82
Tab. 3.5.2.1:	Gliederung der Mutanten in Gruppen, abhängig von ihrem relativem Umsatz in den Aktivitätsmessungen	S.90
Tab. 3.6.1:	Durch computergestützte Analyse ermittelte, zur Mutation ausgewählte Cysteindoppelmutanten und C α - C α Abstände voneinander	S.95
Tab. 3.6.2:	Alaninmutanten der Doppelcysteinmutanten aus Tab. 3.6.1	S.95
Tab. 5.1.:	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide und deren Antibiotikaresistenz	S.118
Tab. 5.2.:	Sequenzen der verwendeten Primer	S.121

Zusammenfassung

Das 20S Proteasom ist ein etwa 700 kDa schwerer multikatalytische Proteasekomplex von 700 kDa, der in allen drei Königreichen des Lebens vertreten ist. In Eukaryonten bildet dieser Komplex zusammen mit den 19S Kappenkomplexen das 26S Proteasom, welches eines der Elemente des ATP-abhängigen Ubiquitin-Proteasom-Systems ist. Der Eingang des 20S Proteasoms ist durch eine Pore mit einem Durchmesser von 1,3 nm begrenzt, deren Durchlässigkeit als geschwindkeitsbestimmender Schritt der Substrattranslokation im 20S Proteasom betrachtet wird.

Obwohl der Mechanismus der Porenöffnung durch ein regulatorisches Partikel aufgeklärt worden ist, ist über die Substratverteilung im Inneren des 20S Proteasoms nur wenig bekannt. Um einen besseren Einblick in diese zu bekommen, wurden hier fluoreszenz-markierte Host-Guest-Komplexe für Einzelmolekülanalysen sowie α -Synuclein-20S Proteasom Hybridproteine mit unterschiedlich langen Synuclein-Fragmenten für NMR Untersuchungen hergestellt. Diese sollten im Weiteren in Kooperationen untersucht werden.

Auch die Auswirkungen einer möglicherweise dynamischen Verschiebung der α -Untereinheiten bei Bindung des regulatorischen Komplexes sind bisher schlecht verstanden. Eine solche Verschiebung setzt eine Flexibilität der Untereinheiten voraus und induziert wahrscheinlich Änderungen auf Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten. Um den Einfluß einer Erhöhung der strukturellen Flexibilität auf den Substratumsatz zu untersuchen, wurde eine umfangreiche Mutationsanalyse durchgeführt. Zur Erhöhung der strukturellen Flexibilität wurden überwiegend Punktmutationen eingeführt, und zwar an den α - α und α - β Kontaktflächen oder in deren Nähe. Die proteolytische Aktivität wurde mit verschiedenen Substraten untersucht. Für bestimmte Mutationen der α -Untereinheiten wurde ein signifikant größerer Casein-Umsatz gemessen als für den *wt.* Dies könnte ein Hinweis auf eine zusätzliche Poren-unabhängige Aktivierung des 20S Proteasoms bei Bindung des regulatorischen Partikels durch Unterbrechung von Wasserstoffbrücken sein.

Ein anderer Ansatz bestand darin, die Flexibilität der Kontaktflächen durch kovalente Vernetzung zu verringern. Hierzu wurden gezielt Cysteinmutationen zwecks Bildung von Disulfidbrücken eingeführt.

Zwar gelang es nicht die angestrebte Versteifung zu demonstrieren, im Zuge der Mutationsstudien wurde jedoch entdeckt, dass bestimmte Punktmutationen der β -Untereinheiten das Proteasom strukturell destabilisieren und gleichzeitig inaktivieren.

Anscheinend reichen subtile strukturelle Veränderungen an den β - β Grenzflächen aus, um das aktive Zentrum in eine inaktive Konformation zu versetzen.

Summary

The 20S proteasome is a multicatalytic protease, approx. 700 kDa of mass, which is present in all three kingdoms of life. In eukaryotes it is capped by one or two 19S regulatory particles, resulting in the formation of the 26S proteasome, which is part of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome-system. The entrance to the 20S Proteasome is restricted by a pore of a 1,3 nm diameter whose permeability is regarded as the rate limiting step of substrate translocation in the 20S proteasome.

Although the opening of the pore via a regulatory particle has been elucidated, only little is known about substrate distribution in the interior. In order to study this aspect, fluorescent-labeled Host-Guest-Complexes to be analysed by single molecule analysis and α -synuclein-20S Proteasom hybridproteins with synuclein fragments of varying length to be analysed by NMR were prepared.

The impact of a possible dynamical displacement of the α -subunits upon binding of a regulatory complex is still poorly understood. Such displacement implies a flexibility of the subunits and probably induces a change in their interfaces. To study the the impact of enhanced flexibility of the subunits on substrate turnover a detailed mutational analysis was performed in the course of this work. To enhance structural flexibility, mainly point-mutations were introduced into the α - α and α - β interfaces or in their proximity. The proteolytic activity of these mutants was studied with different substrates. For certain mutations of the α -subunits a significantly enhanced Casein turnover compared to the *wt* was observed. This might indicate that an extra pore-independent activation of the 20S proteasom via disruption of hydrogen bridges upon binding of a regulatory particle might occur.

Another approach was to reduce the structural flexibility via covalent attachment of the subunits to one another. Therefore several cysteine mutations were introduced to neighbouring interfaces of subunits for disulfide bridge formation.

Although the desired stiffening could not be demonstrated, this mutational analysis showed that some point mutations of the proteasomal β -subunits structurally destabilized and also inactivated the proteasome. Obviously, even minor structural changes at the β - β interfaces were able to induce an inactive conformation of the active site.

1. Einleitung

In Zellen werden kontinuierlich Proteine in unterschiedlichen Zeitintervallen synthetisiert und wieder degradiert [Goldberg et. al., 1976; eukaryontische Zellen: Schoenheimer, 1942]. Eine schnelle Degradation von regulatorischen Proteinen des Zellzyklus oder der Gentranskription ist dabei für den Zellhaushalt ebenso essentiell, wie die Degradation von falsch gefalteten Proteinen, deren Akkumulation die Zelle schädigen könnte [Fagan et al. 1991; Dice 1987]. Eukaryontische Zellen besitzen eine Vielzahl von proteolytischen Systemen, wie lysosomale Proteasen und das ATP-abhängige Ubiquitin-Proteasomsystem, die eine Degradation gewährleisten [Hough et al. 1987; Gronostajski et al. 1985; Tawa et al. 1992]. Von diesen Systemen baut das ATP-abhängige Ubiquitin-Proteasomsystem die meisten zellulären Proteine ab und ist auch für die spezifische Prozessierung der MHC (*Major histocompatibility complex*) Klasse I limitierten Antigene zuständig [Rock et al. 1994]. Zur Degradation bestimmte Proteine werden zunächst mit multiplen Ubiquitinmolekülen modifiziert, vom 26S Proteasom erkannt und anschließend degradiert [Hershko und Ciechanover 1992]. Die zentrale Protease des Ubiquitin-Proteasomsystems ist das 26S Proteasom. Es macht je nach Gewebeart bis zu einem Prozent des zellulären Proteins aus [Tanaka et al. 1986]. Das 26S Proteasom setzt sich aus zwei Subkomplexen zusammen - dem zylinderförmigen 20S Proteasom und ein oder zwei asymmetrischen 19S regulatorischen Partikeln, die an die zylindrischen Enden des 20S Proteasoms binden (siehe Abb. 1.0.1).

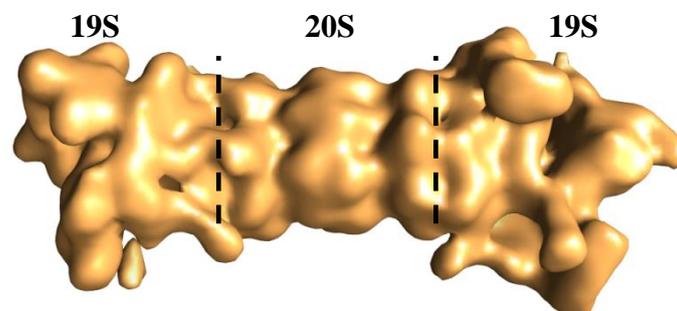


Abb. 1.0.1: Cryoelektronenmikroskopische Struktur des *Drosophila melanogaster* 26S Proteasoms nach Nickell et al. (2009). Mit freundlicher Genehmigung von S. Nickell.

Die 19S regulatorischen Partikeln besitzen neben Bindestellen für ubiquitinierte Substrate auch sechs ATPasen. Die ATPasen sind wahrscheinlich für die Entfaltung von Substraten zuständig und erleichtern so deren Translokationsprozess in das zentrale 20S Proteasom [Shabek und Ciechanover 2009; Finley 2009; Coux et al. 1996], wo sich die katalytisch aktiven Zentren des 26S Proteasoms befinden.

1.1 Das 20S Proteasom

Das 20S Proteasom wurde – im Gegensatz zum 26S Proteasom - sowohl in Eukaryonten als auch in Archae- und Eubakterien identifiziert [Dahlmann et al. 1989; Tamura et al. 1995]. Damit ist es in allen Königreichen des Lebens vertreten. Die Bedeutung des 20S Proteasoms zeigt sich auch auf der strukturellen Ebene: Die Quartärstruktur ist in allen Organismen hochkonserviert. Es besteht aus 28 Untereinheiten, 14 vom α - und 14 vom β -Typ.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Untersuchungen mit dem 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* (*Ta*) durchgeführt, da es im Gegensatz zu anderen 20S Proteasomen aus identischen α - und β -Untereinheiten besteht und auch ohne ein zusätzliches regulatorisches Partikel aktiv ist.

1.1.1 Struktur des 20S Proteasoms

Die Struktur des 20S Proteasoms aus dem Organismus *Thermoplasma acidophilum* wurde als erste Proteasomstruktur röntgenkristallographisch gelöst. Dieses 20S Proteasom hat ein Molekulargewicht von ungefähr 700 kDa und besteht aus vier heptameren Ringen ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$) [Löwe et al. 1995; PDB-Eintrag: 1PMA], die einen zylinderförmigen Komplex bilden. Die zylindrische Struktur wird von einem Kanal durchzogen, der insgesamt drei Ausbuchtungen aufweist. Zwei der Ausbuchtungen liegen zwischen je einem Ring aus α - und einem Ring aus β -Untereinheiten [*antechambers* (Vorkammern)]. Die dritte Ausbuchtung befindet sich im Zentrum des Proteasoms zwischen den zwei aus β -Untereinheiten bestehenden Ringen [*central chamber* (Hauptkammer)]. In dieser zentralen Kammer befinden sich die aktiven Zentren, die von den N-terminalen Threoninen der β -Untereinheiten gebildet werden [Seemüller et al. 1995]. Der Aufbau des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* ist in Abb. 1.1.1.1 gezeigt.

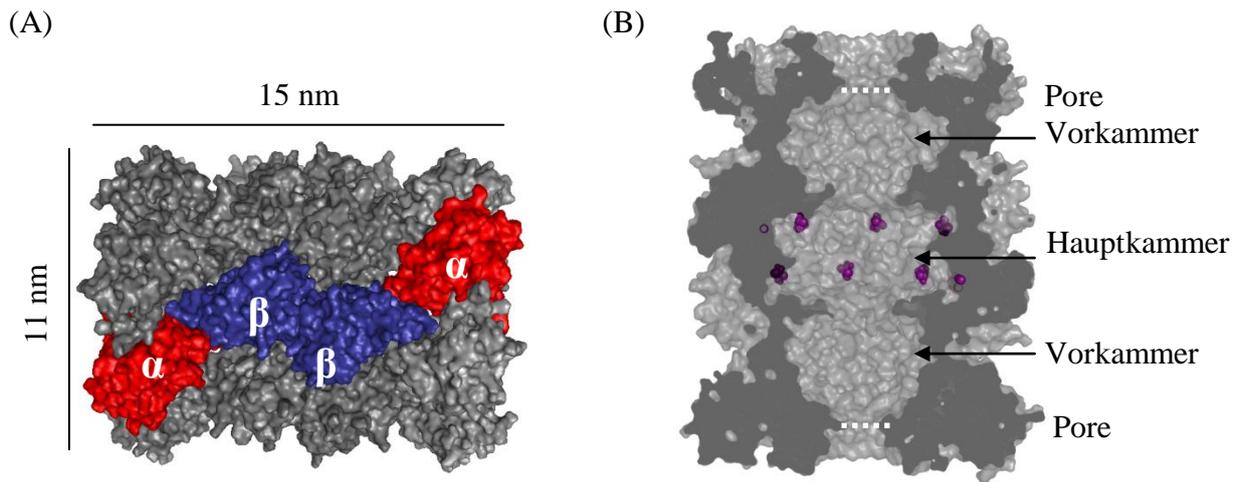


Abb. 1.1.1.1: Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Ta* [Löwe et al. 1995]. (A) Oberflächenmodell des *Ta* 20S Proteasoms, die α -Untereinheiten sind in rot, die β -Untereinheiten in blau dargestellt. (B) Querschnitt entlang der siebenzähligen Achse. Der zentrale Kanal öffnet sich an den Kontakten der Ringe zu zwei Vorkammern und einer zentralen Kammer, in der sich die aktiven Zentren, dargestellt in violett, befinden. Die Poren mit einem Durchmesser von 1,3 nm sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Die katalytisch inaktiven α -Untereinheiten und die katalytisch aktiven β -Untereinheiten sind sich strukturell sehr ähnlich (siehe Abb.1.1.1.2) [Löwe et al. 1995]. Beide Untereinheiten sind aus einer vierlagigen α + β -Struktur mit zwei antiparallelen fünfsträngigen β -Faltblättern aufgebaut, die auf einer Seite von zwei, auf der anderen Seite von drei α -Helices flankiert werden. In der β -Untereinheit ist der Stapel aus β -Faltblättern an einem Ende von vier *hairpin loops* bedeckt, während auf der anderen Seite eine Tasche liegt, in der sich das aktive Zentrum befindet.

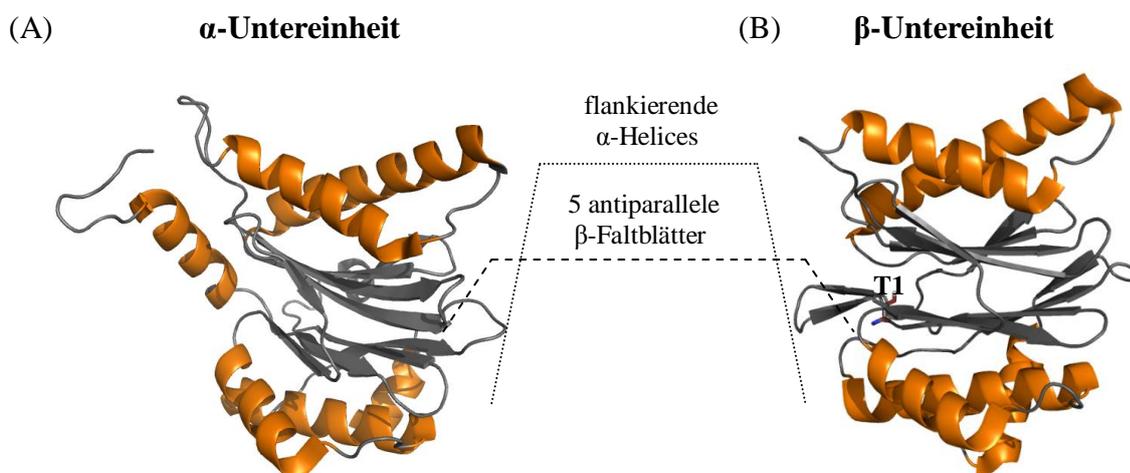


Abb. 1.1.1.2: Röntgenkristallstruktur der beiden Untereinheiten des 20S Proteasoms aus *Ta* [modifiziert nach Löwe et al. 1995]. (A) α -Untereinheit (B) β -Untereinheit mit dem katalytisch aktiven Threonin 1 als Stabmodell.

1.1.2 Katalytischer Mechanismus des 20S Proteasoms

20S Proteasomen gehören zu der Familie der Ntn (N-terminal nucleophile)-Hydrolasen. Weitere, zum heutigen Zeitpunkt bekannte Mitglieder dieser Familie, die in ihren Primärstrukturen allerdings keine Ähnlichkeiten aufweisen, sind Aspartylglucosaminidase (AGA), Glutamine Phosphoribosylpyrophosphate Amidotransferase (GAT), Penicillin Acylase (PA) und 1-Aminopeptidase D-Ala-Esterase/Amidase (DmpA). Diese Enzyme haben alle den gleichen Mechanismus eines nukleophilen Angriffs und einer autokatalytischen Prozessierung gemeinsam [Zwickl et al. 2001]. Ntn-Hydrolasen besitzen lediglich einen enzymatisch aktiven Aminosäurerest in ihrem aktiven Zentrum. Alle Ntn-Hydrolasen werden zunächst als inaktiver Vorläufer gebildet und erst durch die Abspaltung eines Propeptids und Freisetzung der Aminogruppe des katalytischen Nucleophils aktiviert [Brannigan et al. 1995]. Das Propeptid wird autokatalytisch prozessiert (siehe Abb.1.1.2.1) [Seemüller et al. 1996]. Im ersten Schritt der Autokatalyse erfolgt ein nukleophiler Angriff des Sauerstoffatoms der Hydroxylgruppe des Threonin 1 auf das Carbonylkohlenstoffatom der Peptidbindung zwischen Threonin 1 und Glycin -1. Es wird angenommen, dass ein Wassermolekül durch Bindung des Wasserstoffs der Hydroxylgruppe des Threonin 1 die Nucleophilie des Sauerstoffs der Hydroxylgruppe des Threonin 1 erhöht [Ditzel et al. 1998]. Im zweiten Schritt der autokatalytischen Reaktion reagiert das entstandene tetraedrische Intermediat unter Spaltung der C-N-Bindung zu einem Ester ab, der bei Hydrolyse die aktive β -Untereinheit und das Propeptid freisetzt.

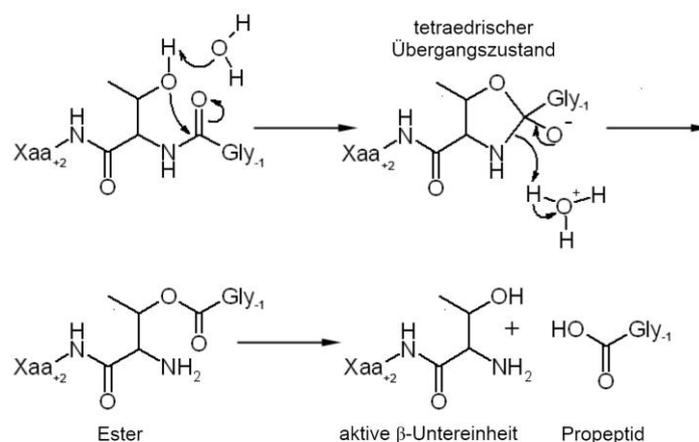


Abb. 1.1.2.1: Vorgeschlagener Mechanismus der autokatalytischen Prozessierung des Propeptids zur Generierung der katalytisch aktiven β -Untereinheit des 20S Proteasoms.

1. Einleitung

Die Bildung des Hydroniumions ist experimentell nicht nachgewiesen, ist aber aufgrund der röntgenkristallographischen Daten wahrscheinlich [Ditzel et al. 1998].

Das bei Abspaltung des Propeptids generierte N-terminale Threonin fungiert im 20S Proteasom als aktives Zentrum und ist in der Lage, Substrate hydrolytisch zu spalten (siehe Abb.1.1.2.2.). Im ersten Schritt eines solchen Reaktionszyklus zur proteolytischen Spaltung findet ein Protonentransfer von der Hydroxylgruppe des Threonin 1 der β -Untereinheit auf dessen Aminogruppe statt, aus sterischen Gründen wird eine Vermittlung durch ein Wassermolekül angenommen [Ditzel et al. 1998]. Dadurch kann der Sauerstoff des Threonins einen nukleophilen Angriff auf einen Carbonylkohlenstoff eines Substrats ausüben und ein tetraedrischer Übergangszustand wird gebildet. Die Reaktion verläuft vermutlich konzertiert ab. Durch Spaltung der C-N Bindung und unter Freisetzung der Aminkomponente des Produkts entsteht so im dritten Schritt ein Acyl-Enzym-Komplex, aus dem im vierten Schritt durch Hydrolyse schließlich die Carboxylkomponente des Produkts und die aktive β -Untereinheit gebildet werden. Die aktive β -Untereinheit steht nun wieder für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung.

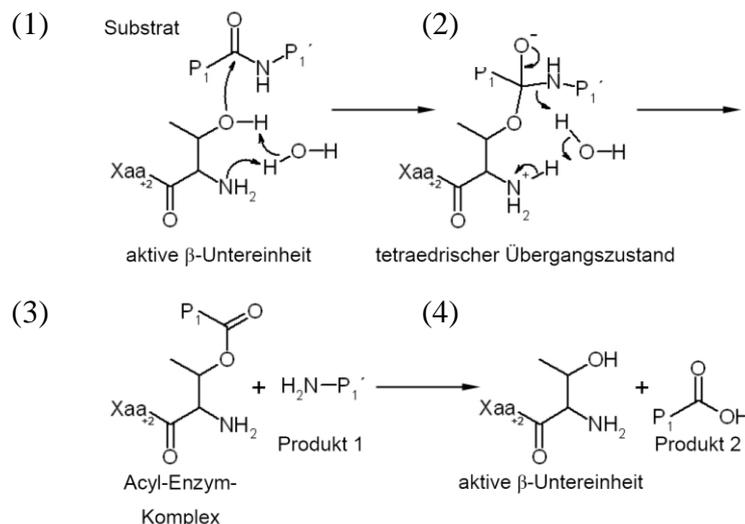


Abb. 1.1.2.2: Vorgeschlagenes Schema zum katalytischen Mechanismus des 20S Proteasoms. Durch die Übertragung eines Protons von der Hydroxylgruppe des Threonin 1 der β -Untereinheit auf die eigene terminale Aminogruppe wird der nukleophile Angriff auf ein Carbonylkohlenstoffatom des Substrats initiiert (1). Es bildet sich ein tetraedrischer Übergangszustand (2), der durch eine N-O Acyumlagerung und Bildung eines Esters aufgelöst wird. Das N-terminale Spaltungsprodukt wird freigesetzt (3). Abschließend wird durch Hydrolyse auch das C-terminale Spaltungsprodukt freigesetzt und das Enzym kann einen weiteren Reaktionszyklus durchlaufen(4) . Modifiziert nach [Ditzel et al. 1998]

Durch die autokatalytische Prozessierung des Propeptids (siehe Abb. 1.1.2.2) bei Assemblierung und damit die Unterteilung des Proteasoms in Kompartimente (siehe Abb. 19

1.1.1.1 (B)) wird verhindert, dass Substratproteine in den Zellen wahllos abgebaut werden. Die katalytisch aktiven Zentren sind von dem restlichen Zellinneren abgeschirmt und nur entfaltete Proteine [Ausnahme – Liu et al. 2003], die für die Degradation bestimmt sind, werden prozessiv gespalten [Kisselev et al. 1998; Dolenc et al. 1998]. Die Entfaltung von Substraten des 20S Proteasoms ist über das regulatorische Partikel PAN vermittelt.

1.2 Das regulatorische Partikel PAN

In dem Genom des Archaeobakteriums *Methanococcus janaschii* wurde 1996 ein Gen (S4 – Gen) identifiziert, das Homologien zu den eukaryontischen sechs 19S ATPasen aufwies. Um zu untersuchen, ob das S4-Genprodukt mit dem 20S Proteasom interagiert, wurde es exprimiert, gereinigt und charakterisiert [Zwickl et al. 1999].

1.2.1 Funktion des regulatorischen Partikels PAN

In der Sequenz des S4-Genprodukts wurden die typischen Merkmale der AAA ATPasen identifiziert: eine AAA Domäne, ein P-loop Motiv (das ein Walker A und Walker B Motiv enthält) und eine zweite Region am C-terminus, die eine Homologie zu dem SRH Motiv aufweist. Aufgrund seiner ATP-abhängigen Entfaltung von Substratproteinen des 20S Proteasoms und seiner Fähigkeit, das 20S Proteasom zu aktivieren, wurde das S4 Genprodukt PAN (Proteasom-activating nucleotidase) genannt [Zwickl et al. 1999]. Später wurde gezeigt, dass eine Bindung von ATP an PAN zu einer Assoziation mit dem 20S Proteasom, Stimulierung der Öffnung der Pore (N-termini der α -Untereinheiten), Rotation der α -Untereinheiten und Translokation von entfaltenen Substraten in das 20S Proteasom führt [Smith et al. 2005; Rabl et al. 2008].

1.2.2 Struktur des regulatorischen Partikels PAN

Die Struktur von PAN aus dem Organismus *Methanococcus janaschii* wurde – unterteilt in zwei Subkomplexe - erst vor kurzem röntgenkristallographisch gelöst [Zhang et al. 2009_a, Djuranovic et al. 2009]. Ein auf den Strukturen der Subkomplexe basierendes Modell von PAN ist in Abb. 1.2.2.1 gezeigt.

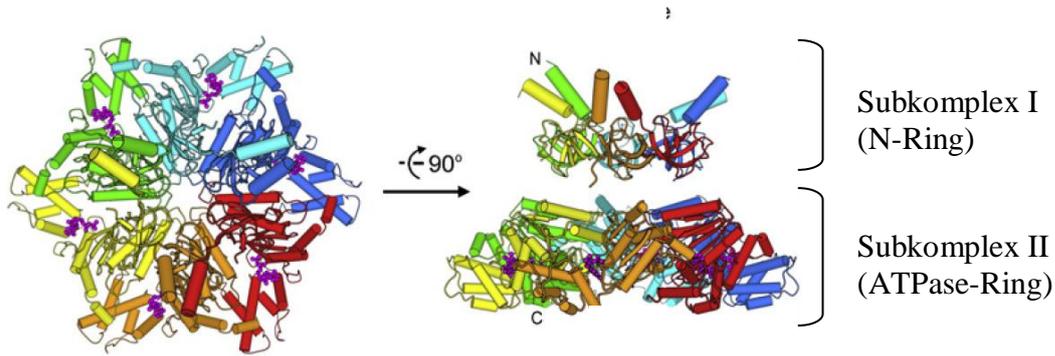


Abb. 1.2.2.1: Auf der Röntgenkristallstruktur der Subkomplexe I und II basierendes Modell des regulatorischen Partikel PAN. (A) Aufsicht auf Subkomplexe I und II (B) um 90° zu (A) gedrehte Seitenansicht (Zhang et al. 2009_a)

Die Anordnung der beiden Subkomplexe in Abb. 1.2.2.1 ist auf Basis von elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Smith et al. 2005) von PAN / 20S Proteasomkomplexen sehr wahrscheinlich.

In dem Modell wird der Subkomplex II (ATPase Ring) von sechs Nukleotidase Domänen gebildet und der Subkomplex I (N-Ring) aus sechs „coiled coil – oligonucleotide / oligosaccharide – binding fold“ (CC-OB) Domänen. Die C-terminalen Aminosäuren von Subkomplex I sind mit den N-Termini des Subkomplex II verbunden. Die sechs CC-OB Domänen bilden eine ringartige Struktur mit einem inneren Oberflächendurchmesser von 13 Å aus. Diese Ringstruktur wird von den loops L23 und L45 gebildet (siehe Abb. 1.2.2.2) und ist zu eng, um für ein gefaltetes Protein durchlässig zu sein.

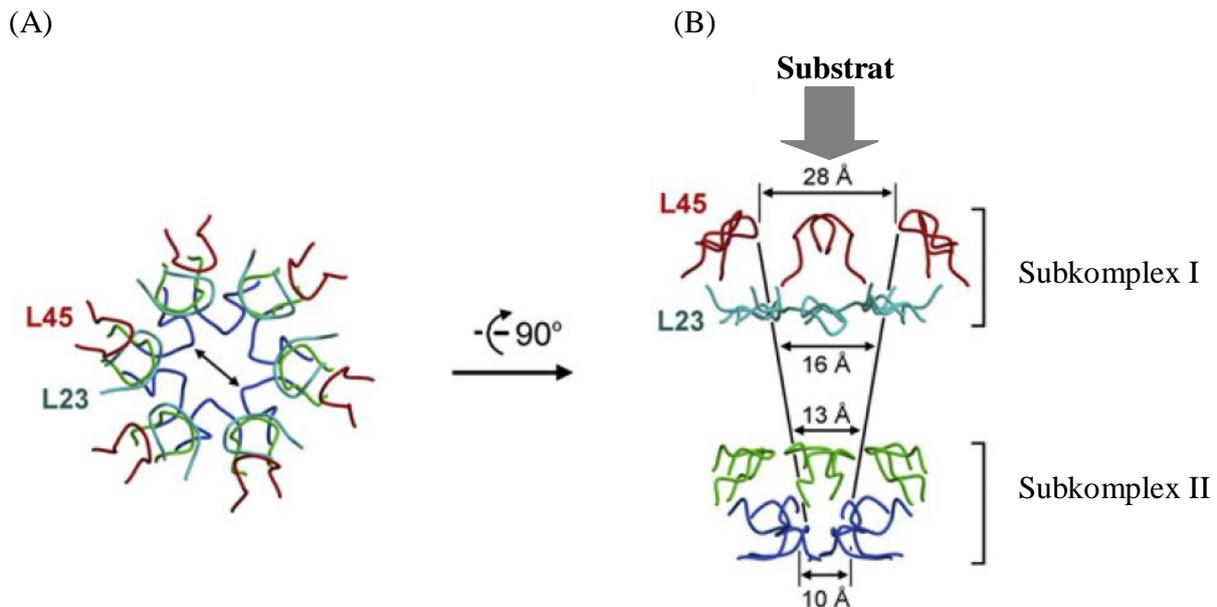


Abb. 1.2.2.2: Verengungen innerhalb des Kanals von Subkomplex I und II, dargestellt in Form von vier Lagen von Oberflächenloops. Substratproteine müssen diese wahrscheinlich passieren, um in das 20S Proteasom zu gelangen. (A) Aufsicht auf die vier Lagen von Oberflächenloops (B) Seitenansicht der vier Lagen von Oberflächenloops mit Angabe des Durchmessers. Die ersten zwei Lagen werden vom Subkomplex I gebildet (loops L23 und L45), die folgenden zwei Lagen werden von der Nukleotidase Domäne des Subkomplex II gebildet und stammen vom „ArΦ-loop“ und den „pore 2 loops“ (Zhang et al. 2009_a)

1.3 Translokation von Substraten

Auf der Basis der Röntgenstrukturen der Subkomplexe I und II und von Mutagenesestudien (Zhang et al. 2009_b) schlagen die Autoren ein neues Modell für die Funktionsweise des PAN / 20S Komplexes vor. Dieser Hypothese nach bindet gefaltetes Substratprotein zunächst an die distale Seite des Subkomplex I, dort wird dann ein Degradationssignal von den Oberflächen des Subkomplex II erkannt (z.B. PUP – prokaryotic ubiquitin-like protein [review Burns et al. 2010] Abb. 1.3 (A) und (B)). Die Hydrolyse von ATP führt anschließend dazu, dass auf das gefaltete Substrat eine ins Innere von PAN gerichtete Kraft wirkt (Ziehen in das Innere von PAN, Abb. 1.3 (C)). Aufgrund der ringartigen Struktur mit einem inneren Oberflächendurchmesser von 13 Å kann kein gefaltetes Substrat passieren und das Ziehen führt zu einer Substratentfaltung (siehe Abb. 1.3 (D)).

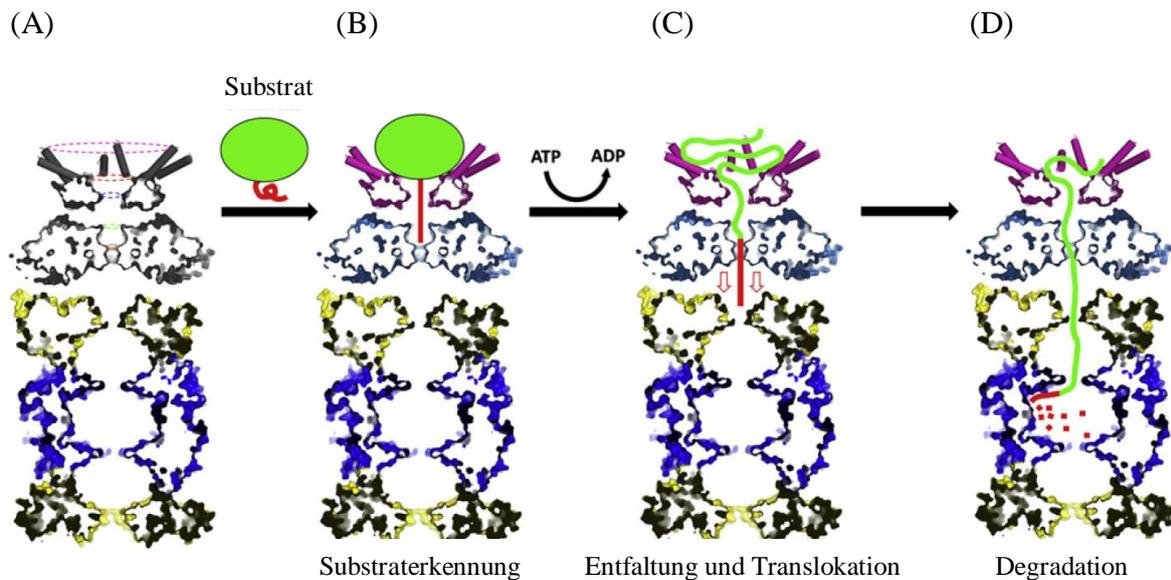


Abb. 1.3: Modell zur Funktionsweise des PAN / 20S Komplexes (Querschnitt) [modifiziert nach Zhang et al. 2009_b].

Das entfaltete Substrat passiert dann über die Poren des 20S Proteasoms die Vorkammer und wird in der Hauptkammer von den aktiven Zentren degradiert. Für eine Vielzahl von 20S Proteasomen konnte nachgewiesen werden, dass sie ohne Interaktion mit einem regulatorischen Partikel oder Aktivator eine verschlossene Pore haben [Groll et al. 1997; Förster et al. 2005]. Im *Ta* 20S Proteasom sind die N-termini der α -Untereinheiten, die die Pore des Proteasoms bilden, hochdynamisch und deshalb in der Röntgenkristallstruktur nicht aufgelöst. In NMR-Studien konnte gezeigt werden, dass sie verschiedene Konformationen einnehmen können, indem sie entweder in die Vorkammern hineinreichen (geschlossene Pore) oder sich nach außen orientieren (offene Pore) [Religa et al. 2010]. In dem in Abb. 1.8 (D) gezeigten Querschnitt ist die Pore des 20S Proteasoms in einem geöffneten Zustand dargestellt. Die Interaktion mit PAN (und dessen HbYX Motiv) induziert eine Öffnung der Poren über eine Insertion der C-terminalen Enden von PAN in Taschen der α -Untereinheiten des Proteasoms [Smith et al. 2007].

1.4 Aufgabenstellung

Über eine aktive Rolle des 20S Proteasoms beim Translokationsvorgang ist nur wenig bekannt. In verschiedenen mathematischen Modellen wird das 20S Proteasom als hohler Zylinder betrachtet, in dem sowohl der Eintritt von Substraten als auch deren Translokation

allein über die Pore reguliert wird [Luciani et al. 2005; Mishto et al. 2008]. Die vorgeschlagenen Modelle messen der Unterteilung des 20S Proteasoms in Kompartimente (Vorkammern und Hauptkammer) sowie einem vielleicht über die Untereinheiten vermittelten Translokationsmechanismus keine Bedeutung bei.

Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung der strukturellen Eigenschaften des 20S Proteasoms für den Translokationsvorgang zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf einen möglichen Translokationsmechanismus ziehen zu können.

Es ist bekannt, dass eine radiale Verschiebung der Untereinheiten des 20S Proteasoms bei Interaktion mit dem regulatorischen Partikel wahrscheinlich die Poren des 20S Proteasoms öffnet, und so eine Translokation zu den katalytisch aktiven Zentren ermöglicht [Fonseca et al. 2008, Rabl et al. 2008]. Eine Verschiebung der Untereinheiten zueinander wurde auch bei einem Vergleich der „leeren“ Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms mit der Röntgenkristallstruktur von Host-Guest Komplexen festgestellt [HGC-Struktur-Datensatz: Felderer et al. 2008; Vergleich: Witt, persönliche Korrespondenz]. Dabei handelt es sich um Komplexe aus 20S Proteasomen (Host), in deren Inneren sich potentielle Substrate (Guest) wie Cytochrom C befinden. Die Massenzentren von den Sekundärstrukturelementen der Untereinheiten beider Strukturen zeigen eine Verschiebung [Best, persönliche Korrespondenz], was in einer veränderten Ausrichtung der Untereinheiten zueinander resultiert. Des Weiteren konnte über rasterkraftmikroskopische Messungen eine Kraft bei Interaktion von Substrat mit dem Proteasominneren nachgewiesen werden, die auf einen gerichteten Transport von Substratmolekülen im 20S Proteasom hindeutet [Classen, persönliche Korrespondenz]. Wenn ein gerichteter Transport existiert, würde dies bedeuten, dass die Substrattranslokation nicht alleine auf freien Diffusionsvorgängen im Inneren des 20S Proteasoms beruht und der Substrattranslokation ein Mechanismus zugrunde liegen muss.

Basierend auf den beschriebenen Untersuchungen wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

- A) Lässt sich die Substratverteilung im 20S Proteasom visualisieren und lassen sich somit Rückschlüsse auf den Weg des Substrats und einen durch Substrat-Proteasom Interaktion vermittelten Translokationsmechanismus ziehen?
- B) Spielen die Kontaktflächen der Untereinheiten und damit die Flexibilität der Untereinheiten eine Rolle für den Translokationsmechanismus?

C) Welchen Einfluß hat eine Versteifung der Struktur durch kovalente Bindung der Untereinheiten aneinander auf den Translokationsmechanismus?

Fragestellung A - Um die Substratverteilung im 20S Proteasom zu visualisieren, wurden zwei unterschiedliche Lösungsansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurden Fluoreszenzuntersuchungen an Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene in einer Kooperation mit der Gruppe von R. Guckenberger durchgeführt (siehe 3.4.1), im zweiten Ansatz wurden 20S Proteasom – α -Synuclein-Hybridproteine (siehe 3.4.2) exprimiert und gereinigt. Diese sollten im Weiteren über NMR-Studien in Kooperation mit der Gruppe von L. Kay untersucht werden.

Fragestellung B - Die Bedeutung der Kontaktflächen von Untereinheiten für den Translokationsmechanismus wurde über eine Mutationsanalyse untersucht (siehe 3.5). Im Rahmen dieser Analyse wurden zunächst sämtliche auf Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten liegende Aminosäuren in der Host-Guest-Komplex Röntgenkristallstruktur und deren Interaktionen in einer Kooperation mit C. Best computergestützt mit Hilfe des Programms Chimera identifiziert. Im Anschluß wurde eine Mutation bei jeweils einem der auf der Kontaktfläche liegenden Interaktionspartner eingeführt und das Translokationsverhalten der exprimierten und gereinigten Mutanten mit Hilfe fluoreszenzbasierter Aktivitätsstudien untersucht (siehe 3.5.2).

Fragestellung C - Der Einfluß einer Versteifung der Struktur durch kovalente Bindung der Untereinheiten aneinander auf das Translokationsverhalten wurde ebenfalls über eine Mutationsanalyse (siehe 3.5) untersucht. Dazu wurden zunächst in einer Kooperation mit C. Best alle $C\alpha$ - $C\alpha$ Abstände sämtlicher Aminosäuren des 20S Proteasoms computergestützt ermittelt und die Aminosäuren zweier verschiedener Untereinheiten mit den geringsten Abständen zueinander für eine Cysteinmutation ausgewählt. Nach Expression und Reinigung wurden die Mutanten sowohl durch massenspektrometrische Untersuchungen als auch durch fluoreszenzbasierte Aktivitätsstudien näher charakterisiert (3.5).

2. Material und Methoden

2.1. *Material*

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterial sind im Anhang unter 6.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial aufgeführt.

2.1.2. Geräte

Alle verwendeten Geräte sind im Anhang unter 6.2 Geräte aufgeführt.

2.1.3. Kits und Standards

Kit	Firma
Additive Screen	Hampton Research
Biorad protein assay	Farbstoffkonzentrat, Biorad
Crystalscreen I	Hampton Research
Crystalscreen II	Hampton Research
EnzChek Protease Assay Kit (green fluorescence)	Invitrogen
PCR Core Kit	Roche
PEG-Ion Screen	Hampton Research
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAfilter™ Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIASpin-Gelextraction Kit	Qiagen
QuikChange®Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies
Rapid DNA Dephos&Ligation Kit	Roche
TAKARA-DNA-Ligation-Kit	TAKARA

2. Material und Methoden

Standard	Firma
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder; 0,1 µg / µl (10 kb/30ng; 8 kb/30ng; 6 kb/70ng; 5 kb/30ng; 4 kb/30ng; 3,5 kb/30ng; 3 kb/70ng; 2,5 kb/25ng; 2 kb/25ng; 1,5 kb/25ng; 1 kb/60ng; 750 bp/25ng; 500 bp/25ng; 250 bp/25ng bei 0,5 µg Marker pro Spur)	Fermentas
Gene Ruler 100bp DNA Ladder; 0,1 µg/µl (1 kb/45ng; 900 bp/45ng; 800 bp/45ng; 700 bp/45ng; 600 bp/45ng; 500 bp/115ng; 400 bp/40ng; 300 bp/40ng; 200 bp/40ng; 100 bp/40ng bei 0,5 µg Marker pro Spur)	Fermentas
High Molecular Weight (HMW) Calibration Kit for Native Electro- phoresis (Thyroglobulin 669 kDa / 7,6 µg; Ferritin 440 kDa / 5,0 µg; Katalase 232 kDa/ 3,6 µg; Laktatdehydrogenase 140 kDa/ 4,8 µg; BSA 67 kDa/ 4,0 µg bei 10 µl Marker pro Spur)	GE Healthcare
High Molecular Weight Marker (Thyroglobulin 669 kDa; Ferritin 440 kDa; Catalase 232 kDa; Aldolase 158 kDa; Blue Dextran 2 kDa)	GE Healthcare
SDS-PAGE Standard Broad Range (Myosin 200 kDa, β-Galactosidase 116 kDa; Phosphorylase b 97,4 kDa; BSA 66 kDa; Ovalbumin 45 kDa; Carbonhydrase 31 kDa; Sojabohnen Trypsininhibitor 21,5 kDa; Lysozym 14,5 kDa; Aprotinin 6,5 kDa; je 1 µg bei 10 µl Marker pro Spur)	Biorad
BenchMark™ Protein Ladder (220 kDa; 160 kDa; 120 kDa; 100 kDa; 90 kDa; 80 kDa; 70 kDa; 60 kDa; 50 kDa; 40 kDa; 30 kDa; 25 kDa; 20 kDa; 15 kDa; 10 kDa)	Invitrogen
BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (181,8 kDa; 115,5 kDa; 82,2 kDa,	Invitrogen

Standard	Firma
----------	-------

64,2 kDa (pink); 48,8 kDa; 37,1 kDa;
25,9 kDa; 19,4 kDa; 14,8 kDa; 6,0 kDa)

2.1.4. Enzyme und Antikörper

Enzym	Firma
DNaseI aus Rinderpankreas, grade II	Roche
DpnI (10 U/μl) (Bestandteil des <i>QuikChange® Lightning Mutagenesis Kits</i>)	Agilent Technologies
GFP (B-2) mouse monoclonal Ig _{2a} 200 μg / ml	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-mouse IgG-HRP HRP conjugated 200 μg / 0,5 ml	Santa Cruz Biotechnology
Goat anti-rabbit IgG-AP Alkaline Phosphatase conjugated 200 μg / 0,5 ml	Santa Cruz Biotechnology
HindIII (10 U/μl)	NEB
His-probe(6-18) rabbit polyclonal IgG 200μg/ml	Santa Cruz Biotechnology
KasI (15 U/μl)	NEB
NdeI (20 U/μl)	NEB
Lysozym aus Hühnereiweiß (58100 U/mg)	Sigma
PfuTurbo® DNA Polymerase (2,5 U/μl) (Bestandteil des <i>QuikChange® Lightning Mutagenesis Kits</i>)	Agilent Technologies
Trypsin, TPCK behandelt aus Rinderpankreas	Sigma

2.1.5. Bakterienstämme und Medien

<i>E.coli</i> Stamm	Genotyp	Quelle
BL21 (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Invitrogen
Origami TM 2 (DE3)	Δ(ara-leu)7679 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F' ⁺ [lac ⁺ lacI ^q pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (Str ^R , Tet ^R)	Novagen
Top 10	F ⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7679 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen

LB-Medium (1 l)
(autoklavieren)

10 g Tryptone
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt
1 ml 1M NaOH
ad. ddH₂O

LB-Agar:

LB-Medium

Sterilisation im Autoklav (20 Minuten, 121°C)

15 g/l Bacto Agar

Nach Abkühlung des autoklavierten bzw. in der Mikrowelle geschmolzenen Agars auf ca. 50° C wird der bzw. werden die Selektivmarker zugesetzt und der Agar in Petrischalen gegossen.

2.1.6. Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit H₂O_{Milli-Q} angesetzt, autoklaviert oder durch 0,22 µm Millex®-GS Spritzenaufsatzhalter bzw. Nalgene Flaschenaufsatzfilter mit Filtermembranen der Firma Pall (0,45 µm bzw. 0,2 µm) steril filtriert. Die zur chromatographischen Reinigung eingesetzten Puffer wurden zusätzlich entgast.

2.1.6.1. Lösungen für molekularbiologische Arbeitsmethoden*Agarose-Gelelektrophorese (Puffersystem: TAE-Puffer)*50 x TAE-Puffer *pH* 8,0

2 M Tris/HCl

1 M Natriumacetat

1 mM EDTA

6 x Probenpuffer

0,2 % (w/v) Bromphenolblau

30 % (v/v) Glycerin

2.1.6.2. Lösungen für biochemische Arbeitsmethoden*Tab. 2.1.: Stocklösungen für die rekombinante Expression von Strukturgenen*

Chemikalie	Stocklösung (alle in H₂O_{Milli-Q})	Lagerung bei
Ampicillin	100 mg/ml Ampicillin	-20 °C
Tetracyclin	5 mg/ml Tetracyclin	-20 °C
Chloramphenikol	34 mg/ml Chloramphenikol	-20 °C
Kanamycin	5 mg/ml Kanamycin	-20 °C
IPTG	1M IPTG	-20 °C

*Lösungen für Affinitätschromatographie*NaP_i (0,5M)266 ml 0,5 M NaH₂PO₄774 ml Na₂HPO₄

Puffer A

20 mM NaP_i *pH* 7,4

(steril filtriert und entgast)

500 mM NaCl

20 mM Imidazol

ad. H₂O_{Milli-Q}

Kathodenpuffer (10 x) <i>pH</i> 8,25	1 M Tris-Base 1 M Tricine 1 % (w/v) SDS
Probenpuffer (2 x SDS-Ladepuffer) <i>pH</i> 6,8	0,1 M Tris/HCl <i>pH</i> 6,8 20 % (v/v) Glycerin 200 mM Dithiothreitol 4 % (w/v) SDS 0,2 % (w/v) Bromphenolblau Lagerung bei -20 °C

Lösungen für Tris-Glycin Native PAGE

Probenpuffer (nativ) 2 x	0,2 M Tris/HCl <i>pH</i> 6,8 10 % (v/v) Glyzerin 0,0025 % (w/v) Bromphenolblau Lagerung bei + 4 °C
10 x Tris-Glycin Nativ Laufpuffer <i>pH</i> 8,3	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin

Lösungen für Coomassie-Färbung

Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung	25 % (v/v) Ethanol abs. 8 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie R250 Brilliant Blue

Der Farbstoff wird unter Rühren bei 60 °C gelöst und filtriert.

2. Material und Methoden

Entfärbelösung	25 % (v/v) Ethanol 8 % (v/v) Essigsäure ad. H ₂ O _{Milli-Q}
----------------	---

2.1.6.3. *Lösungen für immunologische Arbeitsmethoden*

Transferpuffer	50 mM Tris-Base 40 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
TBS-T	150 mM NaCl 20 mM Tris/HCl pH 7,5 0,05% Tween20
Blockierlösung	150 mM NaCl 20 mM Tris/HCl pH 7,5 5% (w/v) Magermilchpulver
TBS	150 mM NaCl 20 mM Tris/HCl pH 7,52.1.7.

2.1.7. Plasmide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und in der Gruppe von Frau Dr. Witt generierten Plasmide sind in Tab. 6.3. im Anhang aufgeführt.

2.1.8. Primer

Alle Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH synthetisiert und mittels HPLC gereinigt und sind in Tabelle 6.4. im Anhang aufgeführt. Ein Teil der Oligonukleotide wurde von Frau Dr. Witt generiert, diese sind nicht mit aufgeführt.

2.2. Molekularbiologische Methoden

Die Zusammensetzung aller verwendeten Medien, Puffer und Lösungen ist in dem Kapitel 2.1.6. beschrieben.

2.2.1. Herstellung hitzekompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung hitzekompetenter Zellen wurden 8,5 ml LB-Medium mit 1,5 ml einer frischen Übernachtskultur des jeweiligen Stammes angeimpft, so dass eine OD_{600nm} von 0,1 vorlag. OD_{600nm} steht als Abkürzung für die optische Dichte, die in 1,5 ml PMMA Küvetten bei 600 nm über eine Absorptionsmessung bestimmt wurde. Die Kultur wurde unter Schütteln in Kolben ohne Schikanen bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 inkubiert und anschließend jeweils eine Hälfte in einen 2 l Kolben ohne Schikane, gefüllt mit 0,5 l LB-Medium, überimpft. Sobald unter Schütteln bei 37 °C eine OD_{600nm} von 0,3 erreicht war, wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in vorgekühlten Zentrifugationsbechern 10 Minuten bei 4120 xg und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 ml 50 mM $CaCl_2$ (steril filtriert und autoklaviert) resuspendiert, 20 Minuten auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml 50 mM $CaCl_2$ mit 15 % (v/v) Glycerin (steril filtriert und autoklaviert) resuspendiert und drei Stunden auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in vorgekühlten Eppendorf Reaktionsgefäßen zu 50 μ l Anteilen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80 °C sind die Zellen für mehrere Monate kompetent lagerbar. Um eine Kontamination der kompetenten Zellen mit Vektor-DNA auszuschließen und die Kompetenz zu überprüfen, wurden eine Hitzeschocktransformation (siehe Kapitel 2.2.2.) mit und ohne Zugabe von Plasmid-DNA durchgeführt und 200 μ l der Zellsuspension auf LB-Agar Platten mit unterschiedlichen Selektionsmarkern (siehe Tab. 2.1.) und ohne Selektionmarker ausgestrichen. Sind die Zellen nicht mit Plasmiden kontaminiert, wachsen die Ansätze ohne Plasmidzugabe nur auf den LB-Agar Platten ohne Selektionsmarker. Sind die Zellen ferner kompetent, wachsen die Ansätze mit Plasmidzugabe auf den entsprechenden Platten mit Selektionsmarker.

2.2.2. Hitzeschocktransformation

Das Einbringen von DNA in $CaCl_2$ -kompetente Zellen, deren Herstellung unter 2.2.1. beschrieben ist, erfolgte durch Hitzeschocktransformation.

Hierzu wurden zunächst 50 µl hitzekompetenter Zellen 30 Minuten lang auf Eis aufgetaut und anschließend 1 - 2 µl der jeweiligen DNA (aus einer Plasmid Mini Prep) zugegeben. Zur Expression von Strukturgenen wurde in den Bakterienstamm *E. coli* BL21DE(3) oder *E. coli* Origami 2 (DE3) transformiert, zur Amplifikation von Strukturgenen wurde in den Bakterienstamm *E. coli* Top 10 transformiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß 30 Sekunden lang in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C gegeben.

Zur Regeneration wurden 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Lösung eine Stunde lang bei 37 °C leicht geschüttelt, um sie dann auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker auszustreichen. Die Platten wurden über Nacht in einen Brutschrank bei 37 °C inkubiert und am Folgetag wurden gewachsene Bakterienkolonien gepickt.

2.2.3. Zielgerichtete Mutagenese

Um Mutanten des 20S Proteasoms zu generieren, wurde eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. Dabei wurde das *QuikChange®Lightning Mutagenesis Kit* der Firma Agilent Technologies verwendet, das alle benötigten Enzyme und Puffer enthält. Die benötigten Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Zunächst wurden – gemäß den Angaben des Herstellers – zwei Primer konstruiert, die die gewünschte Mutation enthalten und zur selben Sequenz auf den gegenüberliegenden Strängen des Plasmids komplementär sind. Im ersten Schritt der Mutagenese wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die doppelsträngige Plasmid-DNA (dsDNA) wird im Thermocycler bei 95 °C in einzelsträngige DNA (ssDNA) aufgetrennt. Beim Abkühlen auf 55 °C hybridisieren die Primer mit den einzelnen Plasmid-DNA-Strängen und durch die hitzebeständige PfuTurbo DNA-Polymerase wird bei 68 °C wieder ein doppelsträngiges Plasmid synthetisiert, wobei das Oligonukleotid mit der Mutation im neu synthetisierten Strang erhalten bleibt. Im nächsten Zyklus dient auch der neu synthetisierte Strang als Matrize zur Synthese eines komplementären Gegenstücks, wodurch eine große Anzahl an DNA-Fragmenten, die die gewünschte Mutation aufweisen, hergestellt wird.

Tab. 2.3.: Reaktionsgemisch für die zielgerichtete Mutagenese zur Generierung von Mutanten des 20S Proteasoms. Das Gemisch wurde für jeden der beiden Primer separat angesetzt. Die mit * gekennzeichneten Reagenzien sind Bestandteile des QuikChange®Lightning Kit der Firma Agilent Technologies.

Reagenz	Volumen pro Ansatz
Plasmid-dsDNA	1 µl
Reaktionspuffer (10 x)*	5 µl
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
dNTP Mix*	1 µl
PfuTurbo DNA Polymerase (2,5 U/µl)*	1 µl
H ₂ O _{Milli-Q}	41 µl
Summe	50 µl

Die Effizienz der Methode kann durch die Aufteilung dieses Schritts in zwei Stufen deutlich erhöht werden [Wang et al. 1999]. Es wurden zunächst fünf PCR-Zyklen mit zwei getrennten Reaktionsansätzen durchlaufen, die jeweils nur einen der beiden Primer enthielten. Daraufhin wurden je 25 µl beider Ansätze vereinigt, erneut 1 µl PfuTurbo DNA-Polymerase zugegeben und weitere 18 PCR Zyklen durchgeführt. Das Programm des Thermocyclers ist in Tab. 2.4. wiedergegeben.

Tab. 2.4.: Programm des Thermocyclers für die zielgerichtete Mutagenese in zwei Stufen

Schritt	Temperatur	Anzahl der durchgeführten Zyklen
30 Sekunden	95 °C	
30 Sekunden	95 °C	Schritt 1: 5 Zyklen
1 Minute	55 °C	Schritt 2: 18 Zyklen
4,5 Minuten	68 °C	
ohne Zeitgrenze	4 °C	

Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch 1 µl der Restriktionsendonuklease DpnI zugegeben, die Lösung gut vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Enzym DpnI spaltet spezifisch methylierte DNA (Erkennungssequenz: 5'-Gm6ATC-3'). Plasmid-DNA, die aus *dam*- *E. coli* Stämmen isoliert wurde, ist methyliert und unterliegt somit dem Verdau durch DpnI. Plasmid-DNA, die in vitro synthetisiert wurde, ist nicht modifiziert und wird somit durch DpnI nicht abgebaut. Die Inkubation des Reaktionsgemisches mit DpnI führt zu einem Verdau der Matrize und erhöht die Ausbeute der Plasmide mit der gewünschten Mutation [Nelson et al. 1992]. Anschließend erfolgte, wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben, eine Hitzeschocktransformation in kompetente *E.coli* Top 10 Zellen. Zur weiteren Verwendung wurden circa drei bis fünf Kolonien des Ausstrichs

selektiert, deren Plasmid-DNA isoliert (siehe Kapitel 2.2.4.) und mittels Sequenzierung (siehe Kapitel 2.2.8.) auf die gewünschte Mutation überprüft.

2.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Sequenzierung der Plasmid-DNA und zur Transformation in *E. coli* BL21(DE3) wurde die Plasmid-DNA zunächst mit Hilfe des *QiaPrep Spin Miniprep Kit* nach Angaben des Herstellers isoliert. Zunächst wurde eine vereinzelte, frisch transformierte *E. coli*-Kolonie über Nacht in 3 - 5 ml LB-Selektivmedium bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden zehn Minuten bei 4 °C und 14000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Zellsediment gemäß *QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol* in RNase-haltigem Puffer resuspendiert und mit SDS-haltigem Puffer lysiert. Anschließend wurden Proteine, chromosomale DNA, SDS und größere Zellbestandteile ausgefällt und abzentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA im Überstand verblieb und bei hoher Salzkonzentration auf *QIAprep Spin Columns* aufgetragen wurde. Es wurde in 100 µl des mitgelieferten Elutionspuffers eluiert.

Alternativ wurde, um größere Mengen Plasmid DNA zu gewinnen, das *QIAfilterTM Plasmid Midi Kit* benutzt. Dieses Kit basiert auf den gleichen Methoden wie das *QIAprep Spin Miniprep Kit*, es wurde in allen Punkten, bis auf einen, nach Angaben des Herstellers verfahren. Anstatt die lysierten Zellen zu filtrieren, wurde 30 Minuten bei 28140 xg, zentrifugiert.

2.2.5. Restriktionsverdau

Um die Aufnahme eines Plasmids in die Bakterienzellen nach der Hitzeschocktransformation (siehe Kapitel 2.2.2.) zu verifizieren oder DNA-Fragmente mit spezifischen Schnittstellen für eine Klonierung zu gewinnen, wurde die isolierte Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.2.4.) mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen behandelt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen, sowie die entsprechenden Puffer, stammen von der Firma New England Biolabs (siehe Kapitel 2.4.1). Es wurde der in Tab. 2.5. gezeigte Ansatz gemacht.

Tab. 2.5.: Reaktionsgemisch für den Restriktionsverdau der verwendeten Plasmide zur Überprüfung der Transformation. Alle mit * gekennzeichneten Reagenzien wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

Lösung	Volumen
10 x-Puffer*	1 µl
Restriktionsendonuklease A*	0,5 µl
Restriktionsendonuklease B*	0,5 µl
BSA* nach Herstellerangaben	0,5 µl
Plasmid-DNA (circa 1 µg)	5 µl
add. H ₂ O _{Milli-Q}	10 µl

Der gewählte Puffer, Temperatur und Inkubationszeit sind von den Enzymen abhängig und richten sich nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die Mischung mit 2 µl 6x Ladepuffer auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Bei Klonierungen wurden größere Mengen eines spezifisch geschnittenen Inserts beziehungsweise eines spezifisch geschnittenen Zielvektors benötigt. Dazu wurde ein Verdau mit zwei Restriktionsendonukleasen und mit einer größeren Menge Plasmid-DNA angesetzt (siehe Tab. 2.6.).

Tab. 2.6.: Reaktionsgemisch für den Restriktionsverdau von Midi-Prep Plasmid-DNA für Klonierungen. Alle mit * gekennzeichneten Reagenzien wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

Lösung	Volumen
10x-Puffer*	5 µl
Restriktionsendonuklease A*	2 µl
Restriktionsendonuklease B*	2 µl
BSA* nach Herstellerangaben	0,5 µl
Midi-Prep Plasmid-DNA	25 µl
add. H ₂ O _{Milli-Q}	50 µl

Zu der Plasmid-DNA im Ansatz des geschnittenen Zielvektors wurde im Anschluß an den Verdau mit Restriktionsendonukleasen 1 µl SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) in den Ansatz geben und die Lösung für 30 Minuten bei 37° C inkubiert um dann auf ein Agarosegel aufgetragen zu werden (siehe 2.2.6.).

2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Um Proben auf DNA-Gehalt, Fragmentlänge und Menge zu untersuchen wurden Agarose-Gelelektrophoresen in horizontalen Flachbettgelen mit einer Agarosekonzentration von 1,5 % (w/v) in TAE-Puffer durchgeführt. Wird an das gegossene Gel ein elektrisches Feld

angelegt, wandert die auf das Gel aufgebraachte DNA von der Kathode zur Anode, da das Phosphatrückgrat der DNA bei neutralem pH negativ geladen ist.

Zur Abschätzung der Fragmentlänge und Menge wurde eine Markermischung (1 kB Marker, Fermentas) aufgebracht. Um die im Gel aufgetrennten DNA-Moleküle sichtbar zu machen, wurde der Agarose Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare und fluoresziert bei Bestrahlung durch Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm.

2.2.7. Gelelution und Ligation

Im Anschluß an die Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Banden der entsprechenden Größen mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und eine Gelelution mit dem *QiaPrepGelelutionKit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Gelelution wurde, um die Ausbeute an Insert- und Vektor-DNA abschätzen zu können, eine Agarose-Gelelektrophorese mit 5 µl der aus der Gelelution gewonnenen Lösung durchgeführt. Für einen Ligationsansatz wurden 20 fmol Vektor- und 60 fmol Insert-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des *TAKARA-Ligationskits* oder des *Rapid DNA Dephos&Ligation Kit*. In allen Fällen wurden ebenfalls Ligationsansätze mit reiner Insert- bzw. Vektor-DNA als Negativkontrolle angesetzt. Aus diesen lassen sich nach Transformation und Ausplattieren Rückschlüsse auf die Ligationseffizienz schließen.

2.2.8. DNA-Sequenzierung

Zur automatischen, nichtradioaktiven Sequenzierung wurde etwa 1 µg der isolierten Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.2.4.) durch Zentrifugation im Vakuum getrocknet und zusammen mit etwa 10 µl des Primers (10 pmol/µl) zur Analyse an die Firma MWG Biotech AG geschickt. Dort wurde die DNA mit Hilfe des *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Firma Applied Biosystems nichtradioaktiv sequenziert.

2.3. Biochemische Arbeitsmethoden

Die Zusammensetzung der im Text nicht näher spezifizierten Medien, Puffer und Lösungen ist in den Kapiteln 2.1.5. und 2.1.6.2. beschrieben.

2.3.1. Expression von Strukturgenen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmiden steht die Expression unter der Kontrolle eines starken Promotors und Terminators aus dem *E. coli* Bakteriophagen T7. Auf den T7-Promotor folgt ein *lac*-Operator. Außerdem befindet sich auf den Plasmiden das *lacI*-Gen, das den *lac*-Repressor kodiert. Die Induktion erfolgt durch Zugabe des Laktose-Analogons IPTG.

2.3.1.1. Rekombinante Expression in *E.coli* mit IPTG-Induktion

Um die proteasomalen Untereinheiten kodierenden Gene und ihre Mutanten in *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* Origami 2 (DE3) oder die Strukturgene für α -Synuclein in *E. coli* BL21(DE3) zu exprimieren, wurden zunächst Vorkulturen angesetzt, indem ungefähr 50 μ l des jeweiligen Glycerinstocks in ungefähr 300 ml LB-Amp Medium (0,1% (w/v) Ampicillin) gegeben wurden und die Vorkultur dann über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurde. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur von 1 l LB-Amp Medium (0,1 % (w/v) Ampicillin) in einem 2 l Kolben mit Schikanen mit 50 ml der Vorkultur angeimpft und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 bei 37 °C angezogen.

Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,6 befinden sich die Bakterienkulturen noch in der exponentiellen Wachstumsphase und man erreicht bei Induktion in dieser Phase die höchsten Proteinausbeuten.

Bei Erreichen der besagten OD₆₀₀ wurde die Hauptkultur mit IPTG induziert (Endkonzentration IPTG = 1 mM) und für weitere fünf Stunden bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Alternativ wurde der Hochdichtefermentationsservice der Core Facility im Hause genutzt. Die Induktion erfolgte ebenfalls über IPTG. Auf Grund der größeren Anreicherung des Mediums mit Sauerstoff und gezielter Nährstoffzugabe lassen sich wesentlich höhere Zelldichten erzielen.

Anschließend wurden die Zellen aus der Hauptkultur bei 4120 xg, 4 °C, 15 Minuten lang abzentrifugiert, in 20 mM NaP_i Puffer resuspendiert, in ein 50ml Falcon-Gefäß überführt und abermals bei 4120 xg, 4 °C, 15 Minuten lang abzentrifugiert.

Dabei wurde aus 6 l Kultur ein Zellsediment von 6-10 g erhalten, das bei -18°C im Gefrierschrank eingefroren wurde.

2.3.2. Zellaufschluss von *E.coli*

Zur Reinigung der rekombinanten Proteine müssen diese zunächst durch Aufbrechen der Zellwände zugänglich gemacht werden. Hierzu wurden zunächst die in 50 ml Falcon-Gefäßen gefrorenen Zellsedimente (vergleiche 2.3.1.1.) auf Eis aufgetaut. Eine Spatelspitze Lysozym (circa 10 mg) und eine Tablette *Complete EDTA free Proteaseinhibitorcocktail* wurden in 50 ml NaP_i-Puffer gelöst und 25 ml der Lösung auf das tauende Zellsediment (circa 6 - 10 mg) gegeben. Lysozym zerstört die bakterielle Zellmembran. *Complete EDTA free* ist ein Proteaseinhibitor, der die exprimierten Proteine vor einem vorzeitigen Abbau durch Proteasen schützen soll. Das Sediment wurde abwechselnd gevortext und auf Eis gestellt, bis das gesamte Sediment sich gelöst hatte. Um freigesetzte DNA zu verdauen, wurde eine gestrichene Spatelspitze DNaseI zugegeben und die Lösung etwa eine halbe Stunde unter gelegentlichem Vortex-mischen auf Eis inkubiert.

Um einen vollständigen Zellaufschluß zu erreichen, wurde die Lösung weiter in einem Ultraschall-Gerät behandelt. Dazu wurde das Falcon-Röhrchen mit dem Zelllysate gekühlt auf Eis in ein Ultraschall Gerät Sonifier 250 der Firma Branson eingebracht. Aufgeschlossen wurde 2 x 5 Minuten (*duty Cycle: 30%, output control: 7*) mit zwei verschiedenen Spitzen (Spitze 1: 13 mm Durchmesser, 10-250 ml; Spitze 2: 6,5 mm Durchmesser, 3-10 ml), je nach Probenvolumen. Um die Lösung von noch unaufgeschlossenen Zellen und Organellen zu befreien, wurden diese durch Zentrifugation bei 4120 xg für 30 Minuten und anschließend bei 28140 xg für 60 Minuten bei 4 °C sedimentiert. Die Überstände der Proben von His₆-tag modifizierten rekombinanten 20S Proteasomen wurden anschließend an das Äkta Explorer 10 Kit angeschlossen (siehe 2.3.3.1.). Die Überstände der α -Synuclein Proben wurden im Anschluss an die Zentrifugationsschritte im Wasserbad 10 Minuten auf 90°C erhitzt, bei 28140 xg für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend einer Ammoniumsulfatfällung und Dialyse unterworfen (siehe 2.3.5.)

2.3.3. Chromatographie

Unter Chromatographie versteht man alle Trennverfahren, bei denen sich das zu trennende Gemisch zwischen einer stationären und einer mobilen Phase verteilt. Bei den in dieser Arbeit angewendeten Verfahren der *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) werden wässrige Proteinlösungen mit Puffersystemen (mobile Phase) unter Druck über ein Säulenmaterial (stationäre Phase) geschickt.

2.3.3.1. Ni-Affinitätschromatographie

Die Ni-Affinitätschromatographie ist eine Variante der *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC), die eine schnelle Reinigung rekombinanter Proteine erlaubt, welche benachbarte oberflächenexponierte Histidine oder zur Erhöhung der Affinität eingeführte His-tags besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *HisTrapTM HP Columns* der Firma GE Healthcare mit einem Volumen von 1 ml verwendet. Die Verwendung eines Gradienten erlaubt eine Trennung nach verschiedenen Affinitäten. Zur Elution unspezifisch gebundener bakterieller Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Imidazolkonzentration von 20 mM genutzt. Zur Elution der His₆-tag modifizierten Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Imidazolkonzentration von 500 mM genutzt.

Zur Reinigung der rekombinanten His-tag modifizierten Proteine wurden, je nach Menge des aufgeschlossenen Zellpellets, eine oder mehrere, nach Angaben des Herstellers regenerierte, 1 ml HisTrap Säulen mit Puffer A äquilibriert. Die Überstände des Zellaufschlusses wurden nach Zugabe von Imidazol (Endkonzentration 20 mM) und Natriumchlorid (Endkonzentration 500 mM) über *Millex®-GV* (0,22 µm) Spritzenaufsatzfilter der Firma Millipore steril filtriert. Zur Reinigung der Mutanten des 20S Proteasoms wurde der *ÄKTA Explorer Kit* der Firma GE Healthcare verwendet (siehe Kapitel 2.3.4.).

2.3.3.2. Gelfiltrationschromatographie

Das Trennprinzip der Gelfiltrationschromatographie (auch Gelpermeationschromatographie) beruht auf der unterschiedlichen, größenabhängigen Permeabilität verschiedener Partikel in Lösung in einem porösen Trägermaterial definierter Porengröße. Proteine können mit dieser Methode in Abhängigkeit ihres Stoke's Radius, und damit näherungsweise ihrer Masse, aufgetrennt werden. Da die Ionen im Puffer der aufgetragenen Probe erst nach dem jeweiligen Protein von der Gelfiltrationssäule eluiert werden und Proteine bei hohen Imidazolkonzentrationen zur Instabilität neigen, bietet sich diese Methode besonders als zweiter Reinigungsschritt nach einer Ni-Affinitätschromatographie an. Das *ÄKTA Explorer Kit* verbindet diese beiden Chromatographiemethoden miteinander.

2.3.4. Automatisierte Reinigung mittels ÄKTA Explorer-Kit

Zur Reinigung der Mutanten des 20S Proteasoms wurde der *ÄKTA 3D Kit* der Firma GE Healthcare, der in einem auf 10 °C eingestellten Kühlkabinett installiert ist, verwendet. Dies erlaubte eine schnelle und automatisierte Reinigung von bis zu sechs Proben in mehreren Schritten während eines Laufs. Um rekombinante Proteine analog zu den in den Kapiteln

2.3.3.1. und 2.3.3.2. beschriebenen Methoden der Ni-Affinitäts-chromatographie mit anschließender Gelfiltration aufzureinigen, wurde die Anlage mit sechs 1 ml *HisTrapTM HP* Säulen und einer *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade* Säule ausgerüstet. Die Überstände aus Kapitel 2.3.2. wurden über *Millex®-GV* (0,22 µm) Spritzenaufsatzfilter steril filtriert. Der Auftrag der Lysate auf die 1 ml *HisTrapTM HP* Säulen ist in das Programm integriert und erfolgte über eine Probenpumpe, die an einen Luftsensord gekoppelt ist.

Die Reinigung erfolgt in den folgenden Schritten: Zunächst werden die bis zu sechs Lysate nacheinander auf die jeweiligen *HisTrapTM HP* Säulen aufgetragen und diese mit Puffer A gespült. Nachdem die letzte Probe geladen ist, wird die erste *HisTrapTM HP* Säule erneut mit Puffer A gespült und anschließend gebundenes Protein durch Stoßelution mit 500 mM Imidazol (100 % Puffer B) von der Säule gelöst. Ein Detektor verfolgt die Absorption des Eluats bei 280 nm und steuert die Umleitung des eluierten Proteins in einen 5 ml Loop, für die ersten 5 ml der Stoßelution. Die *HisTrapTM HP* Säule wird mit Puffer A gespült und der gesammelte Proteinpeak im folgenden Schritt auf die *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade Säule* aufgetragen. Das Eluat dieser Säule wird in je 2 ml Fraktionen in 96-well *PP-Masterblock* Platten der Greiner bio-one GmbH gesammelt. Nach Beendigung des ersten Gelfiltrationslaufs erfolgt nacheinander die Elution weiterer Proben nach demselben Prinzip. Die Programmierung des Laufs wurde mit Hilfe des in der Steuerungssoftware UNICORNTM enthaltenen *Method Wizards* durchgeführt.

Nach Analyse der aus der Gelfiltration erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.3.6.) wurden die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen vereint, die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 2.3.7.) und die Lösung aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

2.3.5. Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Die Eigenschaften eines Salzes, Proteine zu fällen, sind in der Hofmeister-Serie beschrieben. Ammoniumsulfat gehört zu den antichaotropen Salzen, die die Proteinaggregation über hydrophobe Wechselwirkungen fördern. Ammoniumsulfat wird üblicherweise bei konstanter Temperatur und pH portionsweise zu der jeweiligen Proteinlösung zugegeben, um eine fraktionierte Fällung und somit Anreicherung des Proteins zu ermöglichen.

Zur Reinigung der Überstände der α -Synuclein Proben wurden die aufgeschlossenen Proben einer Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Der Überstand der Hitzefällung wurde schrittweise unter Rühren bei Raumtemperatur auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von

etwa 1M gebracht und danach 30 Minuten bei 28140 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 20 mM Tris, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7,6 gelöst. Die Lösung wurde in eine SNARE Dialyse Membran MWCO 5 kDa gegen denselben Puffer dialysiert, um Ammoniumsulfat aus der Lösung zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.3.6) auf den Gehalt des gewünschten Proteins überprüft und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 2.3.8).

2.3.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die analytische Trennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) beruht auf deren je nach Größe, Form und Ladung unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Die Elektrophorese erfolgt in einer elektrisch neutralen, festen Gelmatrix aus Polyacrylamid, das durch Polymerisierung einer Mischung aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid entsteht. Die Porengröße wird bestimmt durch die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese mit selbst gegossenen Gelen in vertikalen Gelkammern des *Mighty Small II*-Systems der Firma GE Healthcare mit 8 x 7 cm großen und 0,7 mm dicken Gelen durchgeführt. Zudem wurden 4-20 % *Tris-Glycine* Gele der Firma Invitrogen in der *XCell SureLock™ Mini-Cell* desselben Herstellers verwendet.

2.3.6.1. SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE wird die zu analysierende Proteinmischung mit dem stark amphiphatischen Detergenz Natrium-Laurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) denaturiert und solubilisiert. Auf diese Weise werden nahezu alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein zerstört. Zur vollständigen Denaturierung enthält der Probenpuffer zudem Dithiothreitol (DTT) zur Reduktion von Disulfidbrücken, da die meisten Polypeptide SDS in konstantem Gewichtsverhältnis binden (circa 1,4 SDS-Moleküle pro Aminosäure). Durch die stark negativ geladene SDS-Hülle werden Proteine in eine elongierte Form gezwungen. Ihre Laufstrecke im Gel steht in einem logarithmischen Zusammenhang mit der Molekülmasse. In der vorliegenden Arbeit wurde der Molekulargewichtsstandard *SDS-PAGE Standard Broad Range* der Firma BioRad (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.3.) verwendet. Die Gelelektrophorese wird mit zwei verschiedenen Systemen durchgeführt, die sich in ihrer Pufferzusammensetzung unterscheiden. Die selbst hergestellten Gele werden mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % nach dem SCHÄGGER-System gegossen [Schägger et al. 1987]. Die 4-20 % *Tris-Glycine* Gele der Firma Invitrogen beruhen auf dem LAEMMLI-

System [Laemmli 1970]. Bei beiden Systemen wird die aufgetragene Probe zunächst in einem Sammelgel (*stacking gel*) konzentriert, um von dort in das Trenngel (*separating gel*) zu wandern.

Zur Herstellung der 12 % SCHÄGGER-SDS Gele wurden in einer Gießapparatur nacheinander je eine Aluminium- und eine Glasplatte, durch zwei Spacer getrennt, gestapelt und anschließend das Trenngel eingefüllt. Zur gleichmäßigen Polymerisation an der Grenzfläche wurden die Gele mit absolutem Ethanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wird das überstehende Ethanol abgegossen, die Grenzfläche mit destilliertem Wasser gespült, mit Filterpapierstreifen getrocknet, das Sammelgel eingefüllt und die Gelkämme eingesteckt.

Zu analysierende Proteinlösungen wurden in einem Probenvolumen 2 x SCHÄGGER SDS-Probenpuffer mit oder ohne DTT vermischt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Gele wurden nach Angaben des Herstellers in die Apparatur gesetzt und die Kammer mit 1x Kathodenpuffer im oberen und 1x Anodenpuffer im unteren Pufferreservoir befüllt. Nach dem Pipettieren der Probe in die Kammern wurde die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel gestartet. Die Elektrophorese wurde je nach Größe der Proteine in den Proben zu unterschiedlichen Zeiten gestoppt. Um die optimalen Laufzeiten der Elektrophorese zur Analyse des Zielproteins abschätzen zu können, wurde ein vorgefärbter Marker mit aufgetragen (*Bench Mark Prestained Protein Ladder*, Invitrogen).

Die Gele wurden zur Visualisierung der Proteinbanden einer Coomassie-Färbung (siehe Kapitel 2.3.6.) unterzogen.

2.3.6.2. Native PAGE

Bei der nativen PAGE werden spezielle nicht denaturierende und nicht reduzierende Puffer eingesetzt, wodurch die Proteine im Gel entsprechend ihres Molekulargewichts/Nettoladungsverhältnisses aufgetrennt werden. Für eine native PAGE wurden 4-20 % *Tris-Glycine* Gele verwendet. Als Molekulargewichtsstandard diente das *High Molecular Weight (HMW) Calibration Kit for Native Electrophoresis* der Firma GE Healthcare (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.3.).

Je 10 µl Proteinlösung wurden mit einem Probenvolumen 2 x Tris-Glycin-Nativ-Ladepuffer von 10 µl versetzt. Die Gele wurden nach den Angaben des Herstellers in die Apparatur eingesetzt, die Kammer mit 1 x Tris-Glycin Nativ Laufpuffer gefüllt und die Proben in die Kammern pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 125 V durchgeführt und nach etwa fünf Stunden abgebrochen, sobald die Stromstärke auf einen

konstanten Wert von ca. 6 bis 10 mA pro Gel abgesunken war. Anschließend wurde zur Visualisierung der Proteinbanden im Gel eine Coomassie-Färbung durchgeführt.

2.3.7. Coomassie-Färbung

Zur Analyse der Polyacrylamidgele wurden die Proteinbanden durch Behandlung mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei etwa 0,1 µg Protein pro Bande.

Nach dem beendeten Lauf wurde das Gel dazu aus den beiden Platten herausgenommen und unter leichtem Schütteln 15 Minuten in Fixierungslösung inkubiert. Anschließend wurde es in Coomassie-Färbelösung weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt, zum Entfärben mit destilliertem Wasser abgespült und in der Entfärbelösung so lange inkubiert, bis der gewünschte Färbegrad erreicht ist. Zur Archivierung wurde das Gel eingescannt und – nach Quellen in destilliertem Wasser – zum Trocknen im *GelAir Dryer* der Firma BioRad zwischen zwei *GelAir Cellophane Support*-Folien desselben Herstellers in einen Rahmen gespannt.

2.3.8. Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration von Komponenten in wässrigen Lösungen zu ermitteln, wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine photometrische Methode als auch eine kolorimetrische Methode genutzt. Bei kolorimetrischen Methoden werden Proteine aufgrund einer Farbreaktion im Sauren oder Basischen irreversibel denaturiert. Die photometrische Methode hingegen erhält die biologische Funktion des Proteins oder Moleküls, und es kann im Anschluß an eine Messung weiter verwendet werden. Im Vergleich zu den kolorimetrischen Methoden hat die photometrische Methode aber eine geringere Sensitivität.

2.3.8.1. *Photometrische Konzentrationsbestimmung*

Die photometrische Konzentrationsbestimmung beruht auf der Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration einer absorbierenden Substanz. Diese wird in verdünnten Lösungen durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$A = \log(I_0 / I) = \varepsilon * c * d$$

Gleichung 2.1: Lambert-Beersches Gesetz, A entspricht dem im Photometer gemessenen Absorptionswert, I_0 der Intensität des eintretenden, I der Intensität des nach Durchlaufen der Probenlösung austretenden Lichtstroms, c der molaren Konzentration der absorbierenden Substanz (mol/l) und d der Schichtdicke (mm). ε wird als molarer Absorptionskoeffizient bezeichnet ($l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$).

Photometrische Konzentrationsbestimmungen werden gewöhnlich bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums der gemessenen Molekülspezies durchgeführt, da hier die Genauigkeit und Empfindlichkeit der Messung am Höchsten ist.

Zur photometrischen Proteinkonzentrationsbestimmung wurden Absorptionsmessungen bei 280 nm ($A_{280 \text{ nm}}$) durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Im Falle von Cytochrom C wurden die Absorptionsmessungen bei 409 nm ($A_{409 \text{ nm}}$) durchgeführt, in diesem Bereich hat die Häm-Gruppe des Cytochrom C ein Absorptionsmaximum. Ferner wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Proteine vermessen. Hier wurde nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) vorgegangen und bei den vorgegebenen Absorptionsmaxima gemessen. Sämtliche verwendete Werte molarer Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 2.7 angegeben.

Tab. 2.7: Molare Extinktionskoeffizienten von Proteinen und Fluoreszenzfarbstoffen. Die Werte für das 20S Proteasom und α -Synuclein wurden mit Hilfe des Programms ProtParam tool (Expert Protein Analysis System) des ExPASy Servers, Swiss Institut of Bioinformatics, berechnet. Da sowohl das 20S Proteasom als auch α -Synuclein keine Tryptophan besitzen, weist der vom Programm berechnete Extinktionskoeffizient einen Fehler von mehr als 10 % auf.

Protein / Molekül	Molarer Absorptionskoeffizient ε [$\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$]
20S Proteasom (<i>Ta</i>)	418075 (bei 280 nm)
Cytochrom C	79400 (bei 409 nm)
α -Synuclein	5960 (bei 280 nm)
Alexa 488	71000 (bei 490 nm)
Alexa 594	73000 (bei 590 nm)

Der durchschnittliche Markierungsgrad (DOL, *Degree of labeling*) bei der Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen (siehe 2.3.11) wurde nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen) bestimmt und basiert ebenfalls auf einer photometrischen Bestimmung. Die vom

Hersteller angegebene Formel zur Bestimmung des durchschnittlichen Markierungsgrades ist in Gleichung 2.2 angegeben.

$$\text{DOL (Degree of labeling)} = (A_{\text{Farbstoff}} * MW_{\text{Protein}}) / (\epsilon_{\text{Farbstoff}} * c_{\text{Protein}})$$

Gleichung 2.2: Formel zur Ermittlung des durchschnittlichen Markierungsgrad (DOL). Die Messung der Probe wird beim Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffs durchgeführt, $A_{\text{Farbstoff}}$ entspricht der gemessenen Absorption, MW_{Protein} steht für das Molekulargewicht des markierten Proteins, $\epsilon_{\text{Farbstoff}}$ für den Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Farbstoffs beim Absorptionsmaximum, c_{Protein} für die Konzentration des markierten Proteins.

2.3.8.2. Kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wässriger Lösungen wurde durch die Färbemethode nach BRADFORD [Bradford 1976] mit Hilfe des *Protein Assay* der Firma BioRad bestimmt.

Zur Durchführung des Tests wurden 800 µl Proteinlösung in geeigneter Verdünnung mit 200 µl Farbreagenz durchmischt und nach einer Inkubationsdauer von mindestens fünf Minuten, jedoch nicht mehr als einer Stunde, die Absorption dieser Mischung bei 595 nm gegen eine nur Puffer und Farbstoff enthaltende Blindprobe gemessen. Zur Ermittlung der Kalibrationsgeraden wurden parallel dazu sechs BSA-Proben mit einer Endkonzentration von 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 mg/ml in gleicher Weise hergestellt und vermessen. Alle Bestimmungen wurden zweifach ausgeführt und die resultierenden Messwerte gemittelt. Die Konzentration der Proteinlösung ergibt sich durch Einsetzen des zugehörigen Wertes in die durch lineare Regression der Kalibrationskurve erhaltenen Geradengleichung. Die Genauigkeit dieser Konzentrationsbestimmung hängt in erster Linie von der Ähnlichkeit des Färbeverhaltens der Proteine im Vergleich zu BSA ab. Die Bestimmung ist somit nicht absolut.

2.3.9. Konzentration und Umpuffern von Proteinlösungen

Für einige Anwendungen war es nötig, Proteinlösungen aufzukonzentrieren oder in einen anderen Puffer zu überführen. Hierzu wurden, je nach Volumen der aufzukonzentrierenden Lösung, *Amicon®Ultra-15* Zentrifugen-Filtereinheiten der Firma Millipore mit unterschiedlichen Porengrößen nach Herstellerangaben verwendet. Die Funktionsweise dieser Konzentratoren beruht auf der Methode der Ultrafiltration, die die Trennung gelöster oder suspendierter Moleküle nach deren Molekülgröße und –form bewirkt. Substanzen, die größer sind als die Poren der verwendeten Membran, werden zurückgehalten, während kleinere Moleküle bei Zentrifugation durch die Membran hindurch gelangen können. Die

Salzkonzentration der Proteinlösung bleibt dabei annähernd konstant. Ein Umpuffern der Probe ist durch mehrmaliges Aufkonzentrieren und Verdünnen mit dem gewünschten Puffer möglich.

2.3.10. Inhibition des 20S Proteasoms durch clasto-Lactacystin β -lacton

Zur Inhibition des 20S Proteasoms wurde der Inhibitor clasto-Lactacystin β -lacton benutzt [Dick et al. 1996]. Dieser bindet kovalent und irreversibel an die aktiven Zentren des 20S Proteasoms. Zur Inhibition wurde 1 mg Inhibitor in 1 ml DMSO gelöst. Von dieser Lösung wurden 100 μ l tropfenweise unter Rühren zu 1,516 ml Lösung von 20S Proteasomen einer Konzentration von 3,1 mg/ml in HEPES Puffer A gegeben. Das entspricht einem Überschuß von 5 Molekülen clasto-Lactacystin β -lacton pro aktivem Zentrum des 20S Proteasoms. Die Lösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und der Inhibitor anschließend über Zentrifugation in Filtereinheiten abgetrennt (siehe 2.3.9). Im Anschluß wurde die Aktivität der inhibierten 20S Proteasomen durch einen Aktivitätstest mit Suc-LLVY-Amc überprüft (siehe 2.5.1). Proben, die keine Aktivität zeigten, wurden zur Markierung weiterverwendet (siehe 2.3.11).

2.3.11. Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Im Rahmen des Kooperationsprojektes mit der Gruppe von R. Guckenberger wurden 20S Proteasomen (*Ta*) mit *Alexa Fluor*[®] 488 (Invitrogen) und Cytochrome C mit *Alexa Fluor*[®] 488 (Invitrogen) oder *Alexa Fluor*[®] 594 (Invitrogen) markiert, um im Anschluß Host-Guest-Komplexe (siehe 2.3.10) herzustellen und diese über konfokale Mikroskopie (siehe 2.6.1.) näher zu analysieren.

Für die Markierung der inhibierten (siehe 2.3.11) oder aktiven 20S Proteasomen wurden 1 mg *Alexa Fluor*[®] 488 *C*₅-Maleimid in 140 μ l DMSO gelöst. Die Maleimidgruppe kann über eine Alkylierung eine kovalente Bindung mit freien Cysteinen, von denen sich sieben an der Oberfläche eines α -Ringes des Proteasomes befinden, eingehen. Die Farbstofflösung wurde tropfenweise zu 1 ml *wt* Proteasomlösung in HEPES Puffer A gegeben, das entspricht einem 14 fachen Überschuß des Farbstoffes pro Cystein. Die Lösung wurde lichtgeschützt 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf eine Hi Prep Desalting Säule 26/60 (GeHealthcare) aufgespritzt um überschüssigen Fluoreszenzfarbstoff abzutrennen.

Zur Markierung von Cytochrom C mit *Alexa Fluor® 594 Succinimidylester* wurden 5 mg Cytochrom C in 0,5 ml 0,1M NaCO₃ pH 8,3 gelöst. Die Succinimidylestergruppe kann über eine Amidierung eine kovalente Bindung mit Aminen eingehen. Es wurde 1mg des jeweiligen Alexa Farbstoffes in 50 µl DMSO tropfenweise bei Raumtemperatur zugegeben. Das entspricht ungefähr einem 10 fachen Überschuß des Farbstoffes pro Lysin des Cytochrom C. Die Lösung wurde wie oben gerührt und anschließend auf eine Hi Prep Desalting Säule (GE Healthcare) aufgespritzt um überschüssigen Fluoreszenzfarbstoff abzutrennen.

Von den markierten Proteinen wurde der DOL bestimmt (siehe 2.3.8.1) und wurden zur Herstellung von Host-Guest-Komplexen weiterverwendet (siehe 2.3.12).

2.3.12. Herstellung von Host-Guest-Komplexen

Die Herstellung von Host-Guest-Komplexen mit dem 20S Proteasom als Wirt und Cytochrom C als Gast erfolgte wie zuvor beschrieben [Huffmann et al. 2003]. Zunächst wurden 832 µl einer Cytochrom C Lösung einer Konzentration von 10 mg/ml für 30 Minuten bei 60°C in HEPES Puffer A in 2M Guanidin inkubiert. Anschließend wurden 1,516 ml Lösung inhibierter oder aktiver Proteasomen einer Konzentration von 3,1 mg/ml zugegeben, das entspricht einem 100 fachen Substratüberschuß, und das Gemisch weitere 5 oder 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Die Lösung wurde 60 Minuten auf Eis gestellt und im Anschluß auf eine *HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade Säule* aufgespritzt.

Die Proteasom enthaltenden Proben wurden vereint und im Falle von markierten Proben (siehe 2.3.11) an einem konfokalen Mikroskop (siehe 2.5.1.) untersucht.

2.4. Immunologische Arbeitsmethoden

Um His₆-tag modifizierte β-Untereinheiten des 20S Proteasoms in Proteinbanden einer PAGE nachzuweisen wurden Western Blots durchgeführt. Beim Western-Blotting werden in einem Gel aufgetrennte Proteine über Kapillartransfer oder Elektrotransfer auf einen Träger, z.B. Nitrozellulose, übertragen und für die nachfolgende Immunodetektion immobilisiert. Zunächst wurde eine SDS-PAGE (siehe 2.3.6.1) durchgeführt. Als Trägermaterial wurde eine Nitrozellulosemembran gewählt, diese wurde etwa 5 Minuten in Methanol geschwenkt und anschließend in Transferpuffer überführt. Ein Filterpapier, die PAGE aus der Gelelektrophorese, die Nitrocellulosemembran und ein weiteres Filterpapier wurden in dieser Reihenfolge im Transferpuffer gestapelt und anschließend auf eine *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Biorad) überführt. An diese wurde eine konstante Spannung von 15 V für 45

Minuten angelegt. Die Membran wurde mit einer Ponceau-Rot Lösung (2 % in 3 % TCA) vor der Immunodetektion auf die Übertragungseffizienz überprüft und anschließend in 3% Magermilchpulver in TBS-T über Nacht geschwenkt. Am Folgetag wurde die Membran einmal 15 Minuten in TBS-T Puffer, dann weitere zweimal für 5 Minuten unter Austauschen des Puffers geschwenkt. Für die Immunodetektion wurde die Membran mit einem IgG Antikörper, der die His₆-tags erkennt, eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Dieser erste Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers verdünnt. Nach der ersten Inkubation wurde die Membran wie oben beschrieben einmal 15 Minuten in TBS-T Puffer, dann weitere zweimal für 5 Minuten unter Austauschen des Puffers geschwenkt. Im nächsten Schritt wurde eine Lösung des zweiten Antikörpers in TBS-T nach Angaben des Herstellers zugegeben. Dieser zweite Antikörper erkennt den ersten Antikörper, ferner ist der zweite Antikörper an *Alkaline Phosphatase* gekoppelt. Nach der zweiten Inkubation wurde die Membran wie auch nach der ersten Inkubation gewaschen und anschließend nach Angaben des Herstellers mit dem BCIP/NBT System (Sigma) weiterbehandelt. Das BCIP/NBT System (Sigma) wird von der *Alkaline Phosphatase* als Substrat erkannt und es entsteht ein im Sichtbaren gefärbtes Produkt. Über eine Färbung der Membran lassen sich so Stellen auf der Membran, an denen sich *Alkaline Phosphatase* und damit indirekt auch das Zielprotein, hier β -Untereinheiten des 20S Proteasoms oder β -Casein *Bt*, befindet, nachweisen.

Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen ist in dem Kapitel 2.1.6. beschrieben.

2.5. Bestimmung der enzymatischen Aktivität

2.5.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit Suc-LLVY-Amc und Mca-RPPGFSAFK(Dpn)-OH

Zur Untersuchung der Enzymkinetik der Mutanten des 20S Proteasoms wurde das fluorogene, synthetische Tetrapeptid N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amino-4-methylcoumarinamid (Suc-LLVY-Amc) der Firma Bachem verwendet, das als Modellsubstrat für das 20S Proteasom benutzt wird [Seemüller 1995]. Der in gebundener Form gequenchte Fluoreszenzfarbstoff Amc (7-Amino-4-methylcoumarin) wird durch die Spaltung einer Amidbindung freigesetzt, was eine Quantifizierung des Abbaus über die Zunahme der Fluoreszenzintensität ermöglicht. Amc besitzt in freier Form ein Absorptionsmaximum bei 380 nm und emittiert, nach Anregung bei dieser Wellenlänge, Licht der Wellenlänge 460 nm.

Als Standard diente der freie Fluoreszenzfarbstoff Amc, der ebenfalls von der Firma Bachem bezogen wurde.

Die Messung der Fluoreszenz wurde mit dem *FLUOstar OPTIMA Platereader* der Firma BMG Labtech in *96-well* Mikroplatten der Firma Greiner-bio-one durchgeführt. Zur Anregung wurde gefiltertes Licht der Wellenlänge 320 nm verwendet, die Emission wurde hinter einem bei 460 nm Wellenlänge durchlässigen Filter detektiert. Suc-LLVY-Amc und Amc wurden in Konzentrationen von 1 und 10 mM in trockenem DMSO gelöst und aliquotiert bei -20 °C eingefroren. Diese Lösungen wurden direkt vor der Durchführung der Messungen bis zur gewünschten Konzentration mit Hepes Puffer A verdünnt. Für die Analysen wurden unterschiedliche Substrat-, Salz- und Proteasomkonzentrationen eingesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass die DMSO-Konzentration 5 % nicht überschreitet. Die Messungen wurden bei 37 °C durchgeführt. Die Proben wurden vor Beginn der Messung 10 Minuten inkubiert. Das Endvolumen der Ansätze betrug 200 µl. Die Platte wurde nach der Injektion 30 Sekunden lang geschüttelt und die Fluoreszenz weitere 50 Minuten in regelmäßigen Abständen vermessen. Da die erhaltenen Messwerte gerätebedingten Schwankungen unterworfen sind, wurde auf jeder Platte eine eigene Amc-Kalibrationsreihe mit Konzentrationen analog zu denjenigen des Substrats vermessen. Dies ermöglicht eine Quantifizierung des freigesetzten Amc. Als Blindwerte dienten Substratlösungen identischer Konzentration, zu denen jedoch kein Proteasom gegeben wurde. Alle Messungen wurden mehrmals durchgeführt und die erhaltenen Substratumsätze pro Zeiteinheit gemittelt.

Die Werte der Amc-Kalibrationsreihe wurden über die Dauer der Messung gemittelt und eine Kalibrationskurve erstellt. Diese verlief bis zu einer Amc-Konzentration von 10 µM linear und die durch lineare Regression erhaltene Geradengleichung konnte zur Berechnung der Konzentration des freigesetzten Amc verwendet werden, da die Werte der Aktivitätsmessung im linearen Bereich lagen. Zur Auswertung der Rohdaten der Aktivitätsreihen wurde zunächst von allen Messwerten der Substratumsatz durch lineare Regression ermittelt. Der Substratumsatz pro Zeiteinheit entspricht der Zunahme des freigesetzten Amc nach der Injektion des Proteasoms. Die Messungen mit dem Nonapeptid Mca-RPPGFSAFK(Dpn)-OH wurden analog zu den Messungen mit Suc-LLVY-Amc durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde Mca-OH eingesetzt und entsprechend des Absorptions- und Emissionsmaximums von Mca bei 320 nm angeregt und bei 405 nm detektiert.

2.5.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität mit Casein

Um die Enzymkinetik der Mutanten des 20S Proteasoms für größere Substrate zu analysieren, wurden Bodipy FL Casein eingesetzt. Sind die Bodipy FL Fluorophore an das Casein gebunden, befinden sie sich in räumlicher Nähe zueinander und es kann ein intramolekularer Energietransfer stattfinden. Bei Spaltung des Caseins durch eine Protease wie das 20S Proteasom werden die Fluorophore räumlich voneinander getrennt und eine Fluoreszenzzunahme kann detektiert werden.

In den Messungen wurde das *EnzChek®Protease Assay Kit (green fluorescence)* der Firma Invitrogen verwendet, das mit BODIPY FL gelabeltes Casein (Bodipy-Casein) enthält. Das Kit enthält nach Angaben des Herstellers stark mit BODIPY FL gelabeltes Casein, das fast vollkommen gequencht ist. Der Degree of Labeling wird vom Hersteller nicht angegeben. Der Fluorophor des *EnzChek®Protease Assay Kit (green fluorescence)* hat bei Freisetzung ein Absorptionsmaximum von 505 nm und ein Emissionsmaximum von 513 nm. Laut den Angaben des Herstellers können aber auch Filtersätze von 485 nm \pm 12,5 nm (Absorption), 530 nm \pm 15 nm (Emission) verwendet werden. Die Messung der Fluoreszenz wurde mit dem *FLUOstar OPTIMA Platerereader* der Firma BMG Labtech in 96-well Mikroplatten der Firma Greiner-bio-one durchgeführt. Zur Anregung wurde Licht der Wellenlänge 485 nm verwendet, die Emission wurde hinter einem für Strahlen mit 520 nm Wellenlänge durchlässigen Filter detektiert. Es wurden unterschiedliche Salz-, Substrat- und Proteasomkonzentrationen eingesetzt. Da die erhaltenen Messwerte gerätebedingten Schwankungen unterworfen sind, wurde auf jeder Platte eine eigene BODIPY FL-Kalibrationsreihe nach Totalverdau durch Trypsin mit Konzentrationen analog zu denjenigen des Substrats vermessen. Dies ermöglichte eine ungefähre Quantifizierung des freigesetzten BODIPY FL. Der Verdau mit Trypsin wurde eine Stunde vor Beginn der Messung angesetzt. Als Blindwerte dienten Substratlösungen identischer Konzentration, zu denen jedoch kein Proteasom gegeben wurde. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt und die erhaltenen Substratumsätze pro Zeiteinheit gemittelt. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft® Office XP Excel 2002, die nichtlinearen Kurvenfittings mit IgorPro 5.00 durchgeführt.

2.5. Mikroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche mikroskopische Techniken zur weiteren Analyse der gereinigten Proteine genutzt. In der Kooperation mit der Gruppe von R. Guckenberger wurden alle mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Host-Guest-Komplexe (siehe 2.3.11 und 2.3.12) mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (siehe 2.6.1) untersucht. Sämtliche gereinigte 20S Proteasomen (siehe 6.1) wurden am Transmissionselektronenmikroskop (siehe 2.6.2) abgebildet.

2.5.1. Konfokale Mikroskopie

In einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop wird im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop nicht das Objekt insgesamt beleuchtet, sondern es wird Punkt für Punkt mit einem Lichtpunkt abgerastert. Licht, das nicht aus der Fokusebene kommt, wird zum Teil über eine Lochblende ausgeblendet. Die Auflösung ist im Vergleich zum konventionellen Lichtmikroskop um den Faktor 1,4 erhöht.

In dem in dieser Arbeit genutzten konfokalen Laser Scanning Mikroskop wurde die Probe mit einem Lichtpunkt von 200 nm Durchmesser abgerastert. Bei hinreichender Probenverdünnung kann so eine Einzelmolekülanalyse durchgeführt werden. Zusätzlich wurde ein sehr empfindliches Detektionssystem mit Avalanche Photodioden genutzt, die auch einzelne Lichtquanten detektieren können.

Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Host-Guest-Komplexe (siehe 2.3.11 und 2.3.12) wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops in der Gruppe von R. Guckenberger untersucht. Dabei wurde ausgenutzt, dass die Fluoreszenzfarbstoffe *Alexa Fluor® 488* und *Alexa Fluor® 594* ein FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) Paar bilden. Bei Anregung des Donors *Alexa Fluor® 488* wird Energie über einen strahlungslosen Übergang auf den Akzeptor, *Alexa Fluor® 594*, der sich in räumlicher Nähe des Donors befindet, übertragen. Dieser emittiert daraufhin Licht einer Wellenlänge (Emissionsmaximum 617 nm), die größer als die Emissionswellenlänge des Donors (Emissionsmaximum 519 nm) ist. Die Effizienz dieser Energieübertragung ist insbesondere vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor und deren Förster-Radius abhängig (siehe Gleichung 2.3).

$$E = (R_0^6) / (R_0^6 + r^6)$$

Gleichung 2.3: Abstandsabhängigkeit der Energieübertragung eines FRET-Paars von dessen Förster-Radius, R_0 , und dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor, r . Der Förster-Radius wird als der Abstand zwischen Donor und Akzeptor bezeichnet, bei dem die Hälfte der vom Donor aufgenommenen Energie auf den Akzeptor übertragen wird.

Bei Kenntnis des Förster-Radius eines FRET-Paars kann so die Entfernung zwischen Donor und Akzeptor berechnet werden.

2.5.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Elektronen lassen sich, wie auch Licht, sowohl als Welle als auch als Teilchen beschreiben (Welle-Teilchen Dualismus), und können ähnlich wie das Licht in einem Lichtmikroskop zur Abbildung von Objekten genutzt werden. In einem Transmissionselektronenmikroskop werden Elektronen von einer elektrisch aufgeheizten Kathode emittiert und mit Hilfe einer Anode, an der eine sehr hohe Spannung ($\sim 10^5$ V) anliegt, beschleunigt. Im Zentrum der Anode befindet sich ein Loch, durch das ein Teil der beschleunigten Elektronen austreten kann. Dieser Elektronenstrahl durchläuft Kondensorenblenden und magnetische Linsen, die den Elektronenstrahl fokussieren. In der Objektivenebene durchdringt der fokussierte Elektronenstrahl dann das Präparat und wird anschließend von der Objektivlinse und weiteren Linsen auf dem Detektor fokussiert. Vom Detektor wird die detektierte Abbildung des Objekts an einen Rechner übermittelt. Im Inneren der Säule des Elektronenmikroskops herrscht ein Vakuum, damit eine ausreichend große mittlere freie Weglänge der Elektronen gewährleistet werden kann. Die Wellenlänge der Elektronen bei einer Beschleunigungsspannung von 160 kV beträgt ungefähr 0,0027 nm. Das bestimmt die theoretische Auflösungsgrenze. Da Elektronenlinsen wesentlich schlechter sind als Linsen für Licht, kann diese theoretische Auflösungsgrenze aber nicht erreicht werden.

2.6.1 Probenpräparation

Als Objektträger für Proteasomproben wurden mit 10 nm Kohlefilm überzogene Kupfernetze einer Maschengröße von *400x 100 mesh, copper 3,05 mm* der Firma Plano verwendet. Kurz vor Aufbringen der Probe wurden die Oberflächen der Netze noch einmal im *Plasma Cleaner* (Herstellung im Hause) für eine Minute gereinigt, um dann für eine Minute mit 5 μ l der gereinigten 20S Proteasomen (siehe 6.1) einer ungefähren Konzentration von 0,05 mg/ml inkubiert zu werden. Im Anschluß wurden die Netze kurz mit 5 μ l Milli-Q Wasser gespült

und dann zur Negativkontrastierung 1 Minute in 2 % Uranlylacetatlösung in Wasser inkubiert. Nach Entfernen von überschüssiger Uranlylacetatlösung mit Filterpapier wurden die Netze in ein Transmissionselektronenmikroskop (siehe 2.6.2) eingeschleust.

2.6.2 Abbildung am Transmissionselektronenmikroskop

Zum Abbilden der Proteasomproben auf den Kupfernetzen wurde das Transmissionselektronenmikroskop CM 200 FEG der Firma Philipps genutzt. Nach Justage und Fokussierung des Elektronenstrahls wurden Aufnahmen bei einer 38 000 x oder 66 000 x Vergrößerung bei einem maximalen Defokuswert von – 3800 nm bei 160 kV gemacht. Dies entspricht einer finalen Vergrößerung unter Verwendung der installierten CCD Kamera von 53960 x bzw. 93126 x. Die Objektpixelgröße hat im Falle der 53960 x Vergrößerung eine Größe von 0,278 nm, im Falle der 93126 x Vergrößerung eine Größe von 0,161 nm.

2.6. CD Spektroskopie

Der Circular dichroismus basiert auf der Wechselwirkung optisch aktiver Substanzen mit polarisiertem Licht. Optisch aktive Substanzen absorbieren links- und rechts-zirkular polarisierte Komponenten des Lichts unterschiedlich. Es wird zwischen einem molaren Absorptionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertem Licht (ϵ_L bzw. ϵ_R) unterschieden. In der CD-Spektroskopie wird die Differenz zwischen diesen beiden Absorptionkoeffizienten gemessen ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$). Sie wird als Elliptizität θ angegeben:

$$\theta(\lambda) = \text{const.} (\epsilon_L - \epsilon_R) * c * d$$

Gleichung 2.4: Die Abhängigkeit der Elliptizität θ von der Wellenlänge λ . Die Elliptizität wird bei Aufnahme eines CD-Spektrums aufgezeichnet. Sie ist abhängig von der Schichtdicke d der verwendeten Küvette und der Konzentration der Probe c sowie der Differenz der Absorptionskoeffizienten $\epsilon_L - \epsilon_R$ der Probe.

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen CD-Spektren wurden an einem Jasco 810 CD-Spektrometer bei einer Küvettschichtdicke von 0,1 cm und 0,01 cm aufgenommen. Es wurden Proben von Bodipy FL Casein einer Konzentration von 1 mg/ml in NaPi-Puffer sowie mit Guanidine- und Harnstoffkonzentrationen von 300 mM, 1 M und 2 M in einem Spektralbereich von 250 nm bis (je nach Probe) 190 nm vermessen. In einem Spektralbereich von 160 nm – 250 nm lassen sich Proteinsekundärstrukturen untersuchen.

2.7. Kristallisation für die Röntgenstrukturanalyse

Um eine höhere Auflösung der Röntgenstruktur des wt 20S Proteasoms oder von Host-Guest-Komplexen [Felderer et al. 2008] zu erlangen wurden Proben zur Kristallisation wie in [Löwe et al. 1995; Felderer et al. 2008] beschrieben behandelt. Anschließend wurden Kristallisationsansätze mit den Kristallisationsscreens der Firma *Hampton* im *hanging-drop* Verfahren nach der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt. Des Weiteren wurde der Kristallisationsservice der Abteilung für Strukturelle Zellbiologie genutzt. Hier wurden im *sitting-drop* Verfahren mit einem *Phoenix nanodispenser robot* der Firma *Art Robbins Instruments* Kristallisationsscreens nach der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt. Kristalle wurden mit *CrypLoopsTM* der Firma Hampton Research aus den Tropfen gefischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und an der Beamline X06SA-PX der *Swiss Light Source* SLS, Villigen, Schweiz vermessen.

2.8. Massenspektrometrie

Zur massenspektroskopischen Analyse wurden Verdauproben einer Peptidkonzentration von 100 μM , wie in 2.5.1 für Suc-LLVY-Amc und Mca-RPPGFSAFK(Dpn)-OH beschrieben, angesetzt und bei 37 °C oder 60 °C verdaut. Für Bodipy FL Casein wurden Verdauproben (2,5 μg Bodipy FL Casein, 4 μg Proteasom), wie in 2.5.2 beschrieben, angesetzt und bei 37°C verdaut. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben gezogen in diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden anschließend in der masse Einheit der Core Facility im Hause analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Übersicht

Das 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum*, das für alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen benutzt wurde, zeichnet sich dadurch aus, dass es nur aus einer Art von α - und β -Untereinheiten [Dahlmann et al. 1989] besteht und dass es eine hohe thermische Stabilität [Zwickl et al. 1992] besitzt. Die Strukturgene der Untereinheiten lassen sich in *E.coli* exprimieren und aus diesen Expressionen vollständig assemblierte 20S Proteasomen reinigen [Zwickl et al. 1992].

Ein Ansatz, die Interaktion von Substraten mit dem 20S Proteasom genauer zu charakterisieren, wurde von Huffmann et al. (2003) beschrieben. In dem Ansatz wurden sogenannte Host-Guest-Komplexe hergestellt, die von Felderer et al. (2008) kristallisiert wurden. Im Vergleich der Röntgenkristallstruktur der Host-Guest-Komplexe mit der „leeren“ Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms [Löwe et al. 1995] zeigen die Massenzentren der Sekundärstrukturelemente von Untereinheiten eine Verschiebung zueinander [Best, persönliche Korrespondenz]. Dies resultiert in einer veränderten Ausrichtung der Untereinheiten zueinander, wie sie auch bei einem Vergleich von der „leeren“ Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms mit der elektronenmikroskopischen Struktur des menschlichen 26S Proteasoms [Fonesca et al. 2008] gezeigt werden konnte. Die Autoren spekulieren, dass auf Grund dessen die Interaktionen zwischen den Untereinheiten verringert werden und die damit verbundene Interaktionsenergie reduziert wird. Der Verlust an Interaktionsenergie könnte durch die Wechselwirkung des 20S Proteasoms mit den 19S-Kappenkomplexen ausgeglichen werden, so dass die Reaktion insgesamt begünstigt ist.

Über rasterkraftmikroskopische Messungen konnte eine Kraft bei Interaktion von Substrat mit Proteasom-Innenen nachgewiesen werden, die auf einen gerichteten Transport von Substratmolekülen im 20S Proteasom hindeutet [Classen, persönliche Korrespondenz]. Wenn ein gerichteter Transport existiert, würde dies bedeuten, dass die Substrattranslokation nicht alleine auf freien Diffusionsvorgängen im Inneren des 20S Proteasoms beruht und der Substrattranslokation ein Mechanismus zugrunde liegen muss. Basierend auf den beschriebenen Untersuchungen wurden deshalb einerseits versucht, die Substratverteilung im 20S Proteasom zu visualisieren. Des Weiteren wurde untersucht, eine erhöhte oder verringerte Flexibilität der Kontaktflächen von Untereinheiten einen Einfluß auf die Substrattranslokation haben.

Um die Substratverteilung im 20S Proteasom zu visualisieren, wurden zwei unterschiedliche Lösungsansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurden Fluoreszenz-untersuchungen an Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene in einer Kooperation mit der Gruppe von R. Guckenberger durchgeführt (siehe 3.4.1), im zweiten Ansatz wurden 20S Proteasom – α -Synuclein Hybridproteine (siehe 3.4.2) exprimiert und aufgereinigt. Diese sollten im Weiteren über NMR-Studien in Kooperation mit der Gruppe von L. Kay untersucht werden.

Die Bedeutung der Kontaktflächen von Untereinheiten für den Translokationsmechanismus wurde über eine Mutationsanalyse untersucht (siehe 3.5). Im Rahmen der Mutationsanalyse wurden zunächst sämtliche auf Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten liegende Aminosäuren in der Host-Guest-Komplex-Röntgenkristallstruktur und deren Interaktionen in einer Kooperation mit C. Best computergestützt über Chimeria identifiziert. Im Anschluß wurde eine Mutation bei jeweils einem der auf der Kontaktfläche liegenden Interaktionspartner eingeführt und das Translokationsverhalten der exprimierten und aufgereinigten Mutanten mit Hilfe fluoreszenzbasierter Aktivitätsstudien untersucht (siehe 3.5.2).

Der Einfluß einer Versteifung der Struktur durch kovalente Bindung der Untereinheiten aneinander auf das Translokationsverhalten wurde ebenfalls über eine Mutationsanalyse (siehe 3.6) untersucht. Dazu wurden zunächst in einer Kooperation mit C. Best alle $C\alpha$ - $C\alpha$ Abstände sämtlicher Aminosäuren des 20S Proteasoms computergestützt mit Hilfe des Programms Chimera ermittelt und die Aminosäuren zweier verschiedener Untereinheiten mit den geringsten Abständen zueinander für eine Cysteinmutation ausgewählt. Nach Expression und Reinigung wurden die Mutanten sowohl durch massenspektrometrische Untersuchungen als auch durch fluoreszenzbasierte Aktivitätsstudien näher charakterisiert (3.6).

Für sämtliche Studien wurden zunächst die in Tab. 5.1 im Anhang angegebenen Konstrukte auf molekularbiologischer Ebene in der Gruppe von Dr. Witt generiert (siehe Abschnitt 3.2.) und im Weiteren exprimiert und gereinigt (siehe Abschnitt 3.3.). Der Arbeitsablauf zur Herstellung der benötigten Proteine ist in Abbildung 3.1.1 schematisch dargestellt.

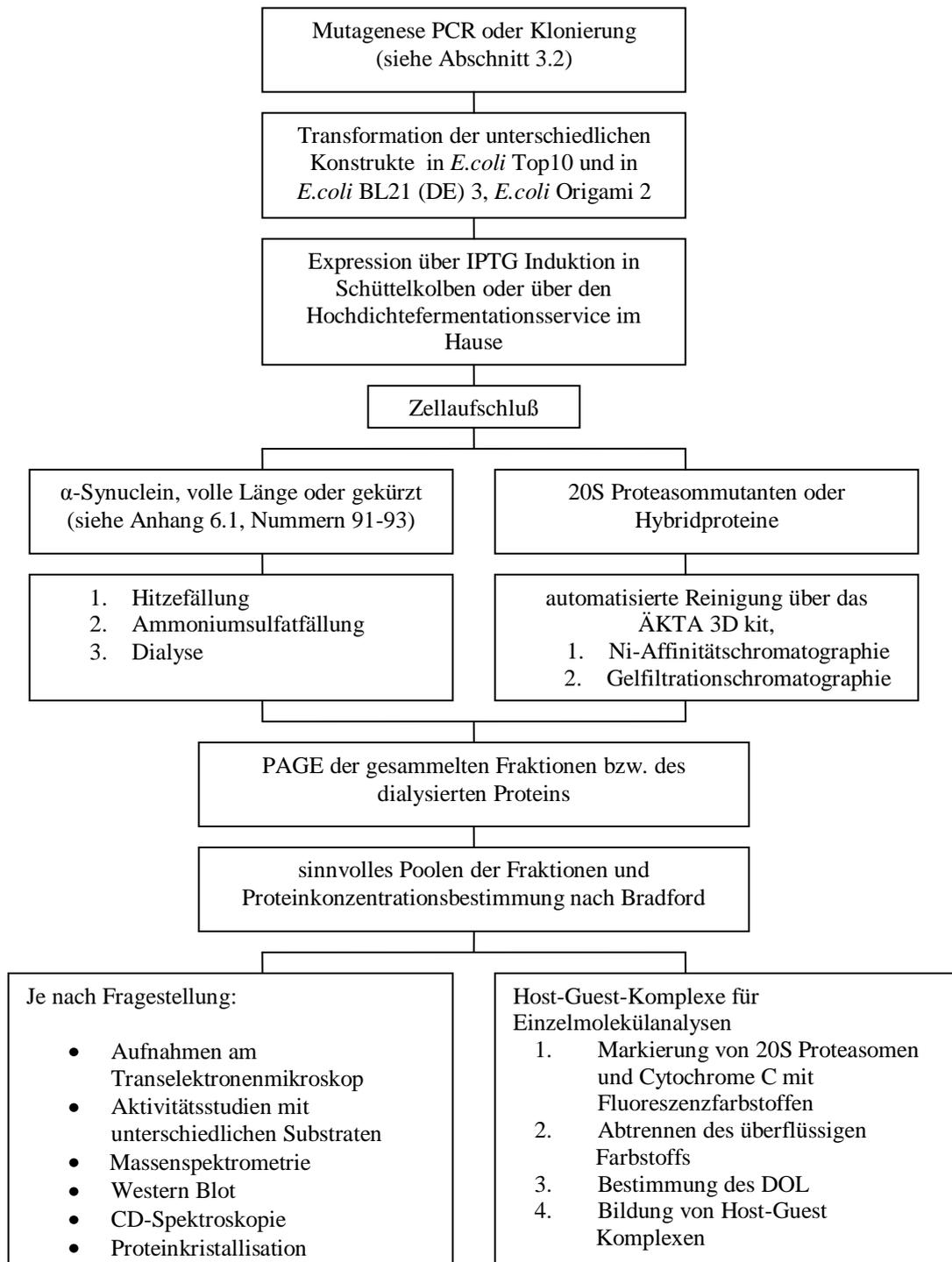


Abb. 3.1.1: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs zur Herstellung der im Rahmen der Arbeit benötigten Proteine in Form eines Flussdiagramms

Im Folgenden werden zunächst in den Abschnitten 3.2 und 3.3. die Ergebnisse der molekularbiologischen Arbeiten und die Ergebnisse der Proteinexpression und -reinigung dargestellt. Der weitere Ergebnisteil ist anhand der entsprechenden Fragestellung aufgegliedert. Der Abschnitt 3.4. beschäftigt sich mit den Ergebnissen zu Untersuchung der Substratverteilung im 20S Proteasom, Abschnitt 3.5. mit den Ergebnissen zu Untersuchungen

der Kontaktflächen und Abschnitt 3.6 mit Ergebnissen zu Untersuchungen der Versteifung der Struktur.

3.2. Ergebnisse molekularbiologischer Arbeiten

3.2.1. Mutagenese-PCR

Zunächst wurden Mutagenese-PCRs wie in 2.2.3 angegeben durchgeführt, um Strukturgene wie gewünscht zu verändern. Alle in der Gruppe von Dr. Witt durch Mutagenese-PCR generierten Konstrukte sind in Tabelle 5.1 im Anhang aufgeführt.

3.2.2. Klonierung

Zur Herstellung der in 3.4.2 benötigten Hybridproteine aus α -Synuclein und dem 20S Proteasom wurden zunächst aus der Plasmid-DNA Nummer 91 aus Tabelle 5.1 im Anhang spezifisch die Strukturgene für α -Synuclein unter Einführung einer NdeI-Schnittstelle vor dem Strukturgen und einer KasI-Schnittstelle nach dem Strukturgen in einer PCR (siehe 2.2.3) amplifiziert. Das Produkt der Amplifikation (Insert) wurde mit NdeI und KasI (siehe 2.2.5) verdaut. In den Zielvektor (siehe Tabelle 5.1, Plasmid Nummer 1 im Anhang) wurde über eine Mutagenese-PCR eine NdeI und eine KasI Schnittstelle eingebracht (siehe 3.2.1) und der Vektor ebenfalls mit NdeI und KasI verdaut. Im Anschluß wurde das Insert in den Zielvektor eingebaut (siehe 2.2.7). Die verschiedenen α -Synuclein / 20S Proteasom Konstrukte sind in Tab. 5.1 im Anhang aufgelistet.

3.3. Proteinexpression und Reinigung

3.3.1. Expression und Reinigung von 20S Proteasommutanten und Hybridproteinen

Aufgrund der Analogie in der Expression und Reinigung der gewählten 20S Proteasommutanten und Hybridproteine wird im Folgenden exemplarisch die Expression und Reinigung der 20S Proteasommutante S95A Q98A E99A gezeigt.

Um die verschiedenen 20S Proteasommutanten und Hybridproteine des 20S Proteasoms zu exprimieren, wurde wie in Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben verfahren. Aus den Schüttelkulturen (6 l) wurden durchschnittlich 7 g Bakteriensediment erhalten, aus den

Hochdichtefermentationen (1 l) wurden durchschnittlich etwa 20 g Bakteriensediment erhalten. Zur Reinigung der rekombinanten Proteine wurden die Zellen aufgeschlossen (siehe 2.3.2) und die Überstände der Zentrifugation zur automatisierten Reinigung an das Äkta Explorer kit angeschlossen (siehe 2.3.3). In Abb. 3.3.1.1 ist ein Gelfiltrationschromatogramm der Mutante S95A Q98A E99A von einem Äkta Explorer kit Lauf gezeigt.

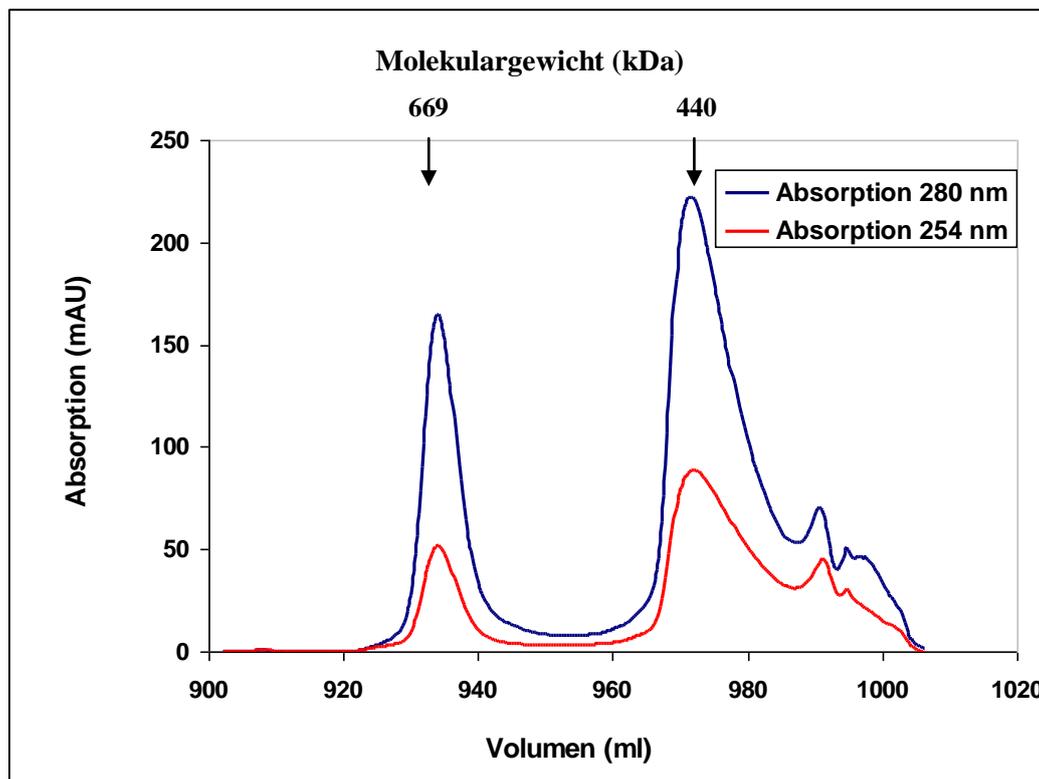


Abb. 3.3.1.1: Ausschnitt aus dem Gelfiltrationschromatogramm der Mutante S95A Q98A E99A. Der Bereich der Fraktionierung ist vergrößert dargestellt.

Das Verhältnis der beiden Absorptionspeaks zueinander ist je nach 20S Proteasommutante oder Hybridprotein unterschiedlich. Im Peak bei ~ 669 kDa konnten über EM-Aufnahmen und Polyacrylamidgelelektrophorese vollständig assemblierte 20S Proteasomen nachgewiesen werden, in den weiteren Peaks eluieren wahrscheinlich Assemblierungsintermediate und einzelne Untereinheiten, welche bei der gewählten Gelfiltrationssäule nicht einzeln isoliert werden können. Im Falle einzelner Hybridproteine (siehe Tab. 3.4.2.2) konnten keine vollständig assemblierten Proteasomen isoliert werden.

3.3.2. Expression und Reinigung von α -Synuclein

Um die verschiedenen α -Synuclein Mutanten (siehe Tab. 5.1 im Anhang, Nummern 91 bis 93) zu exprimieren, wurde wie in Kapitel 2.3.1.1. beschrieben vorgegangen. Um die Mutanten zu reinigen, wurde wie in den Kapiteln 2.3.2 und 2.3.5 beschrieben vorgegangen. Die Mutanten α -Synuclein *wt* und α -Synuclein aa 70-140 erwiesen sich als in Puffer löslich und wurden im Weiteren für Aktivitätsstudien eingesetzt (siehe Abb. 3.4.2.2).

3.4 Substratverteilung im 20S Proteasom

Obwohl Struktur und katalytischer Mechanismus des 20S Proteasoms bekannt sind, sind die Funktion und Funktionsweise der Hauptkammer und Vorkammern weitgehend unerforscht. Zur Funktion der Vorkammern gibt es bereits massenspektrometrische Analysen von Host-Guest-Komplexen [Sharon et al. 2006]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Vorkammern des 20S Proteasoms wahrscheinlich als Lagerräume für Substratmoleküle fungieren [Sharon et al. 2006], in denen Substrate vor der Degradation vorgelagert werden können. Ferner geht aus rasterkraftmikroskopischen Studien hervor, dass bei der Interaktion von Substratmolekülen mit dem Inneren von aktiven 20S Proteasomen Kräfte einer Größenordnung von 220 pN auftreten [Classen, persönliche Korrespondenz]. Dies deutet darauf hin, dass Substrate im 20S Proteasom nicht ausschließlich über Diffusionsvorgänge die aktiven Zentren erreichen, sondern ein gerichteter Transport in Richtung der Hauptkammer und aktiven Zentren existiert.

Im Falle einer diffusionsbestimmten Substrattranslokation wäre zu erwarten, dass Substratproteine zufällig im 20S Proteasom verteilt sind. Bei einem über Interaktionen zwischen Substrat und Proteasom gesteuertem Translokationsmechanismus wäre davon auszugehen, dass Substratmoleküle nicht zufällig im 20S Proteasom verteilt sind. Stattdessen ist anzunehmen, dass innerhalb der Kammern Orte mit größeren Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Substrates existieren.

Aus diesem Grund wurde in der hier vorgelegten Arbeit über zwei verschiedene Lösungsansätze versucht, die Substratverteilung im 20S Proteasom während der

Substrattranslokation zu visualisieren, um so Aussagen über den Weg des Substrates und somit über einen möglichen Translokationsmechanismus treffen zu können.

Im ersten Lösungsansatz wurden Fluoreszenzuntersuchungen von Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.1). Das Ziel der Untersuchungen war es, über FRET- (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) Messungen Aussagen über die Substratverteilung in den Kammern des 20S Proteasoms und den Weg zu den aktiven Zentren zu treffen.

Im zweiten Lösungsansatz wurden Hybridproteine von 20S Proteasomen und α -Synuclein hergestellt, die über NMR (Nuclear Magnetic Resonanz) untersucht werden sollten (siehe Kapitel 3.4.2). NMR Studien haben im Vergleich zu röntgenkristallographischen Studien den Vorteil, dass sie Bewegungen und statistische Verteilungen von flexiblen Elementen eines Proteins sowie dessen Struktur in Lösung abbilden können. Von den Hybridproteinen sollte in Kooperation mit der Gruppe von L. Kay eine quantitative Dynamik über NMR ermittelt werden. Quantitative Dynamiken des 20S Proteasoms über NMR konnten bereits in [Sprangers et al. 2007] erstellt werden. Dazu wurde ein Isotopen-Markierungsansatz gewählt, in dem Isoleucin, Leucin und die Methylgruppen von Valinen protoniert in einem ansonsten deuterierten Hintergrund vorliegen. Eine Abbildung der statistischen Verteilung des wahrscheinlich flexiblen α -Synuclein-Anteils im 20S Proteasom sollte eine Aussage über die Substratverteilung in den Kammern des 20S Proteasoms ermöglichen.

3.4.1 Fluoreszenzuntersuchungen von Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene

Um Fluoreszenzuntersuchungen von Host-Guest-Komplexen durchzuführen, wurden, wie in Kapitel 2.3.11 beschrieben, aktive und inhibierte 20S Proteasomen mit Alexa Fluor 488 und Cytochrom C mit Alexa Fluor 594 markiert. Diese Fluoreszenzfarbstoffe bilden ein FRET-Paar (siehe Kapitel 2.6.1). In Abb. 3.4.1.1 ist eine schematische Darstellung eines markierten Host-Guest-Komplexes gezeigt.

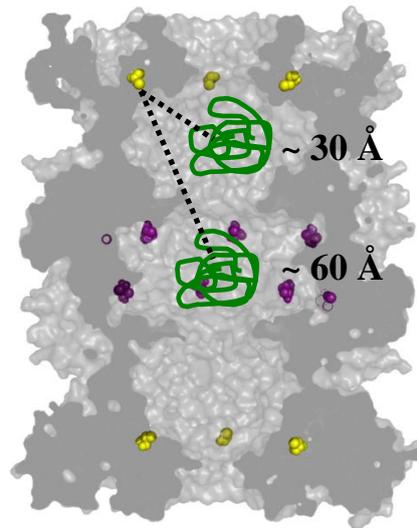


Abb. 3.4.1.1: Schematische Darstellung eines markierten Host-Guest-Komplexes mit ungefähren Abständen von Alexa 488 zur Mitte der Vor- bzw. Hauptkammer. Violett: aktive Zentren; gelb: Alexa488 markierte Cysteine; grün: Alexa 594 markiertes Cytochrom C

Für die 20S Proteasomproben wurde eine durchschnittliche Markierungseffizienz von 4,1 – 5,4 Farbstoffmolekülen (siehe Tab. 3.4.1.1) pro Proteasom gemessen, für Cytochrom C wurde einen Wert von 1,3 – 1,5 Farbstoffmolekülen (siehe Tab. 3.1) pro Cytochrom C gemessen (siehe Kapitel 2.3.8.1). Die maximal mögliche Markierungseffizienz würde im Falle der Proteasomen 14 Farbstoffmolekülen pro Proteasom entsprechen, im Falle von Cytochrom C 19 Farbstoffmolekülen pro Molekül.

Tab. 3.4.1.1: Ermittelte durchschnittliche Markierungseffizienzen (DOL) der für die Host-Guest-Komplexe Herstellung verwendeten markierten Proteine. *i* – inhibierte Proteasomen; *a* – aktive Proteasomen; Inkubationszeit mit Cytochrom C - 5' bzw. 30'

Probe	DOL 20S Proteasom	DOL Cytochrome C
<i>i</i> / 5'	5,4	1,4
<i>i</i> / 30'	5,4	1,5
<i>a</i> / 5'	4,1	1,3
<i>a</i> / 30'	5,4	1,4

Die markierten Host-Guest-Komplexe wurden in der Gruppe von R. Guckenberger nach Präparation auf Glas in Hepes Puffer pH 7,5 auf Einzelmolekülebene weiter untersucht (siehe 2.6.1). Dazu wurde ein konfokales Rasterfluoreszenzmikroskop benutzt. Exemplarisch sind in Abbildung 3.4.1.2 zwei der aufgenommenen Scans gezeigt. Markierte Proteine oder FRET-

Signale erscheinen in den Scans als Lichtflecke. Diese werden im Folgenden als Lichtpunkte bezeichnet. Im ersten Scan (siehe Abb. 3.4.1.2, A) wurde mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und in zwei verschiedenen Wellenlängenbereichen (520 nm – 580 nm: „gelber Kanal“; 590 nm – 690 nm: „roter Kanal“) detektiert. Über eine Intensitätsbestimmung im „gelben Kanal“ wurden die Donorpositionen bestimmt [Huth, Diplomarbeit]. Im „roten Kanal“ lässt sich überprüfen, ob Donor (20S Proteasom markiert mit Alexa 488) und Akzeptor (Cytochrom C markiert mit Alexa 594) ein FRET-Signal zeigen (siehe 2.6.1). Anschließend wurde bei einer Wellenlänge von 568 nm angeregt und wiederum im „roten Kanal“ detektiert. Hiermit werden alle Akzeptoren und damit Substrate erfasst. So lässt sich zusätzlich bestimmen, ob es Komplexe gibt, die zwar eine Kollokalisierung von Akzeptor und Donor zeigen, bei denen aber der Abstand zwischen Donor und Akzeptor zu groß ist, um ein detektierbares FRET-Signal zu ermöglichen.

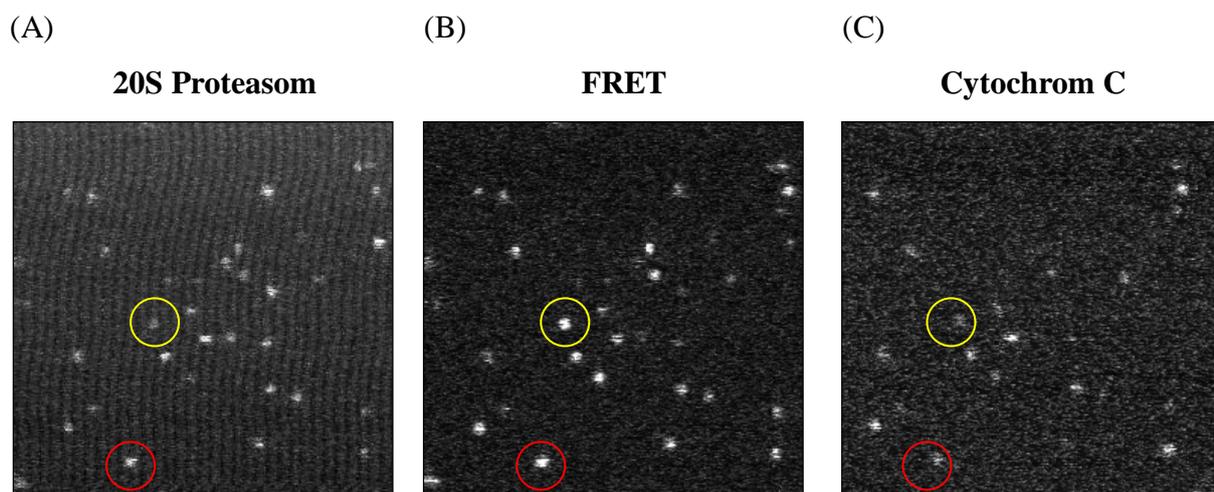


Abb. 3.4.1.2: Exemplarische Scans des konfokalen Rasterfluoreszenzmikroskops bei unterschiedlichen Anregungs- und Detektionswellenlängen. Als Probe wurden inaktive Proteasomen mit einer Inkubationszeit von 30' eingesetzt.

(A) Anregung bei 488 nm, Detektion im gelben Kanal (Lokalisation von 20S Proteasomen);

(B) Anregung bei 488 nm, Detektion im roten Kanal (Lokalisation von FRET-Signalen);

(C) Anregung bei 568 nm, Detektion im roten Kanal (Lokalisation von Cytochrom C)

Exemplarisch sind einzelne kolokalisierte Lichtpunkte mit farbigen Kreisen zur Identifikation in allen Scans markiert. Mit freundlicher Genehmigung von R. Guckenberger und F. Huth

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 3.4.1.2 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 3.4.1.2: Auswertung der Kolokalisations- und FRET Untersuchungen von Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene. *i* – inhibierte Proteasomen; *a* – aktive Proteasomen; Inkubationszeit mit Cytochrom C - 5' bzw. 30'

Probe	Anzahl der ausgewerteten Punkte	Kolokalisation mit direkter Akzeptoranregung (prozentualer Anteil)	Kolokalisation mit FRET (prozentuale Anteile)	Ohne Kolokalisation oder FRET (prozentualer Anteil)
i / 5'	661	82 % ± 4 % (von Spalte 2)	68 % (von Spalte 2) 84 % (von Spalte 3)	14 % (von Spalte 2)
i / 30'	456	73 % ± 5 % (von Spalte 2)	63 % (von Spalte 2) 87 % (von Spalte 3)	20 % (von Spalte 2)
a / 5'	699	64 % ± 4 % (von Spalte 2)	59 % (von Spalte 2) 92 % (von Spalte 3)	29 % (von Spalte 2)
a / 30'	288	66 % ± 6 % (von Spalte 2)	59 % (von Spalte 2) 89 % (von Spalte 3)	26 % (von Spalte 2)

Mit freundlicher Genehmigung von R. Guckenberger und F. Huth

Zusammenfassend kann man feststellen, dass 20S Proteasomen und Cytochrom C mit den Alexa Farbstoffen des FRET Paares Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 markiert und markierte Host-Guest-Komplexe mit inhibierten und aktiven Proteasomen hergestellt werden konnten. Alle Proben zeigten eine Kolokalisation von Akzeptor und Donor für 60% - 80% der insgesamt ausgewerteten Lichtpunkte (vergleiche Tabelle 3.4.1.2). Dabei zeigen die Proben *i/5'* und *i/30'* der inhibierten Proteasomen tendenziell einen größeren Anteil kolokalisierten Donoren und Akzeptoren als die aktiven Proteasomen. Insbesondere unterscheidet sich die Probe *i/5'* der inhibierten Proteasomen in ihrer ermittelten prozentualen Kolokalisationszahl signifikant von den Proben *a/5'* und *a/30'* der aktiven Proteasomen. Da aktive Proteasomen Cytochrom C degradieren können, ist es möglich, dass ein großer Anteil des in der Hauptkammer befindlichen Cytochrom C degradiert wurde, was dazu führen würde, dass die Werte für Kolokalisation von Proteasom und Cytochrom C sinken. Während in Probe *i/5'*

82% der gesamten ausgewerteten Lichtpunkte auch eine Kolokalisation zeigen, ist dies nur für 64% der Probe a/5' und 66 % der Lichtpunkte der Probe a/30' der Fall.

Die Probe a/5' zeigt mit 92 % im Vergleich zu den Proben i/5' und i/30' mit 92 % einen deutlich erhöhten prozentualen Anteil der Lichtpunkte mit Kolokalisation und FRET – Signal. Dies zeigt eine Tendenz zur stärkeren Belegung der Vorkammern von aktiven Proteasomen. Leider war es also auf Basis des gewählten Aufbaus nicht möglich, die Substratverteilung in den Kammern genauer zu analysieren und damit Aussagen über den Weg des Substrats im Proteasom zu treffen.

Um in zukünftigen Messungen genauere Aussagen treffen zu können, sollte ein anderes FRET Paar mit einem kleineren Försterradius gewählt werden. Das FRET Paar Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 hat einen Försterradius von etwa 6 nm, was bedeutet, dass Unterschiede in den Belegungen der Kammern nicht signifikant messbar sind und aus diesem Grund keine eindeutig unterschiedlichen Substratverteilungen für die verschiedenen Proben festgestellt werden konnten. Ein weiteres Problem stellt die statistische räumliche Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe bei den erreichten Markierungseffizienzen der 20S Proteasomproben dar. Im Rahmen der Auswertung wäre es von Vorteil, wenn entweder eine maximale Markierungseffizienz von 14 Farbstoffmolekülen pro Proteasom erreicht werden könnte oder jedes Proteasom genau ein Farbstoffmolekül tragen würde. Dies würde eine genauere Interpretation von FRET-Signalen bzw. Kolokalisationssignalen ohne FRET-Signale ermöglichen.

3.4.2 Untersuchung von Hybridproteinen des 20S Proteasoms und α -Synuclein

Im zweiten Lösungsansatz sollte die Substratverteilung im 20S Proteasom über Hybridproteine in NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) - Messungen untersucht werden. Die Hybridproteine für die NMR-Messungen bestehen jeweils aus dem 20S Proteasom und einem im hohlem Inneren des 20S Proteasoms befindlichen α -Synuclein Anteil (vergleiche Abb. 3.4.1). Die Vorkammern haben ein Volumen von $\sim 59 \text{ nm}^3$, die Hauptkammer hat ein Volumen von $\sim 84 \text{ nm}^3$. α -Synuclein hat in vollständig gestreckter Konformation (durchschnittliche Länge N-C $_{\alpha}$ -C-N = 0,35 nm) eine Länge von ungefähr 55 nm. Bei einem Kammerdurchmesser von rund 5 nm ist daher zu erwarten, dass auch ein partiell gefaltetes Synucleinmolekül die Kammer durchspannen kann.

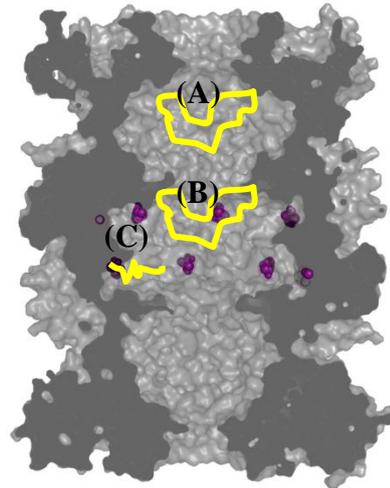


Abb. 3.4.2.1: Schematische Darstellung der Hybridproteine für die NMR-Messungen. In grau dargestellt ist ein Querschnitt durch die Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum*. Die aktiven Zentren sind violett markiert. In gelb ist schematisch α -Synuclein dargestellt. (A) zeigt ein Hybridprotein, in dem α -Synuclein sich in der Vorkammer des 20S Proteasoms befindet, (B) zeigt ein Hybridprotein, in dem α -Synuclein zwar in der Hauptkammer, aber nicht am aktiven Zentrum inseriert ist, und (C) zeigt ein Hybridprotein, in dem sich α -Synuclein in der Hauptkammer am aktiven Zentrum befindet.

Im Rahmen von NMR-Messungen sollte es bei getrennter Markierung von α - und β -Untereinheiten [Sprangers, 2007] möglich sein, die α -Synucleinanteile der Hybridproteine zu visualisieren. Da α -Synuclein ein natives Substrat des 20S Proteasoms ist [Liu 2003], gibt eine Visualisierung Hinweise auf die Substratverteilung im 20S Proteasom. Ein Nachteil der Untersuchung über Hybridproteine ist, dass die Substratverteilung nicht vollständig nativ ist, da α -Synuclein Teil der 20S Proteasomstruktur ist, und somit nicht frei diffundieren kann. Es sollte trotzdem möglich sein, bevorzugte Aufenthaltsorte zu identifizieren, sofern diese weit genug vom „Ankerpunkt“ im Hybridprotein entfernt sind.

3.4.2.1 Abbau von α -Synuclein durch das 20S Proteasom

Zunächst wurde überprüft, ob α -Synuclein *wt*, α -Synuclein aa 1-70 und α -Synuclein aa 70-140 durch das 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* abgebaut werden können. Dazu wurden die drei α -Synuclein Konstrukte exprimiert und gereinigt (siehe 2.3). α -Synuclein aa 1-70 erwies sich in den für die Isolation gewählten Puffern als nicht löslich. α -Synuclein *wt* und α -Synuclein aa 70-140 wurden in Verdauansätzen mit dem 20S Proteasom eingesetzt und Proben aus den Ansätzen über SDS PAGE analysiert. In Abb. 3.4.2.2. sind die PAGE Analysen des Verdauens der α -Synucleinkonstrukte gezeigt. Die Molekulargewichte der eingesetzten Proteine sind in Tab. 3.4.2.1 angegeben.

Tab. 3.4.2.1: Molekulargewichte der gereinigten Proteine in kDa. Die Abkürzung UE steht für Untereinheit.

Protein	Molekulargewicht
20S Proteasom (<i>Ta</i>)	α -UE: 27,4 kDa β -His ₆ -UE: 22,9 kDa
α -Synuclein <i>wt</i>	16,5 kDa
α -Synuclein aa 70 -140	10,6 kDa

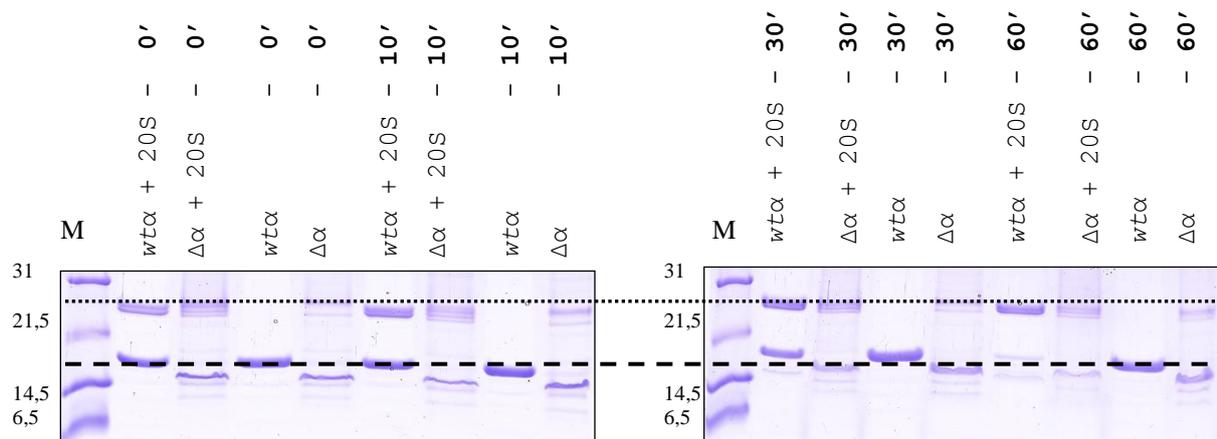


Abb. 3.4.2.2: SDS PAGE vom Verdau von α -Synuclein *wt* und α -Synuclein aa 70 -140 durch das 20S Proteasom bei 60°C (Coomassie Brilliant Blue Färbung). Proteinmenge pro Spur: 10 μ g α -synuclein, 2 μ g Proteasom; Verdauzeiten: 0', 10', 30' und 60' Minuten; Abkürzungen: M – Marker in kDa, *wt* α – *wt* α -Synuclein, $\Delta\alpha$ - α -Synuclein aa 70 -140, 20S – *wt* 20S Proteasom; gestrichelte Linie ~14,5 kDa; gepunktete Linie ~27 kDa (α - und β -Untereinheit Proteasom)

Die Proben des α -Synuclein *wt* Verdaus zeigen in der SDS PAGE einen Abbau durch das 20S Proteasom. Nach 30 Minuten ist etwa die Hälfte des ursprünglich eingesetzten α -Synuclein *wt* verdaut. Nach 60 Minuten ist im Rahmen der SDS PAGE Analyse kaum noch α -Synuclein *wt* nachzuweisen, in den Proben des α -Synuclein aa 70 -140 Verdaus hingegen konnte auch nach 60 Minuten kein Abbau nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass nur α -Synuclein *wt* ein Substrat des 20S Proteasoms ist, verkürzte Varianten aber nicht. Aus diesem Grund wäre die Insertion eines vollständigen α -Synuclein *wt* für die geplanten Hybridproteine (siehe Abb. 3.4.2.1) wünschenswert.

3.4.2.2 Expression und Reinigung von Hybridproteinen

Die in Tab. 5.1 im Anhang aufgeführten Hybridproteine wurden analog zu 20S Proteasommutanten exprimiert (siehe 2.3.1) und gereinigt (siehe 2.3.2 bis 2.3.4).

Um die Assemblierung der Proteasomanteile der Hybridproteine zu überprüfen, wurden diese über Native PAGE und EM-Aufnahmen untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tab. 3.4.2.2 zusammengefasst dargestellt.

Tab. 3.4.2.2: Ergebnisse zur Assemblierung der Proteasomanteile der Hybridproteine. Die Nummerierung ist analog zu Tab. 5.1 im Anhang. Die Assemblierung wurde durch Native PAGE und EM-Aufnahmen überprüft.

Nummer	Protein	Assemblierung
3	α -syn aa 1-10 T1A	vollständig assembliert
5	α -syn aa 1-30 T1A	nicht assembliert
7	α -syn aa 1-70 T1A	nicht assembliert
9	α -syn aa 1-140 T1A	nicht assembliert
11	α -syn aa 70-140 T1A	nicht assembliert
13	α -syn aa 100-140 T1A	nicht assembliert
15	α -syn aa 120-140 T1A	nicht assembliert
17	α -syn aa 130-140 T1A	halb und vollständig assembliert
33	α -syn β -loop	nicht assembliert
76	α -syn α -loop	halb und vollständig assembliert

Exemplarisch sind EM-Aufnahmen des Hybridproteins α -syn aa 1-10 T1A und des Hybridproteins α -syn α -loop in Negativkontrastierung mit Uranlyacetat (siehe 2.6.2) in Abb. 3.4.2.3 gezeigt.

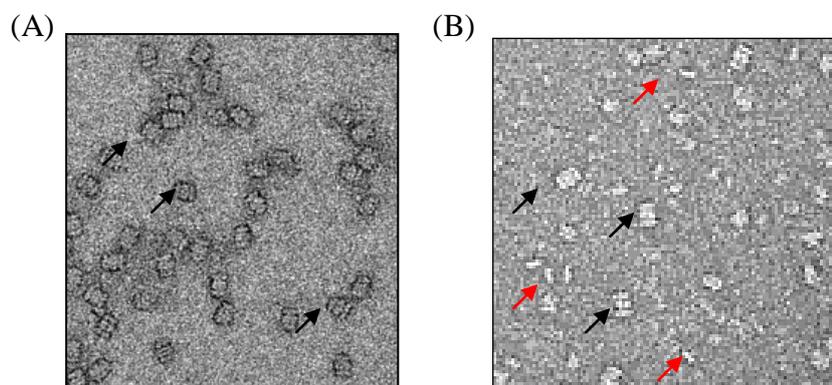


Abb. 3.4.2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Hybridproteine, Kontrastierung mit Uranylacetat, Vergrößerung 38000, Defocus -3600. (A) Mutante α -syn aa 1-10 T1A gezeigt. (B) Mutante α -syn α -loop. Ausgewählte vollständig assemblierte 20S Proteasomen sind mit schwarzen, ausgewählte wahrscheinlich teilweise assemblierte 20S Proteasome Untereinheiten sind mit roten Pfeilen markiert.

Wie aus Tab. 3.4.2.2 zu entnehmen, assemblierten die meisten der gereinigten Hybridproteine nicht. Die Fähigkeit für eine vollständige Assemblierung von α -Synuclein Hybridproteinen des 20S Proteasoms, in denen sich α -Synuclein in der Hauptkammer am aktiven Zentrum befindet, scheint mit der Verkürzung des α -Synucleinanteils zu zunehmen. Erst bei einem α -Synuclein Anteil von nur noch 10 Aminosäuren (siehe Tab. 3.4.2.2, Nummern 3 und 17) konnte eine vollständige oder teilweise Assemblierung über EM-Aufnahmen und Native PAGE nachgewiesen werden. Angesichts der Länge des Synucleinpolypeptids und der Kammergröße ist es nicht überraschend, dass der Einbau des Synucleins in die Proteasomenuntereinheiten mit der Faltung bzw. Assemblierung des Proteasoms interferiert. Da nur für unverkürztes α -Synuclein nachgewiesen werden konnte, dass dies ein Substrat des 20S Proteasoms ist, ist die Insertion eines vollständigen α -Synuclein *wt* in den Hybridproteinen wünschenswert. Das Hybridprotein α -syn α -loop erfüllt diese Voraussetzung und zeigt in den EM-Aufnahmen eine teilweise und vollständige Assemblierung. Aus diesem Grund wären NMR Messungen mit α -syn α -loop am sinnvollsten. Im Rahmen der NMR-Messungen müssten die α - und β -Untereinheiten des Proteasoms getrennt exprimiert werden, um eine Untereinheiten-spezifische Markierung zu gewährleisten. Deshalb wurden in allen bicystronischen Vektoren der Anteil der α - bzw. β -Untereinheit entfernt um eine getrennte Expression zu ermöglichen (siehe Tab. 5.1 im Anhang). Eine getrennte Expression hätte ferner den Vorteil, Untereinheiten mit und ohne α -Synucleinanteil in verschiedenen Mischungsverhältnissen in Assemblierungsansätzen verwenden zu können. Dies könnte die Assemblierung begünstigen, da im einzelnen 20S Proteasom weniger α -Synucleinanteile integriert werden müssten.

3.5 Einfluß der Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten auf die Substrattranslokation

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten für die Substrattranslokation untersucht werden. Die Annahme, dass diese in der Substrattranslokation eine Rolle spielen könnten, gründet auf einem Vergleich der „leeren“ Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms [Löwe et al. 1995] mit der Röntgenkristallstruktur von Host-Guest-Komplexen [Struktur: Felderer et al. 2008; Vergleich: Witt, persönliche Korrespondenz]. Die Sekundärstrukturelemente von Untereinheiten der beiden Strukturen zeigen eine Verschiebung zueinander [Best, persönliche Korrespondenz, siehe Abb. 3.5.0.1].

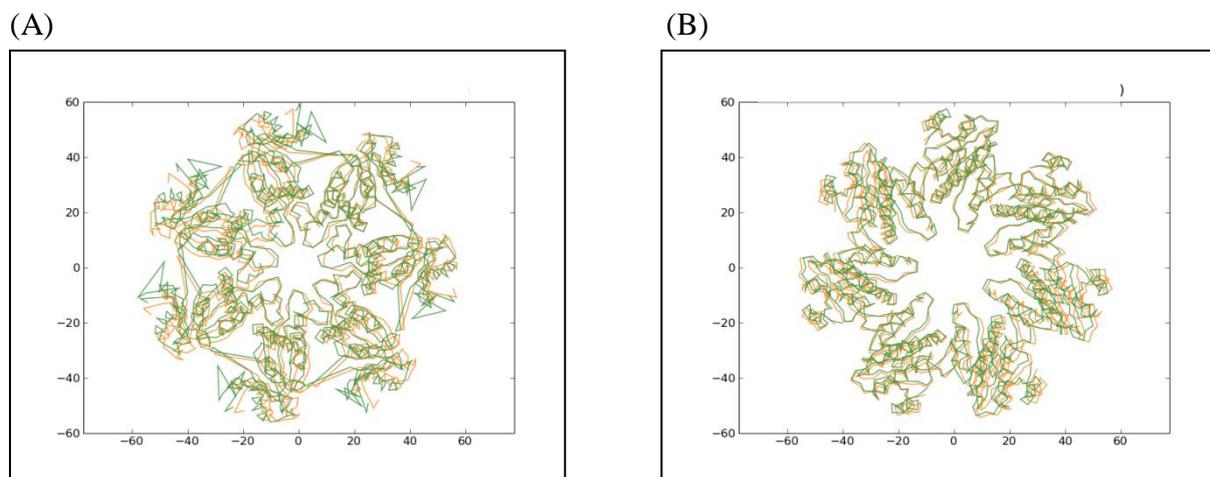


Abb. 3.5.0.1: Superposition des Aminosäurerückgrats der Untereinheiten aus der Röntgenkristallstruktur des „leeren“ 20S Proteasoms in orange und des Host-Guest-Komplexes in grün in Liniendarstellung. (A) Aufsicht der α -Untereinheit, (B) Aufsicht der β -Untereinheit. Verschiebungen zwischen den Untereinheiten des „leeren“ 20S Proteasoms und der Host-Guest-Komplex Röntgenkristallstruktur sind dreifach verstärkt dargestellt.

Die Massezentren der Sekundärstrukturelemente von α -Untereinheiten der Host-Guest-Komplex Röntgenkristallstruktur zeigen im Vergleich mit denen des „leeren“ 20S Proteasoms in Aufsicht eine Rotation. Die entsprechenden Zentren der β -Untereinheiten zeigen dagegen im Vergleich mit denen des „leeren“ 20S Proteasoms in Aufsicht eine zu der Symmetrieachse nach Innen gerichtete Verlagerung [persönliche Korrespondenz Witt, vergleiche Abb. 3.5.0.1]. Eine veränderte Ausrichtung der Untereinheiten zueinander bei Aufnahme von Substratproteinen würde eine Veränderung der Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten nahe legen. Deshalb wurden zunächst sämtliche auf Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten liegende Aminosäuren in der Host-Guest-Komplex-Röntgenkristallstruktur

und deren Interaktionen in einer Kooperation mit C. Best computergestützt mit Hilfe des Programms Chimera identifiziert (siehe Abb. 3.5.0.2 (B)). Von den Aminosäuren auf den Kontaktflächen wurden die zwischen den α -Untereinheiten und ebenso die zwischen den α - und β -Untereinheiten untersucht. Außerdem wurden einige Aminosäuren in räumlicher Nähe dieser Regionen sowie der Porenregion und auf der Oberfläche untersucht. Die Kontaktflächen zwischen diesen Untereinheiten sind in Abb. 3.5.0.2 dargestellt. Die Röntgenkristallstruktur des Host-Guest-Komplexes wurde mit freundlicher Genehmigung von S. Witt für Abbildungen zur Verfügung gestellt.

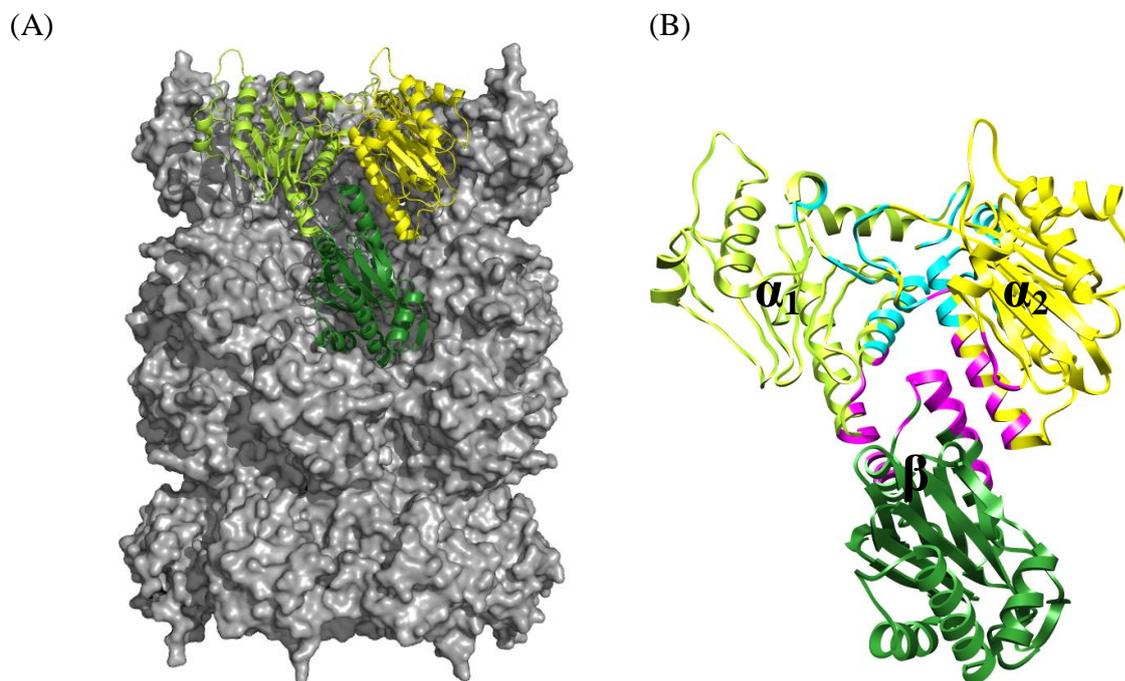


Abb. 3.5.0.2: Kontaktflächen zwischen den α -Untereinheiten sowie zwischen den α - und β -Untereinheiten der Röntgenkristallstruktur des Host-Guest-Komplex.

(A) Oberflächendarstellung der Röntgenkristallstruktur des 20S Proteasoms in grau, Cartoondarstellung einer ausgewählten α -Untereinheit in hellgrün, benachbarte α -Untereinheit in gelb sowie darunter liegende β -Untereinheit in dunkelgrün

(B) Isolierte, vergrößerte Darstellung der hervorgehobenen Untereinheiten. Die Kontaktflächen zwischen den α -Untereinheiten sind in cyan, die Kontaktflächen zwischen den α - und β -Untereinheiten in pink dargestellt. Um die Unterscheidung zwischen den Kontaktflächen zu vereinfachen, sind die α -Untereinheiten α_1 und α_2 nummeriert, diese Nummerierung wird im Folgenden beibehalten.

Die Bedeutung der ausgewählten Kontaktflächen der Untereinheiten für den Translokationsmechanismus wurde über eine Mutationsanalyse untersucht. Im Rahmen dieser Analyse wurde eine Mutation bei jeweils einem der auf der Kontaktfläche liegenden identifizierten Interaktionspartner eingeführt und das Translokationsverhalten der exprimierten und aufgereinigten Mutanten mit Hilfe fluoreszenzbasierter Aktivitätsstudien

untersucht (siehe Kapitel 3.5.2). Die auf den α - α Kontaktflächen liegenden Aminosäuren sowie deren zugehörige Interaktionspartner sind in Abb. 3.5.0.3 gezeigt. Die auf den α - β Kontaktflächen liegenden Aminosäuren sowie deren zugehörige Interaktionspartner sind in Abb. 3.5.0.4 gezeigt.

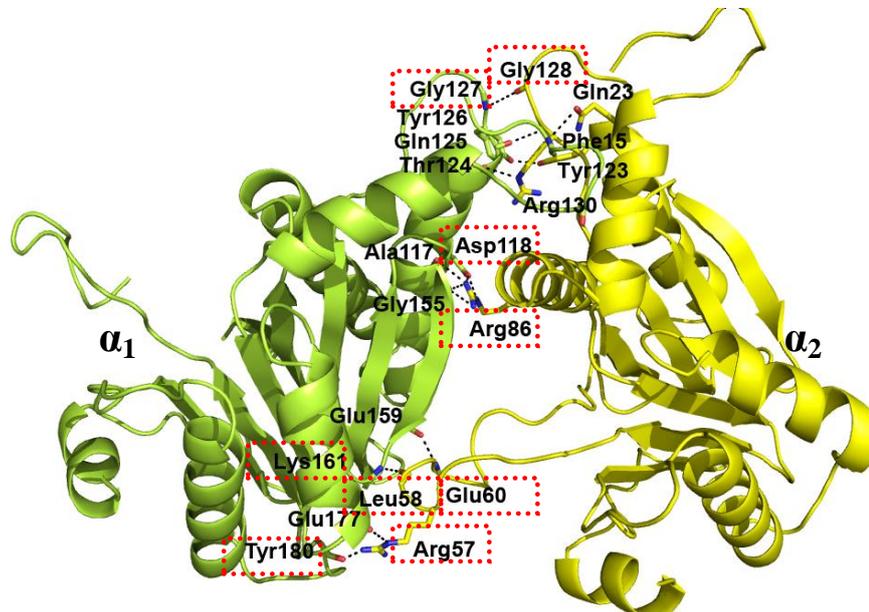


Abb. 3.5.0.3: Aminosäuren auf den α_1 - α_2 Kontaktflächen und deren zugehörige Interaktionspartner der Host-Guest-Komplex Röntgenkristallstruktur in Aufsicht. Ermittelte Interaktionen sind durch schwarz gestrichelte Linien gekennzeichnet. Aminosäuren die im Zuge der Mutationsanalyse modifiziert wurden sind mit roten Kästen markiert.

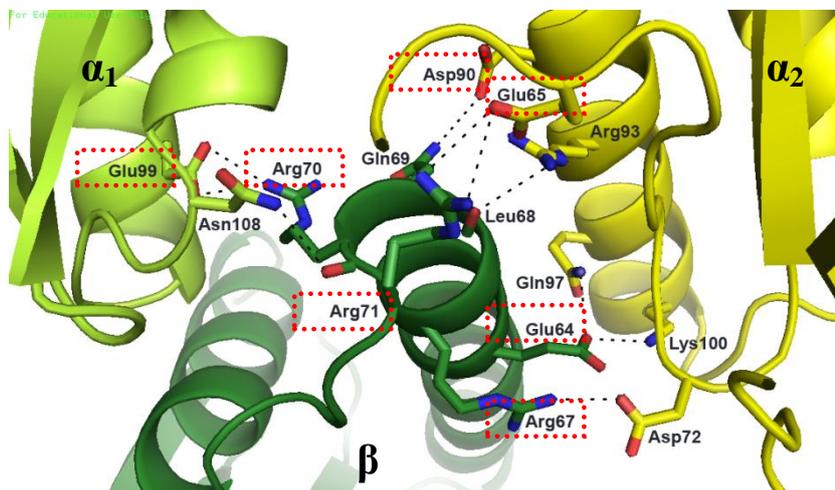


Abb. 3.5.0.4: Aminosäuren auf den α_1 - β , α_2 - β Kontaktflächen und deren zugehörige Interaktionspartner der Host-Guest-Komplex Röntgenkristallstruktur. Linien und Kästen wie in 3.5.0.3.

Die Abbildung 3.5.3 und 3.5.4 wurden von S. Witt erstellt und durch rote Kästen modifiziert. Detaillierte Darstellungen der Kontaktflächen sind in den Abbildungen 3.5.2.2 – 3.5.2.5 gezeigt.

3.5.1 Kinetische Analysen des *wt* 20S Proteasoms mit verschiedenen Substraten

Im Vorfeld der fluoreszenzbasierten Aktivitätsstudien mit den verschiedenen 20S Proteasommutanten wurden zunächst die enzymatischen Eigenschaften des *wt* 20S Proteasoms im gewählten Aufbau näher charakterisiert. Dabei wurden folgende Fragestellungen behandelt:

- Welchen Einfluß haben Temperatur und Salzkonzentration im hier gewählten Aufbau auf die proteolytische Aktivität des *wt* 20S Proteasoms?
- Werden die hier verwendeten verschiedenen Substrate unterschiedlich schnell prozessiert?

Aus früheren enzymatischen Analysen ist bereits bekannt, dass unterschiedliche Peptide [Dahlmann et al. 1989] sowie Casein und Insulin [Dahlmann et al. 1992] durch das *wt* 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* abgebaut werden können, ferner wurden für verschiedene Substrate pH- und Temperaturoptima sowie der Einfluß der bivalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die Proteolyse untersucht [Dahlmann et al. 1992]. Diese Studien wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter vertieft. Zunächst wurde der Einfluß von mono- und bivalenten Kationen und sowie der chaotropen Agentia Harnstoff und Guanidinhydrochlorid (GuHCl) auf die Proteolyse bei 37 °C und 60 °C ermittelt. Als Substrate wurden das Tetrapeptid Suc-LLVY-Amc in einer Konzentration von 25 µM und das Protein Bodipy FL-Casein in einer Konzentration von 0,5 µM eingesetzt (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5; Proteasomkonzentration in den Messungen mit: Suc-LLVY-Amc: 0,0071 µM, Bodipy FL Casein: 0,0285 µM). Die Ergebnisse der Messungen mit Suc-LLVY-Amc sind in Abb. 3.5.1.1 gezeigt, die Ergebnisse der Messungen mit Bodipy FL Casein sind in Abb. 3.5.1.2 gezeigt. Die angegebenen relativen Substratumsätze der Bodipy FL Casein Messungen beziehen sich ausschließlich auf die innerhalb einer Abbildung gezeigten Messdaten und können nicht absolut betrachtet werden. Eine absolute Bestimmung der Aktivitätswerte war nicht möglich, da zwar das relative Verhalten innerhalb von Messreihen, die auf einer Elisa Platte aufgenommen wurden, gleich ist, nicht aber die absoluten Messwerte nach Kalibrierung. Ein Grund hierfür könnte in unterschiedlichen Chargen Bodipy Casein mit unterschiedlichen Markierungsgraden liegen.

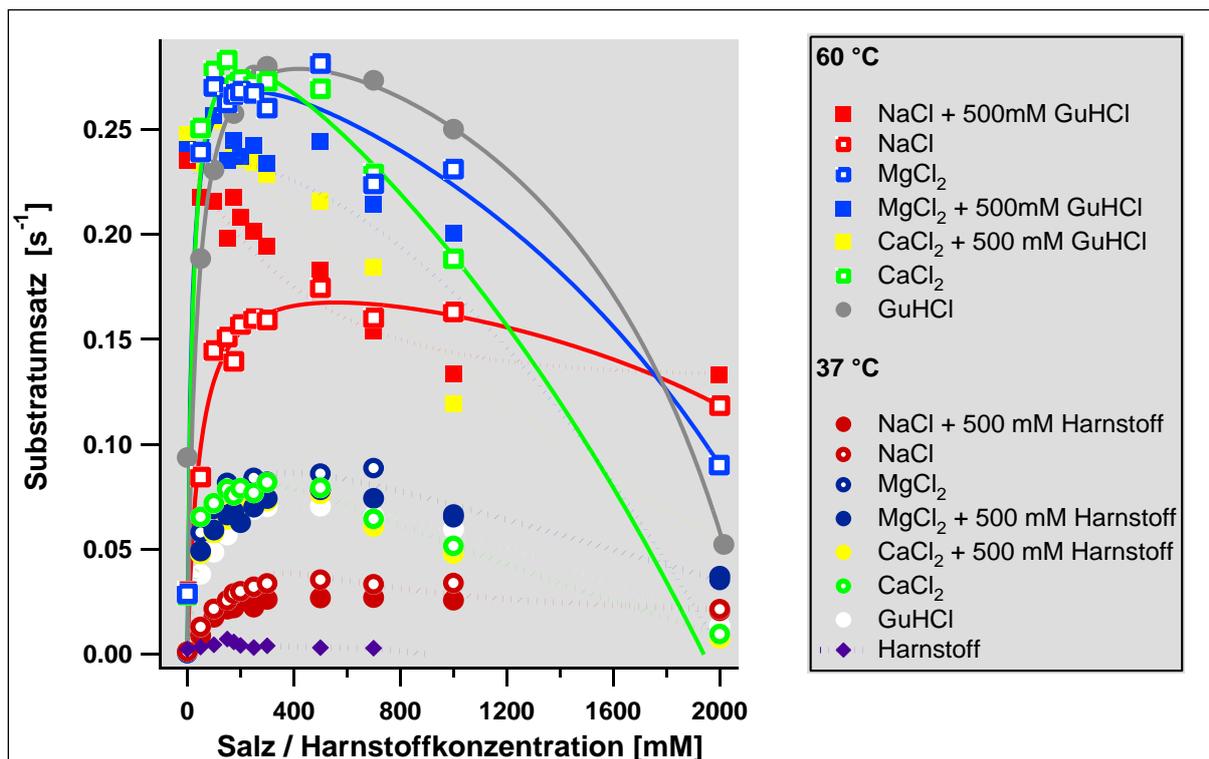


Abb. 3.5.1.1: Verdau von Suc-LLVY-A durch das wt 20S Proteasom in Abhängigkeit von Salzen und chaotropen Denaturanzien in 20 mM Hepes, pH 7,5.

Wie aus der Abb. 3.5.1.1 zu entnehmen ist, ist der Substratumsatz des Tetrapeptids Suc-LLVY-Amc für alle Messreihen temperaturabhängig und verdreifacht sich ungefähr bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C im Vergleich zu einer Reaktionstemperatur von 37 °C. Dieses Verhalten konnte auch in vorherigen Studien schon beobachtet werden [Dahlmann et al. 1992]. Bei der Zugabe von Harnstoff konnte im Gegensatz zu GuHCl kein beschleunigter Verdau von Suc-LLVY-Amc festgestellt werden. Der größte Substratumsatz in Abhängigkeit von der Kationen- und GuHCl-Konzentration wurde bei einer Salzkonzentration von etwa 300 mM gemessen. Dies trifft sowohl auf Messungen bei 37 °C als auch auf Messungen bei 60 °C zu. Bei zunehmenden Kationen- oder GuHCl-Konzentrationen fällt der Substratumsatz ab. In den Mischungen von Kationen mit jeweils 500 mM GuHCl / Harnstoff nimmt die Aktivität mit steigender Salzkonzentration ab. Das 20S Proteasom zeigt keine Ionenspezifität – sowohl Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} als auch das chaotrope Reagenz GuHCl haben eine Aktivitätssteigerende Wirkung. Für die Chloride der bivalenten Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} nimmt die Ionenstärke - gemäß der Formel: $I = 0,5 \times \sum c_i \times z_i^2$ (c_i = Ionenkonzentration, z_i = Ladung) - bei steigender Konzentration mit dem Faktor 3 gegenüber NaCl zu. Dies erklärt vermutlich, warum NaCl bei 300 – 1000 mM ein Aktivitätsplateau zeigt, während die Aktivitätswerte für MgCl_2 und CaCl_2 oberhalb von 400 mM deutlich abnehmen.

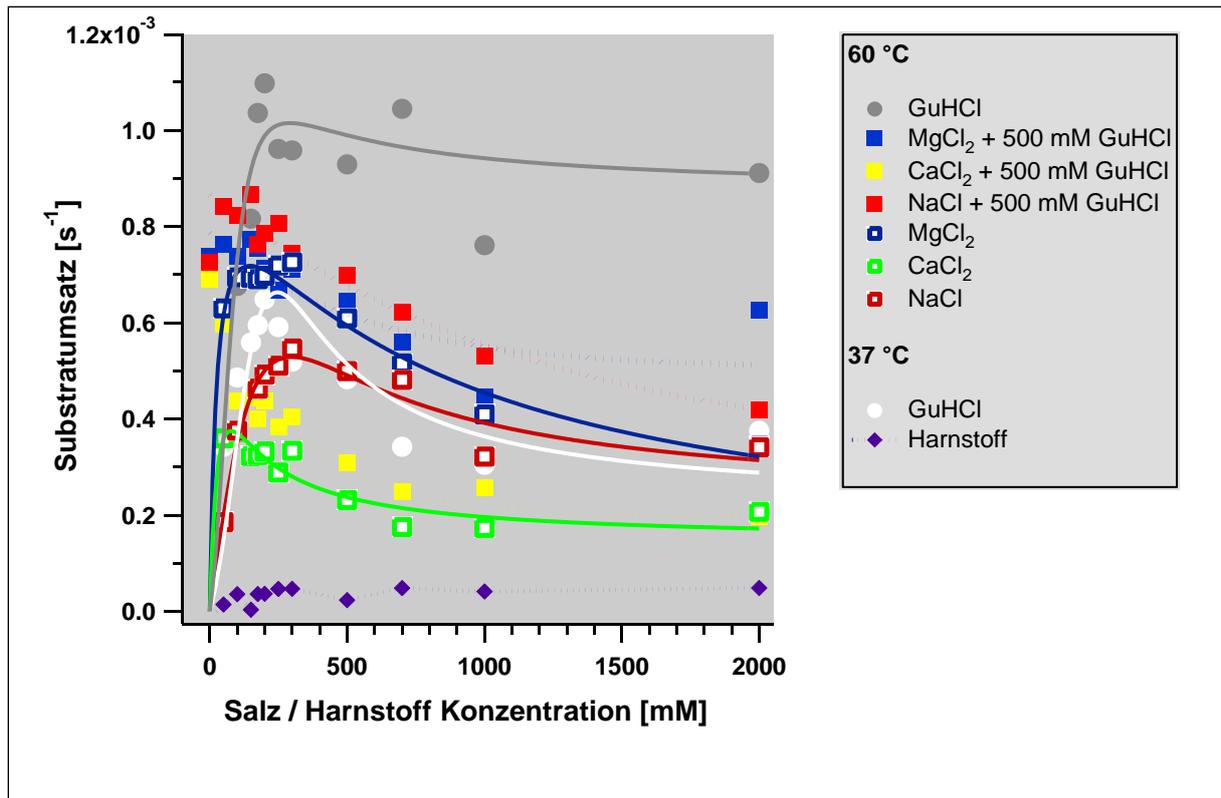


Abb. 3.5.1.2: Verdau von Bodipy FL Casein durch das wt 20S Proteasom in Abhängigkeit von Salzen und chaotropen Denaturanzien in 20 mM Hepes, pH 7,5.

Wie aus Abb. 3.5.1.2 zu entnehmen ist, wurde in den Messungen mit Bodipy FL Casein der größte Substratumsatz ebenfalls bei einer Salzkonzentration von etwa 300 mM gemessen. Bei zunehmenden Kationen- oder GuHCl-Konzentrationen fällt der Substratumsatz ab. In den Mischungen von Kationen mit jeweils 500 mM GuHCl / Harnstoff nimmt die Aktivität mit steigender Salzkonzentration ab. Der Substratumsatz von Bodipy FL Casein in Messreihen mit GuHCl ist temperaturabhängig und bei 60 °C ungefähr doppelt so groß wie bei 37 °C. Die Temperaturabhängigkeit des Substratumsatzes von [¹⁴C]-methyliertem Casein wurde schon von Dahlmann et al. (1992) untersucht. Bei der Zugabe von Harnstoff konnte im Gegensatz zu GuHCl keine wesentliche Erhöhung des Umsatzes von Bodipy FL Casein festgestellt werden. Wie schon für Suc-LLVY-Amc beobachtet, ist auch der Umsatz von Bodipy FL Casein von der Ionenstärke der Lösung abhängig. Dabei ist eine Ionenstärke von 300 mM – 1M optimal. Im Gegensatz zu den Messungen mit Suc-LLVY-Amc führt der Zusatz von bivalenten Kationen hier nicht zu einer höheren Aktivität als der Zusatz von monovalenten Kationen (Umsatz: $Mg^{2+} > Na^+ > Ca^{2+}$). Dieser Effekt könnte auf einer stabilisierenden Wirkung von Ca^{2+} auf Sekundärstrukturelemente des Caseins [Song et al. 1992] beruhen, auf Grund derer das Durchtreten durch die Pore erschwert sein könnte. Das 20S Proteasom kann mit wenigen Ausnahmen nur entfaltete Proteine abbauen [Liu et al. 2003]. Da sowohl

Harnstoff als auch GuHCl Proteinedenaturanzien sind, wurde in CD-spektroskopischen Messungen untersucht, ob Casein bei Zusatz der beiden Substanzen einen unterschiedlichen Entfaltungsgrad aufweist (siehe Abb. 3.5.1.3).

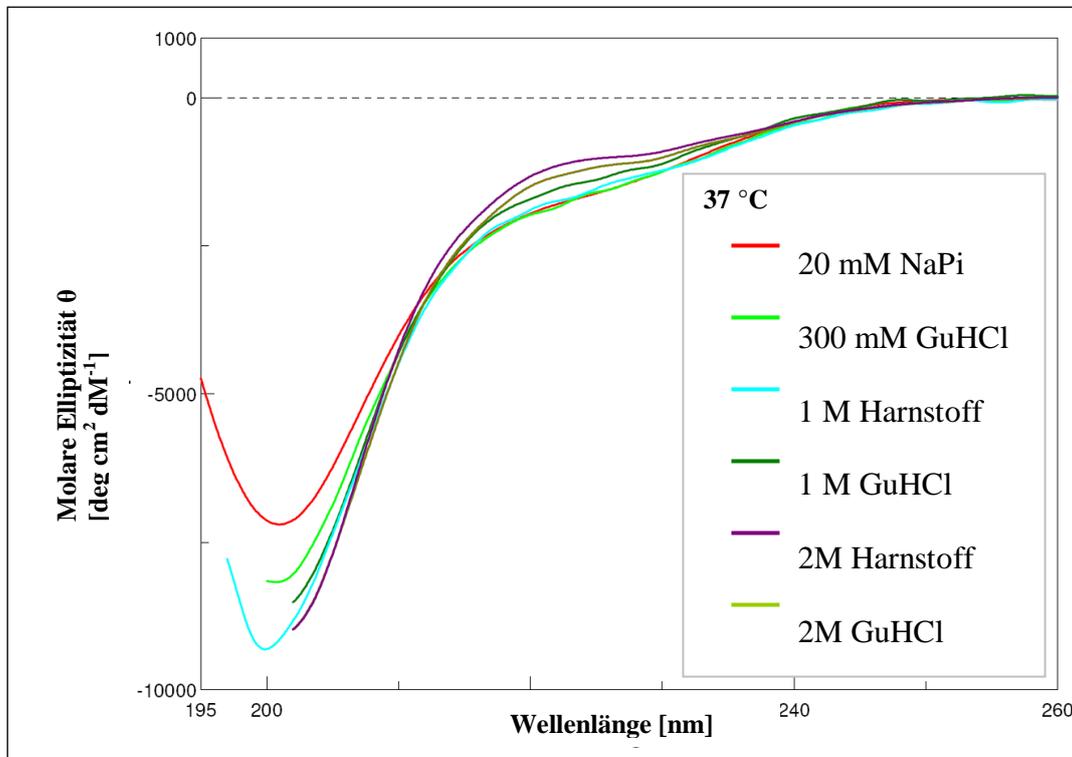


Abb. 3.5.1.3: CD Spektren von Casein (normiert und geglättet), alle in 20 mM NaPi-Puffer

Die CD-Spektren zeigen für die chaotropen Agenzien stärkere negative Elliptizitätswerte bei ca. 200 nm, die auf eine Zunahme des Gehalts an vollständig entfaltetem Protein hindeuten. Diese Messungen stehen in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen [Creamer et al. 1981; Graham et al. 1984], die einen 10 % α -helicalen und 15 % β -Faltblatt Anteile von Casein ohne chaotrope Agenzien zeigten aber. Der hohe Umsatz von Casein in GuHCl gründet damit wahrscheinlich sowohl auf einem unspezifischen Salzeffekt als auch auf einer zusätzlichen Entfaltung im chaotropen GuHCl.

Neben dem Einfluß von Temperatur und verschiedenen Salzen wurde auch untersucht, ob die hier verwendeten Substrate bei unterschiedlicher Substratkonzentration unterschiedlich schnell prozessiert werden. Es wurden Aktivitätsstudien bei verschiedenen Konzentrationen der Substrate Suc-LLVY-Amc, Mca-RPPGFSAFK-Dpn(OH) und Bodipy FL Casein bei 37°C und 60°C durchgeführt. In den Studien mit Bodipy FL Casein wurden Messungen in 2M GuHCl und ohne GuHCl durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.5.1.4 gezeigt.

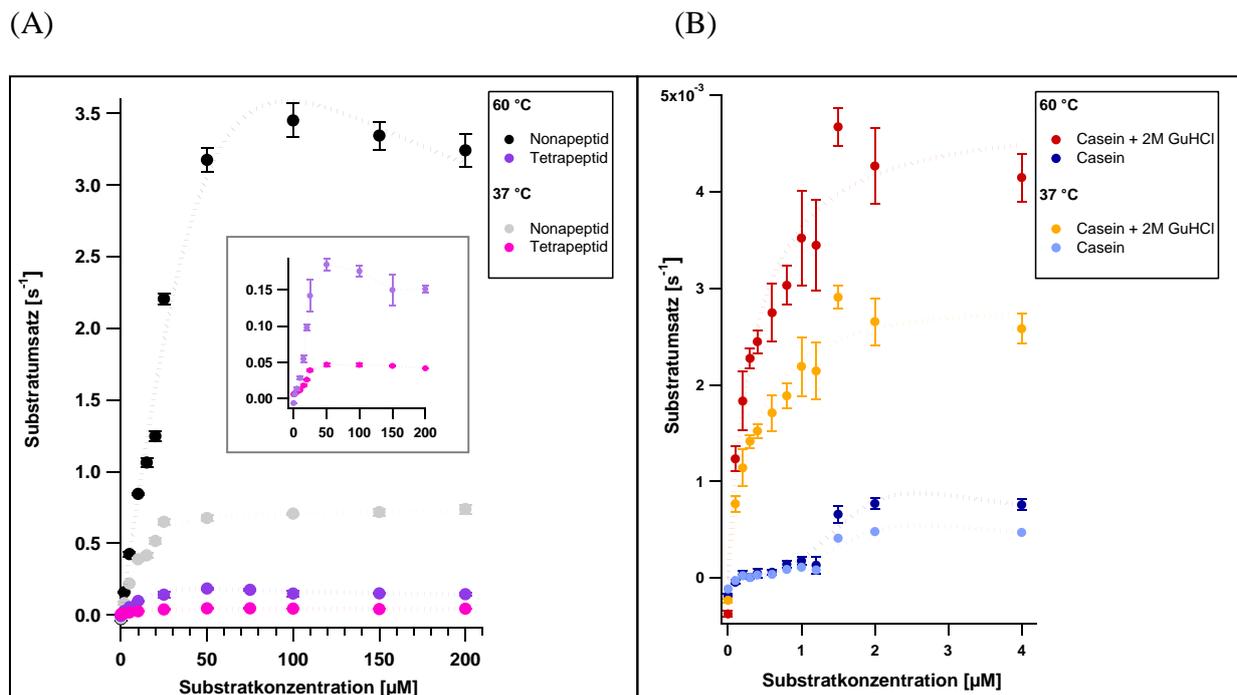


Abb. 3.5.1.4: Substratumsatz bei verschiedenen Substratkonzentrationen

(A) Substratumsatz von Suc-LLVY-Amc (Tetrapeptid) und Mca-RPPGFSAFK-Dpn(OH) (Nonapeptid) bei 37 °C und 60°C, Insert: Vergrößerte Abbildung des Substratumsatzes von Suc-LLVY-Amc, gleiche Achseneinheiten wie in der Ursprungsdarstellung

(B) Substratumsatz von Bodipy FL Casein, -/+ 2M GuHCl, bei 37 °C und 60 °C

Wie aus Abb. 3.5.1.4 zu entnehmen ist, bewirkt ein Temperaturanstieg von 37 °C auf 60 °C eine Beschleunigung des Substratumsatzes aller verwendeten Substrate. Für das Nonapeptid vervierfacht sich die Menge des umgesetzten Substrats bei 60 °C ungefähr, für das Tetrapeptid verdreifacht sich die Menge etwa.

In den Messungen mit Bodipy FL Casein führen sowohl ein Temperaturanstieg als auch eine Zugabe von 2M GuHCl zu einer Steigerung des Substratumsatzes. Dabei ist der Effekt des GuHCl stärker, insbesondere bei 60 °C. Eine Zugabe von 2 M GuHCl führt ungefähr zu einer Vervielfachung des Substratumsatzes im Verhältnis zu den Messungen ohne GuHCl. Eine Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 60 °C innerhalb der Messreihen mit 2 M GuHCl führt etwa zu einer Verdoppelung des Substratumsatzes.

Sowohl für das Nonapeptid als auch für das Tetrapeptid zeigt das 20S Proteasom bei hohen Substratkonzentrationen eine Substratinhibition. Für das Tetrapeptid wurde bei 37 °C und 60 °C eine Substratinhibition oberhalb einer Substratkonzentration von ~ 50 μM beobachtet, für das Nonapeptid ab einer Substratkonzentration von ~ 50 μM, bei 60 °C hingegen ab ~ 100 μM.

Das Nonapeptid wird in den fluoreszenzbasierten Aktivitätsstudien ungefähr 10mal so schnell abgebaut wie das Tetrapeptid (siehe Abb. 3.5.1.4). Dies steht in Einklang mit den Daten von Dolenc et al. (1998), die ebenfalls einen beschleunigten Abbau längerer Peptide zeigten. Das im Rahmen jener Studie prozessierte 14mer wurde etwa 18mal so schnell abgebaut wie ein korrespondierendes 12mer. In kompetitiven Abbaustudien wurde immer das längste in der equimolaren Mischung vorhandene Peptid bevorzugt abgebaut.

Um die Spaltstellen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substrate näher zu charakterisieren, wurden massenspektrometrische Untersuchungen der Degradationsprodukte durchgeführt (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.9).

Im Tetrapeptid konnte innerhalb der in den Aktivitätsstudien ausgewerteten Messzeiten (~ 40') bei 37 °C eine, im Nonapeptid konnten dagegen zwei Spaltstellen nachgewiesen werden (vergleiche Abb. 3.5.1.6).

- (A) Suc-LLVY↓-Amc
- (B) Mca-RPPGF↓SA↓FK-Dpn(OH)

Abb. 3.5.1.6: Durch massenspektrometrische Untersuchungen identifizierte Spaltstellen im Tetrapeptid (A) und im Nonapeptid (B). Identifizierte Spaltstellen sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die für das Tetrapeptid identifizierte Spaltstelle entspricht der zuvor in diesem Peptid identifizierten chymotrypsin-artigen Spaltstelle. Im Nonapeptid wird bevorzugt zwischen A und F gespalten, die Spaltung zwischen F und S wurde erst in Proben identifiziert, die ca. 4 Minuten verdaut worden waren.

In den fluoreszenzbasierten Aktivitätsstudien mit dem Nonapeptid kann nur eine einzige Spaltung detektiert werden, da die erste Spaltung im Peptid bereits zur Freisetzung des Fluorophors führt. Damit werden für das Tetrapeptid in den fluoreszenzbasierten Aktivitätsstudien alle Spaltereignisse detektiert, für das Nonapeptid aber nur die erste Spaltung.

Zur Charakterisierung von käuflich erworbenem Bodipy FL Casein und von Spaltstellen des 20S Proteasoms in Bodipy FL Casein wurde zunächst dessen Zusammensetzung durch eine massenspektrometrische Analyse untersucht. Die in einem Trypsin-Verdau von Bodipy FL Casein identifizierten Peptide konnten fünf verschiedenen Proteinen zugeordnet werden (siehe Tabelle 3.5.1.1). Für die β -Casein und α S1 Casein zugeordneten Peptide wurden die größten Intensitäten gemessen und die meisten unterschiedlichen Peptide gefunden.

Tab. 3.5.1.1: Proteine, von denen Peptidfragmente in der massenspektrometrischen Analyse des Bodipy FL Casein Verdaus identifiziert wurden. Identifikationsnummern: Swiss_Prot IDs

Proteine, Angabe der Identifikationsnummern
P02666 – β -Casein
P02662 – α -S1-Casein
P02668 – κ -Casein
NP_001071577 – Casein kinase 1 ϵ
P35507 – Casein kinase I isoform β

Zur Analyse der Spaltstellen wurden die beschriebenen Ansätze (siehe Material und Methoden 2.9) durchgeführt und massenspektrometrisch analysiert.

Obwohl eine Quantifizierung der MS-Daten im gewählten Versuchsaufbau nicht möglich ist, lässt sich auf Grund der Intensität der Massenpeaks aussagen, dass Bodipy FL Casein aus dem *Enz Chek kit* hauptsächlich aus β -Casein und α -S1-Casein besteht.

Die Anzahl der Spaltstellen in allen fünf Proteinen steigt von 22 auf insgesamt 120 nach 30 Minuten (siehe Anhang 5.5).

Setzt man voraus, dass jeder freigesetzte Farbstoff Bodipy FL detektiert werden kann, bedeutet dies, dass pro Caseinmolekül im Durchschnitt drei Farbstoffmoleküle (U.S. Patent No. 5,719,031; DOL = 3) und im Idealfall zwei Spaltungen im Aktivitätstest detektiert werden können. In den fluoreszenzbasierten Aktivitätsstudien mit Bodipy FL Casein werden damit in der gewählten Messzeit von 120 möglichen Spaltstellen maximal 2 Schnitte detektiert, in Messungen mit Mca-RPPGFSAFK-Dpn(OH) von 2 möglichen Spaltstellen maximal 1 Schnitt und für das Tetrapeptid alle Schnitte in der gewählten Messzeit.

3.5.2 Kinetische Analyse von 20S Proteasom-Mutationen an den Kontaktflächen

Die Bedeutung der Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten für die Substrattranslokation wurde durch Aktivitätsstudien von Proteasom-Mutationen untersucht. Zusätzlich wurden Mutationen in der Nähe der Kontaktflächen, an der Pore und an der Oberfläche untersucht. Dazu wurden zunächst sämtliche Mutanten (siehe Anhang, Tab. 6.1) wie in Kapitel 2.3 beschrieben exprimiert und gereinigt. Es wurden jeweils Sätze von ~ 20 Mutanten auf eine einheitliche Konzentration gebracht, die zusammen mit dem *wt* als Standard in den Aktivitätsstudien vermessen wurden. Die Proteasom-Konzentration der verschiedenen Sätze variierte zwischen 0,1 g/l - 0,66 g/l. Zur Überprüfung der Güte der Reinigung und Konzentrationsbestimmung wurden die verschiedenen 20S Proteasommутanten über SDS und Native PAGE analysiert (siehe 2.3.6). In Abb. 3.5.2.1 sind exemplarisch SDS und Native PAGE von einem Satz 20S Proteasommутanten und der zugehörigen *wt*-Probe gezeigt.

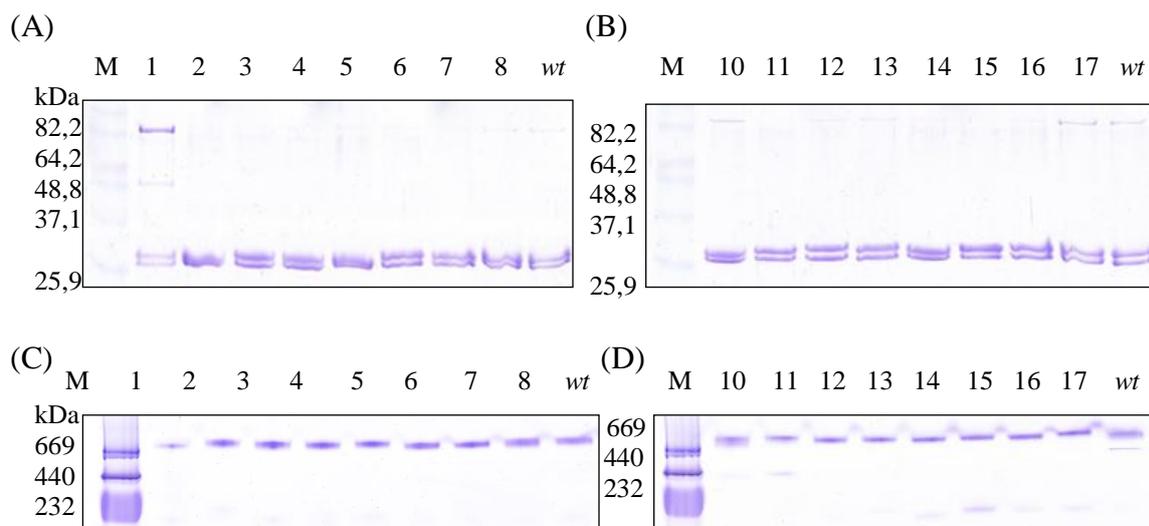


Abb. 3.5.2.1: SDS- und Native PAGE von einem Satz 20S Proteasommутanten und dem dazugehörigen *wt* Probe, Coomassie Brilliant Blue Färbung. Von den 20S Proteasommутanten und *wt* wurden 2 μ g pro Laufspur (nach Bradford) aufgetragen. (A) und (B): SDS-PAGE, (C) und (D): Native PAGE, Proteasommутanten sind dementsprechend gleich nummeriert. *Wt*: 9, 18; *M* – Marker (SDS PAGE: Invitrogen Benchmark Prestained Ladder, Native PAGE: High Molecular Weight Marker); 1: TIC; 2: S95A Q98A E99A; 3: R115A; 4: S95A Q98A E99A R115A; 5: G127A G128A; 6: G127F G128F; 7: S95A; 8: Q98A; 10: E99A; 11: E99Q; 12: Q98E; 13: R115K; 14: S95A R115A; 15: G127A; 16: G127F; 17: G128A

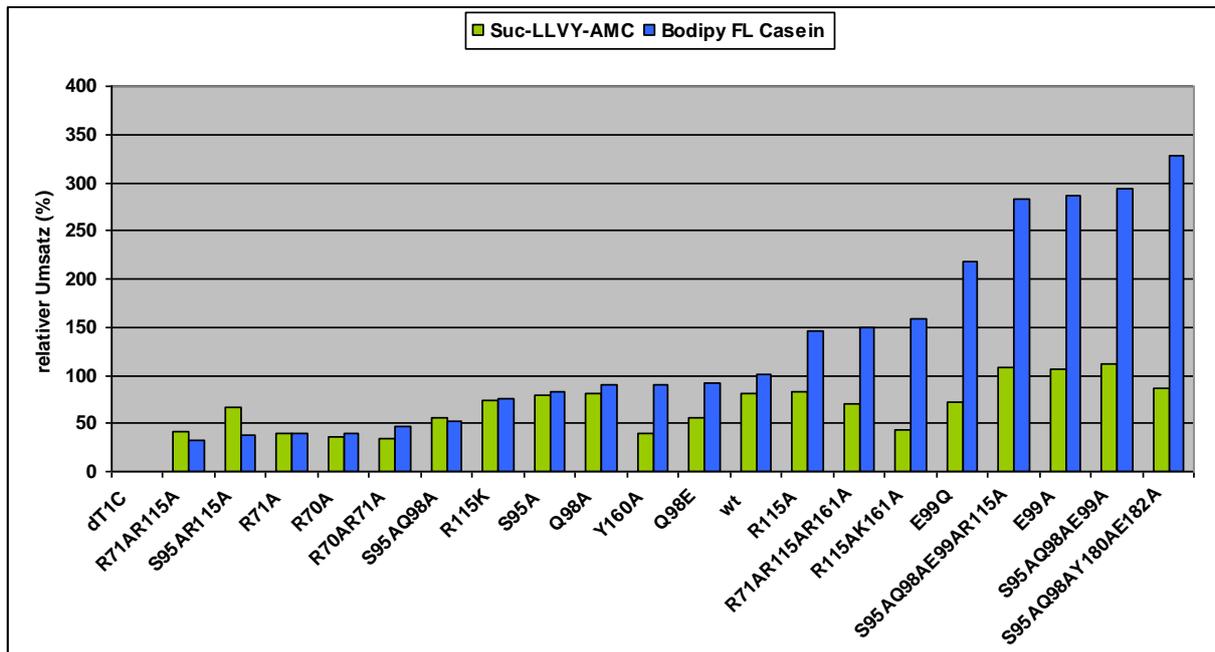
Die Proben der 20S Proteasommутanten zeigen in der SDS PAGE Banden auf der Höhe der α - und β -Untereinheiten (vergleiche Tab. 3.4.2.1). In der Probe TIC (Abb. 3.5.2.1, A, Spur1) sind Verunreinigungen bei ~ 82 kDa sowie Banden auf Höhe des Molekulargewichts der

Untereinheiten sichtbar. Diese Probe zeigt aber in der Native PAGE ebenso wie alle anderen Proteasommutanten Banden eines Molekulargewichts von vollständig assemblierten 20S Proteasomen. In manchen der Proben sind sehr schwache Banden auf Höhe eines Molekulargewichts von ~ 440 kDa und ~ 232 kDa zu erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Assemblierungsintermediate. Von allen Proteasommutanten wurden EM-Aufnahmen mit Negativkontrastierung angefertigt (hier nicht gezeigt). In den Aufnahmen waren ausschließlich vollständig assembliert 20S Proteasomen sichtbar.

Nachdem alle Sätze von Mutanten auf eine einheitliche Konzentration gebracht worden waren, wurden diese mit den Substraten Bodipy FL Casein in 2M GuHCl und Suc-LLVY-Amc, wie in Kapitel 2.9 beschrieben, vermessen. Die Ergebnisse der vergleichenden Messungen (normiert auf 100 % *wt* Umsatz) mit den 20S Proteasommutanten sind im Folgenden nach Kontaktflächen geordnet dargestellt. In Abb. 3.5.2.2 sind die Aktivitätsdaten zu den Mutationen der α_1 - β Kontaktfläche, in Abb. 3.5.2.3 die der α_2 - β Kontaktfläche dargestellt. Die Daten von Mutationen der α_1 – α_2 Kontaktfläche sind getrennt dargestellt, in Abb. 3.5.2.4 sind die der R86 und Porenregion, in Abb. 3.5.2.5 die der S2–S3 loop Region dargestellt. Zusätzliche Mutationen in Nähe zu einer Kontaktfläche wurden in den Abbildungen der jeweiligen Kontaktfläche zugeordnet.

Bei einem großen Teil der eingeführten Mutationen handelt es sich um Alaninmutationen. Diese wurden eingeführt, um Seitenketten aus den Kontaktflächen zu entfernen und so den Einfluß dieser Seitenkette auf den Substratumsatz und damit das Translokationsverhalten zu untersuchen. In allen im Folgenden gezeigten Messungen wurde Suc-LLVY-Amc in einer Konzentration von 25 μ M und Bodipy FL-Casein in einer Konzentration von 0,5 μ M eingesetzt (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.5; Proteasomkonzentration in den Messungen mit: Suc-LLVY-Amc: 0,0071 μ M, Bodipy FL Casein: 0,0285 μ M).

(A)



(B)

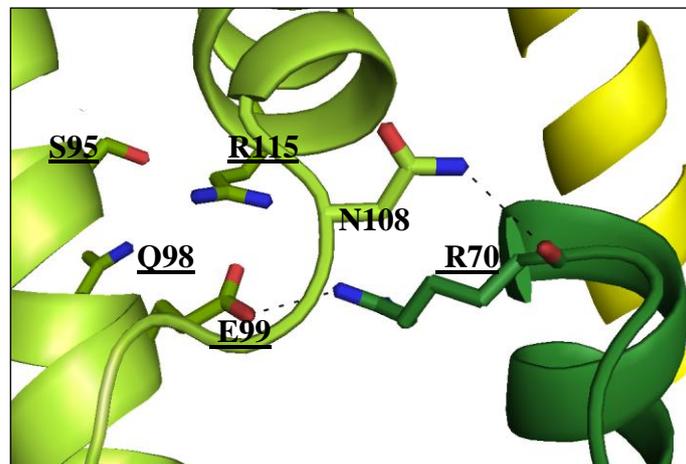
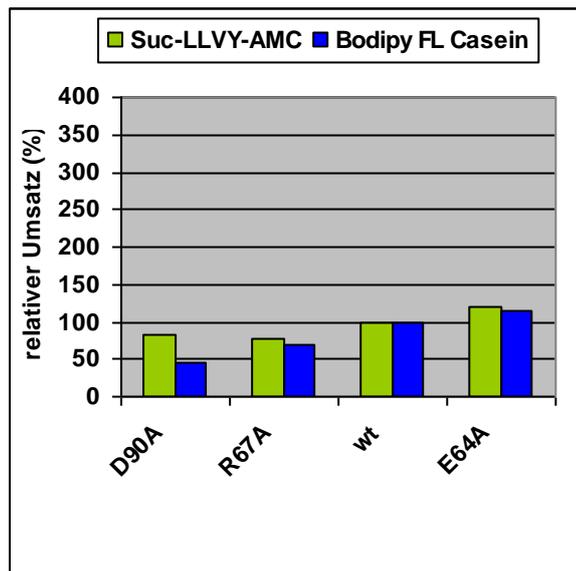


Abb. 3.5.2.2: Mutationen der α_1 - β Kontaktfläche und in deren Nähe (A) Relative Aktivität, geordnet nach Casein-Umsatzrate, wt = 100 % (B) Ausschnitt der α_1 - β Kontaktfläche, Mutationen in der Nähe der Kontaktfläche sind ebenfalls dargestellt (S95, Q98, R115). Mutierte Aminosäurereste sind unterstrichen, Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien eingezeichnet.

(A)



(B)

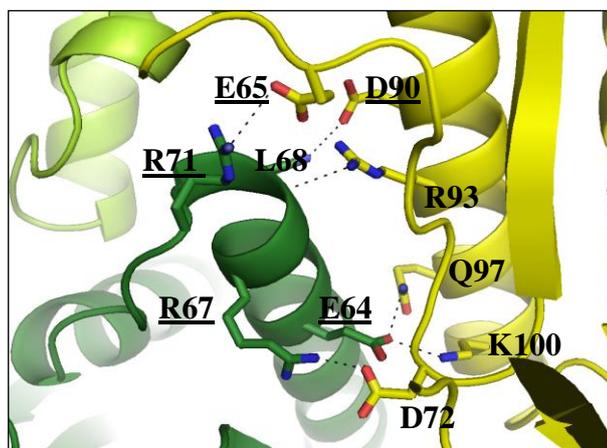
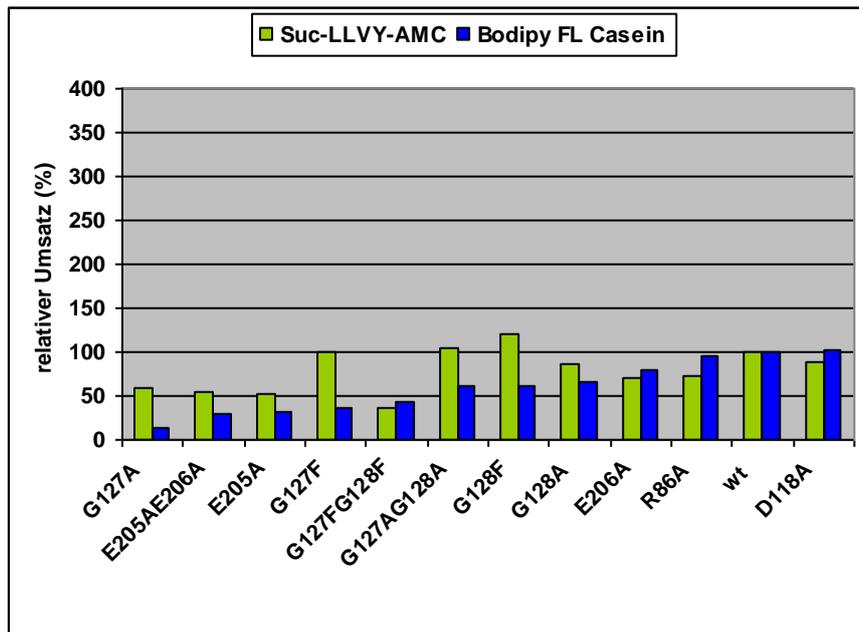
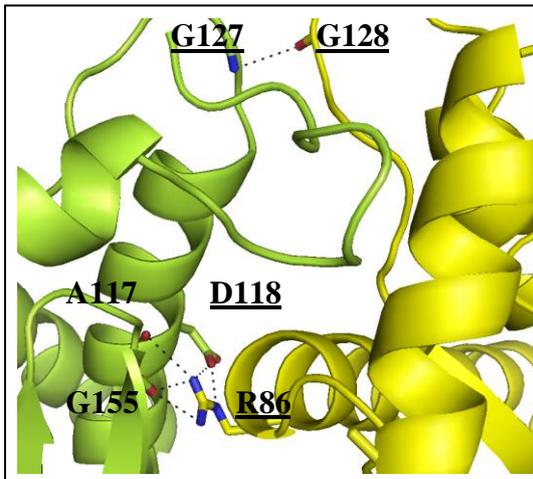


Abb. 3.5.2.3: Mutationen der α_2 - β Kontaktfläche (A) Relative Aktivität, geordnet nach Casein-Umsatzrate, wt = 100 % (B) Ausschnitt der α_2 - β Kontakt-fläche. Mutierte Aminosäurereste sind unterstrichen, Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien eingezeichnet. Die Messdaten zu R71 sind Abb. 3.5.5.2 (A), die zu E65 sind Abb. 3.5.2.5 zugeordnet.

(A)



(B)



(C)

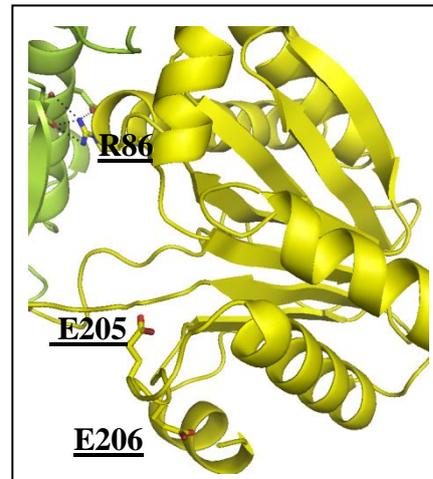
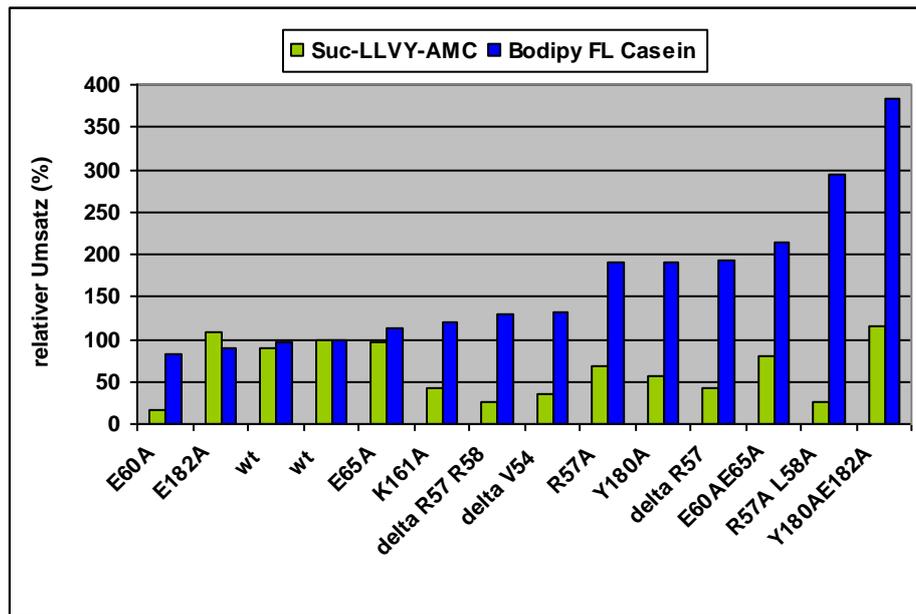


Abb. 3.5.2.4: Mutationen der R86 und Porenregion sowie der Oberflächen der zylindrischen Enden (E205 und E206). (A) Relative Aktivität, geordnet nach Casein-Umsatzrate, wt = 100%, (B) und (C) Ausschnitte der α_1 - α_2 Kontaktfläche. Mutierte Aminosäurereste sind unterstrichen, Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien eingezeichnet.

(A)



(B)

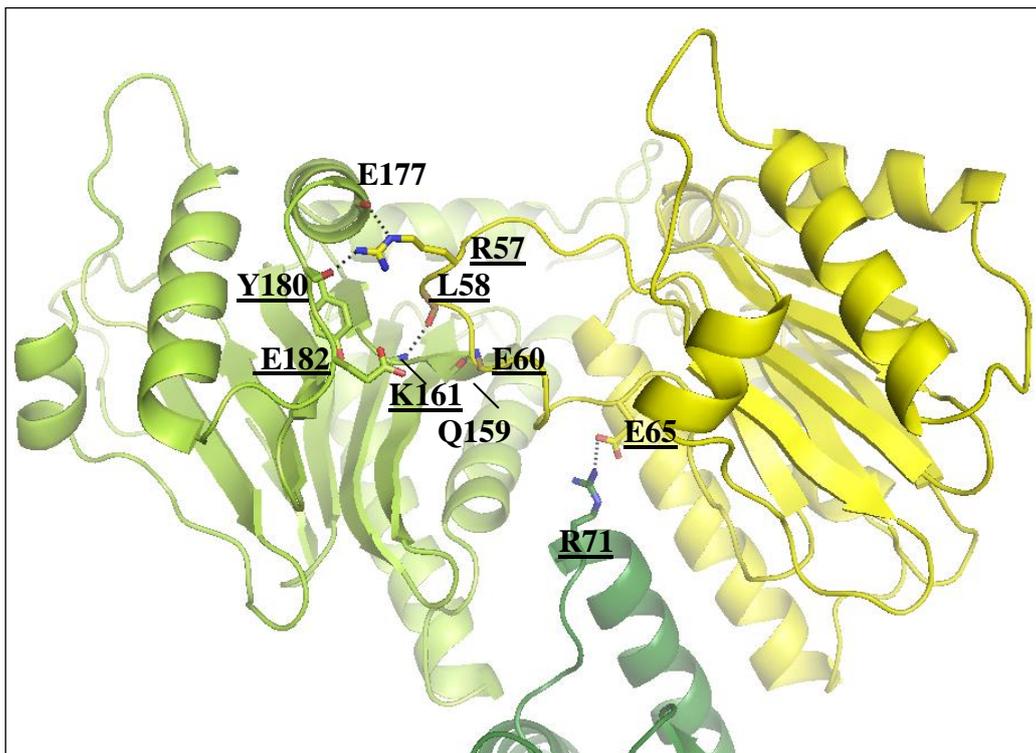


Abb. 3.5.2.5: Mutationen S2 –S3 loop Region und in deren Nähe. (A) Relativer Umsatz, geordnet nach Casein-Umsatzrate, wt = 100 % (B) Ausschnitte der α_1 - α_2 - β Kontaktfläche. Mutierte Aminosäurereste sind unterstrichen, Wasserstoffbrücken sind als schwarz gestrichelte Linien eingezeichnet. Die Messdaten zu R71 sind Abb. 3.5.5.2 (A) zugeordnet.

Alle Proteasommutanten, die einen prozentualen Substratumsatz unter 50% des *wt*-Umsatzes haben, wurden als signifikant weniger aktiv eingestuft, alle Proteasommutanten, die einen relativen prozentualen Substratumsatz von über 150% des *wt* Umsatzes haben, wurden als signifikant stärker aktiv eingestuft. Für die Messungen wurde ein maximaler Gesamtmessfehler von $\pm 35\%$ angenommen (Dieser Rahmen wurde gewählt, da sowohl die Konzentrationsbestimmung nach Bradford Schwankungen unterworfen ist, als auch im Rahmen der Messung Abweichungen innerhalb einer Probe mit dem gleichen Protein von $\sim 30\%$ festgestellt wurden). Ein signifikant geringerer oder größerer Umsatz wird im Folgenden als eine geringere oder größere Translokationseffizienz bezeichnet, da keine Veränderungen am aktiven Zentrum (mit Ausnahme der Mutante T1C) vorgenommen wurden. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass es aufgrund einer eingeführten Mutation zu geringfügigen strukturellen Veränderungen kommt, die durch die hier durchgeführten EM-Aufnahmen nicht detektiert werden können, aber Veränderungen am aktiven Zentrum verursachen. Die Wahrscheinlichkeit für solche Veränderungen ist aber relativ gering, da alle Mutationen nicht in der Nähe des aktiven Zentrum (kleinste Entfernung im Raum $\sim 2,7$ nm) oder auf Sekundärstrukturelementen, die das aktive Zentrum formen, liegen.

Im Folgenden werden die Mutanten in verschiedene Gruppen gegliedert, abhängig von ihrem relativem Umsatz in den Aktivitätsmessungen (siehe Tab. 3.5.2.1). Da die Mutanten der **Gruppe A** (siehe Tab. 3.5.2.1) alle einen *wt*-ähnlichen Substratumsatz zeigen, haben die eingeführten Mutationen anscheinend keinen Einfluß auf die Translokationseffizienz. Aus diesem Grund werden nur die Mutanten der Gruppen B, C und D – in dieser Reihenfolge - anschließenden diskutiert.

Tab. 3.5.2.1: Gliederung der Mutanten in Gruppen, abhängig von ihrem relativem Umsatz in den Aktivitätsmessungen (siehe Abb. 3.5.2.2- 3.5.2.5).

Gruppe	Aktivitätsmessung (Angaben bezogen auf den <i>wt</i>)	Kontaktfläche oder Nähe zur Kontaktfläche	Mutanten
A	<i>wt</i> -ähnlicher Umsatz für beide Substrate	α_1 - β	R115K / S95A / Q98A / Q98E / R115A / R71A R115A K161A
		α_2 - β	D90A / R67A / E64A
		R86 und Porenregion	G127A G128A / G128F / G128A / E206A / R86A
		S2-S3 loop Region	E182A / E65A / R57A
B	geringerer Umsatz für beide Substrate	α_1 - β	R71A R115A / R71A / R70A / R71A R70A
		Porenregion	G127F G128F
C	geringerer Umsatz für Substrat 1, <i>wt</i> -ähnlicher Umsatz für Substrat 2	α_1 - β	S95A R115A
		R86 und Porenregion	G127A / E205A E206A / E205A / G127F
		S2-S3 loop Region	E60A / K161A / Δ R57 R58 / Δ V54
D	größerer Umsatz für Bodipy FL Casein, geringerer oder <i>wt</i> -ähnlicher Umsatz für Suc-LLVY-Amc	α_1 - β	E99Q / S95A Q98A E99A R115A / E99A / S95A Q98A E99A / S95A Q98A Y180A E182A
		S2-S3 loop Region	Y180A / Δ R57 / E60A E65A / R57A L58A / Y180A E182

Von den Mutanten der **Gruppe B** wurden bei G127F G128F anstelle zweier Glyzine zwei große hydrophobe Aminosäureseitenketten direkt an der Pore eingeführt. Substrate müssen die Pore passieren, um ins Innere des 20S Proteasoms zum aktiven Zentrum zu gelangen. Es ist wahrscheinlich, dass sperrige Seitenketten in der Porenregion den Eintritt von Substrat ins Proteasom sterisch behindern. Dies würde den geringeren Substratumsatz erklären.

Die Aminosäuren R70 und R71 liegen auf der Spitze von der α -Helix der β -Untereinheit, die wie ein Keil zwischen den α -Untereinheiten liegt (vergleiche Abb. 3.5.4) und so die Kontaktflächen α_1 - β und α_2 - β bildet. Sämtliche Mutationen von R70 oder R71 (mit Ausnahme von R71A R115A K161A) führen zu einer Verringerung der Translokationseffizienz im Vergleich mit dem *wt*. Dabei scheint die Lage auf der „Keilspitze“ für die Translokation eine

besondere Rolle zu spielen, da keine der Mutationen entlang der Helix (α_2 - β Kontaktfläche) einen Einfluß auf die Translokationseffizienz zeigte.

Die Mutanten der **Gruppe C** zeigen unterschiedliche Translokationseffizienz für die beiden benutzten Substrate. Eine Klärung ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich.

Die Steigerung der Translokationseffizienz aller Mutanten der **Gruppe D** für Bodipy FL Casein ist besonders bemerkenswert.

In der Host-Guest-Komplex-Röntgenkristallstruktur besteht zwischen E99 und R70 eine Wasserstoffbrücke, und es ist anzunehmen, dass eine Mutation von einem der beiden beteiligten Bindungspartner zu Alanin den gleichen Einfluß auf die Translokationseffizienz hat, da die Wasserstoffbrücke nicht mehr ausgebildet werden kann. Wie in Abb. 3.5.2.2 dargestellt, ist dies aber nicht der Fall: Eine Mutation von E99 führt zur Verdoppelung, eine Mutation von R70 hingegen etwa zu einer Halbierung der Translokationseffizienz des *wt.* Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass E99 für R70 der einzige potentielle Bindungspartner zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke ist. E99 kann aber auch durch Rotation der Seitenkette eine Wasserstoffbrücke mit R115 ausbilden und hat so zwei potentielle Bindungspartner.

In der S2 – S3 loop Region zeigt die Mutante E182 (Gruppe A) im Gegensatz zu den Mutanten von Y180A (S95A Q98A Y180A E182A / Y180A / Y180A E182A) keine größere Translokationseffizienz für Casein. Wie in Abb. 3.5.2.5 dargestellt, bildet Y180 in der Host-Guest-Komplex Röntgenkristallstruktur eine Wasserstoffbrücke mit R57 aus. Wird bei einem der Bindungspartner dieser Wasserstoffbrücke eine Alaninmutation eingeführt, hat dies den gleichen Einfluß auf die Translokationseffizienz. Auch die Mutanten R57A, Δ R57 und R57A L58A zeigen eine gesteigerte Translokationseffizienz (eine Ausnahme bildet die Mutante Δ R57 R58). Die Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen K161 und L58 hingegen führt nicht zu einer vergrößerten Effizienz. Um den Einfluß von R57 auf die Translokationseffizienz detaillierter zu untersuchen, wäre es sinnvoll, die beschriebenen Mutanten R57 und Y180 zu kristallisieren. Eine Mutation von E177 (siehe Abb. 3.5.2.5, zweite Wasserstoffbrücke) ist nicht sinnvoll, da es sich nicht um eine Seitenketten- sondern Rückgratinteraktion handelt. Aus der S2-S3 loop Region zeigt die Doppelmutante E60A E65A ebenfalls eine wesentlich erhöhte Translokationseffizienz für Bodipy FL Casein, die Einzelmutanten E60A und E65A hingegen nicht. Anscheinend ist für diesen Abschnitt des S2-S3 loops die Unterbrechung von zwei Wasserstoffbrücken zur Steigerung der Translokationseffizienz von Bedeutung (siehe Abb. 3.5.2.5).

Zusätzlich wurden vergleichende Messungen ausgewählter 20S Proteasommutanten mit verschiedenen Substratkonzentrationen von Suc-LLVY-Amc und Bodipy Casein in 2M Guanidin durchgeführt. Diese Mutanten zeigen bei jeder verwendeten Substratkonzentration qualitativ das gleiche Verhalten im Verhältnis zum *wt* wie in der in den Messungen von Abb. 3.5.2.2 – 3.5.2.5 gewählten Substratkonzentration. Die nach der Bardseley Gleichung [Bardseley 1979] ausgewerteten Messdaten sind im Anhang unter 5.6 gezeigt. Zu einer Bestimmung von kinetischen Parametern wie K_M und k_{cat} sind die Werte der Fehlerquadrate zu hoch.

Interessanterweise konnte eine gesteigerte Translokationseffizienz für E99A erst ab einer GuHCl-Konzentration von 2M festgestellt werden (siehe Abb. 3.5.2.6).

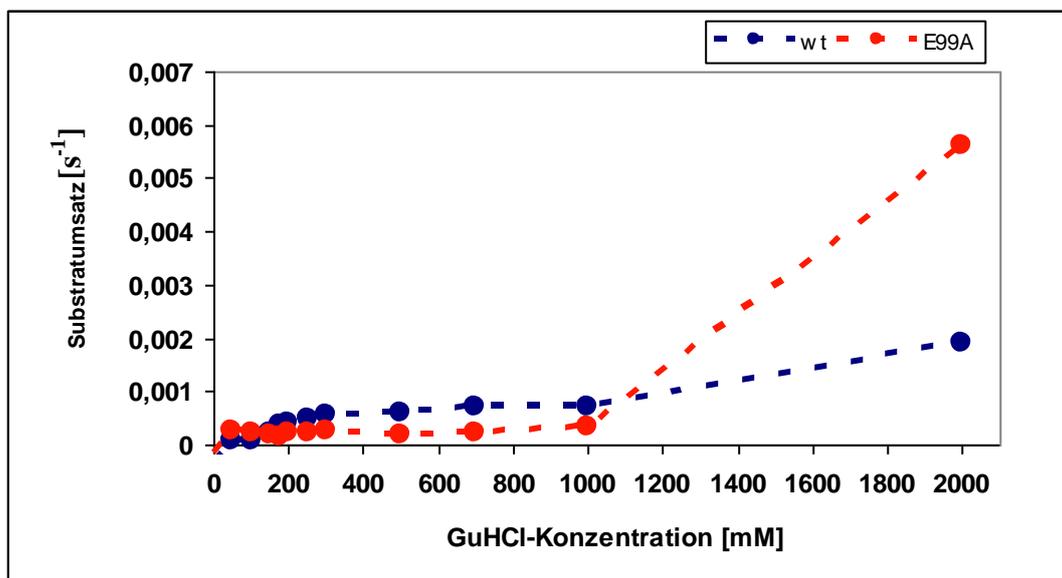


Abb. 3.5.2.6: Verdau von Bodipy FL Casein durch das *wt* 20S Proteasom und die Mutante E99A bei verschiedenen GuHCl-Konzentrationen in 20 mM Hepes pH 7,5 bei 37°C. Proteasomkonzentration: 0,0285 μ M, Caseinkonzentration: 1 μ M

Bei einer GuHCl-Konzentration von 2M liegt Casein wesentlich stärker entfaltet vor als bei 1M [Song 1992]. Die hier durchgeführte Messung (siehe Abb. 3.5.2.6) legt nahe, dass E99A und *wt* bei einer GuHCl-Konzentration von 0 M – 1 M noch einen ähnlichen Substratumsatz haben, da Casein hier noch Anteile von Sekundärstrukturelementen hat. In diesem Fall ist die für E99A und *wt* gleiche Durchgängigkeit der Pore der geschwindkeitsbestimmende Schritt für den Umsatz. Ab einer Konzentration von 2M GuHCl könnte Casein so stark entfaltet in Lösung vorliegen, dass die Poren-Durchgängigkeit von *wt* und E99A nicht mehr limitierend für den Substratumsatz ist.

Zusammenfassend gesagt konnte durch diese Mutationsstudie gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Kontaktflächen-Flexibilität zwischen den Untereinheiten einen Einfluß auf die Translokationseffizienz des 20S Proteasoms hat. Die hier eingeführten Mutationen führten sowohl zur Verringerung als auch zu einer Steigerung der Translokationseffizienz. Eine gesteigerte Translokationseffizienz wurde allerdings ausschließlich bei Mutationen der α -Untereinheiten beobachtet.

3.5.3 Kristallisation von 20S Proteasommutanten und Host-Guest-Komplexen

In 3.5.2 wurden verschiedene Aminosäuren der Kontaktflächen identifiziert, die auf Basis der bisher gewonnen Daten eine Rolle für den Translokationsprozess des 20S Proteasomes zu spielen scheinen. Das Ziel der folgenden Untersuchungen war, einen Teil der Proteasommutanten aus 3.5.2 zu kristallisieren, um so röntgenkristallographische Daten zu erhalten. Im Anschluß sollten die Strukturen von Mutanten mit geringerer und größere Translokationseffizienz im Vergleich zum wt verglichen werden, um aus strukturellen Unterschieden Hinweise auf die Funktionsweise des Translokationsmechanismus gewinnen zu können.

Es wurden verschiedene Mutanten in nativer Form und als Host-Guest-Komplex wie in Kapitel 2.8 beschrieben kristallisiert. Exemplarisch sind in Abb. 3.5.3.1 Bilder von nach der *hanging-drop* Methode kristallisierten 20S Proteasommutanten gezeigt.

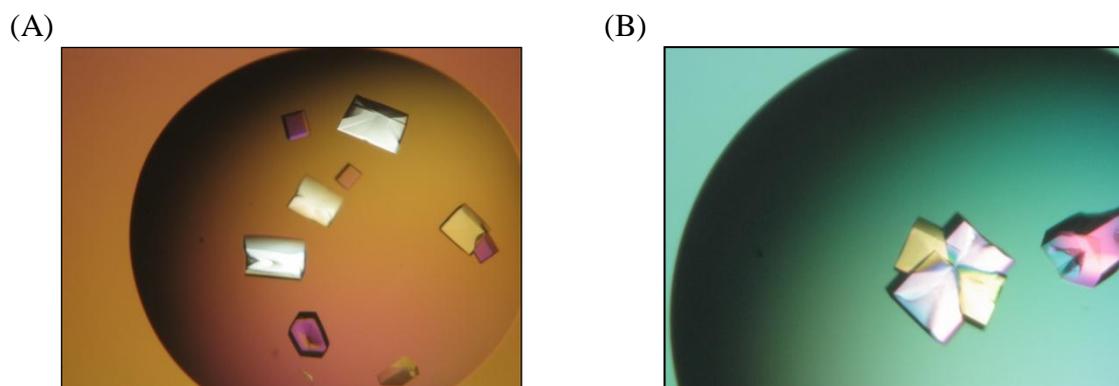


Abb. 3.5.3.1: Typische Kristalle von nach der *hanging-drop* Methode kristallisierten 20S Proteasomen – hier die Mutante R115A. Die Tropfen haben einen Durchmesser von ca. 1,5 mm. (A) 10 % PEG 1000, 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,5 (B) 12 % PEG 1000, 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,75

Kristallisierte Proteasommutanten und Host-Guest-Komplexe von Proteasommutanten wurden am SLS *Swiss Light Source* in Villigen, Schweiz, vermessen. Keiner der vermessenen Kristalle zeigte eine höhere Auflösung als $\sim 20 \text{ \AA}$. Eine weitere Auswertung ist daher nicht sinnvoll.

3.6. Versteifung der 20S Proteasomstruktur

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Versteifung der Struktur durch kovalente Bindung der Untereinheiten aneinander auf die Translokation von Substraten hat. Die Untersuchungen wurden wie auch in 3.5.2 über eine Mutationsanalyse durchgeführt. Dazu wurden zunächst in einer Kooperation mit C. Best alle C α -C α Abstände sämtlicher Aminosäuren des 20S Proteasoms computergestützt ermittelt und die Aminosäuren zweier verschiedener Untereinheiten mit den geringsten Abständen zueinander für eine Cysteinmutation ausgewählt. In räumlicher Nähe voneinander gelegen Cysteine können eine kovalente Bindung über Ausbildung einer Disulfidbrücken bilden. Die durch computergestützte Analyse ermittelten, zur Mutation ausgewählten Aminosäuren und deren Abstände voneinander sind in Tab. 3.6.1 angegeben.

Tab. 3.6.1: Durch computergestützte Analyse ermittelte, zur Mutation ausgewählte Doppelcysteinmutanten und C α - C α Abstände voneinander.

Benennung	Mutation	Kontakt; Abstand C α - C α
A	F133C G136C C151A	β - β <i>trans</i> ; 4,33 Å
B	G50C G118C C151A	β - β <i>cis</i> ; 3,61 Å
C	I26C C151A R165C	β - β <i>trans</i> ; 4,92 Å
D	A78C Y103C C151A	α - β ; 4,89 Å
E	G19C A30C C151A	α - α ; 4,28 Å
F	N24C C151A S167C	β - β <i>trans</i> ; 5,03 Å
G	I59C C151A Y160C	α - α ; 4,72 Å

Tab. 3.6.2: Alanin-Kontrollmutanten der Doppelcysteinmutanten aus Tab. 3.6.1

Benennung	Mutation
A_1	F133A
A_2	G136A
B_1	G50A
B_2	G118A
C_1	R165A
C_2	I26A
D_1	Y103A

In Abb. 3.6.1 ist die Lage der zur Mutation ausgewählten Aminosäuren gezeigt.

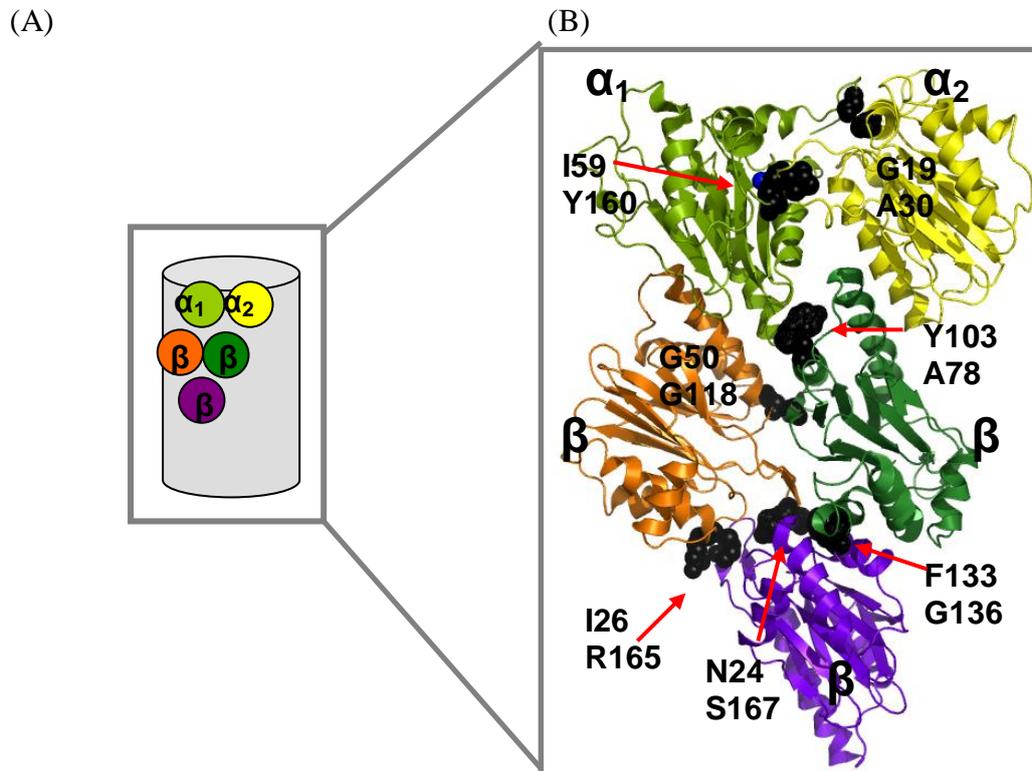


Abb. 3.6.1: (A) Schematische Darstellung des 20S Proteasoms in Form eines Zylinders. Untereinheiten sind als Kreise dargestellt. Hellgrün und gelb: α_1 und α_2 - Untereinheiten; orange und dunkelgrün: benachbarten β -Untereinheiten (cis). Die β -Untereinheit in violett steht trans zu der orangen und dunkelgrünen β -Untereinheit.

(B) Cartoondarstellung von zwei α - und drei β -Untereinheiten basierend auf der Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum*. Zu Cysteinen bzw. Alaninen mutierten Aminosäurereste (siehe Tab. 3.6.1) sind als schwarze Oberflächen dargestellt.

Nach Expression und Reinigung wurde die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten über Polyacrylamid-Gelelektrophoresen untersucht und die Mutanten des Weiteren in Aktivitätsstudien näher charakterisiert (siehe Kapitel 2.5). Wie schon in 3.5.2 beschrieben wurden alle Mutanten eines Satzes auf eine Konzentration gebracht. In den Abb. 3.6.2. – 3.6.4 sind exemplarisch reduzierende und nicht-reduzierende PAGE Analysen einer Expression in BL21 (DE3) und Reinigung in Hepes Puffer, pH 8,0, gezeigt.

Native PAGE

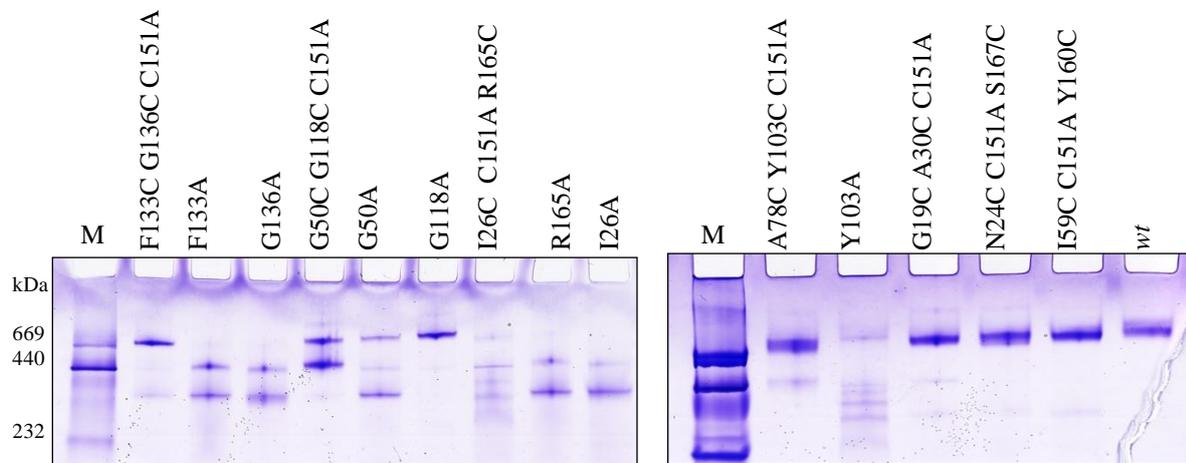


Abb. 3.6.2: Native PAGE (Tris Glycine, 2-20% Acrylamid, Coomassie Färbung) der gereinigten 20S Cystein Doppelmutanten zur Verknüpfung der Untereinheiten sowie Alanin-Kontrollmutanten.

SDS PAGE (reduzierend)

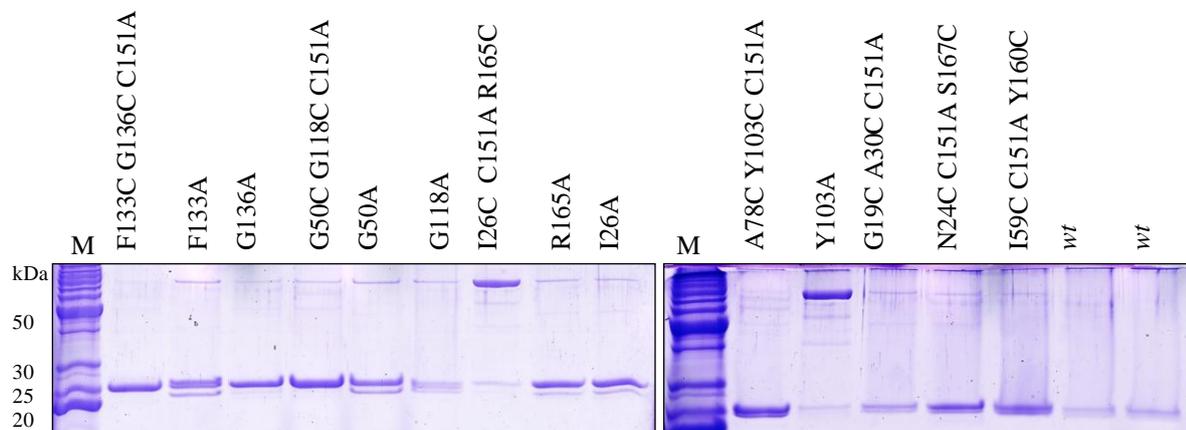


Abb. 3.6.3: Reduzierende SDS PAGE (Schägger-System, 15% Acrylamid, Coomassie Färbung, 200 mM DTT im Laufpuffer) der gereinigten Cystein Doppelmutanten zur Verknüpfung der Untereinheiten sowie der Alaninmutanten.

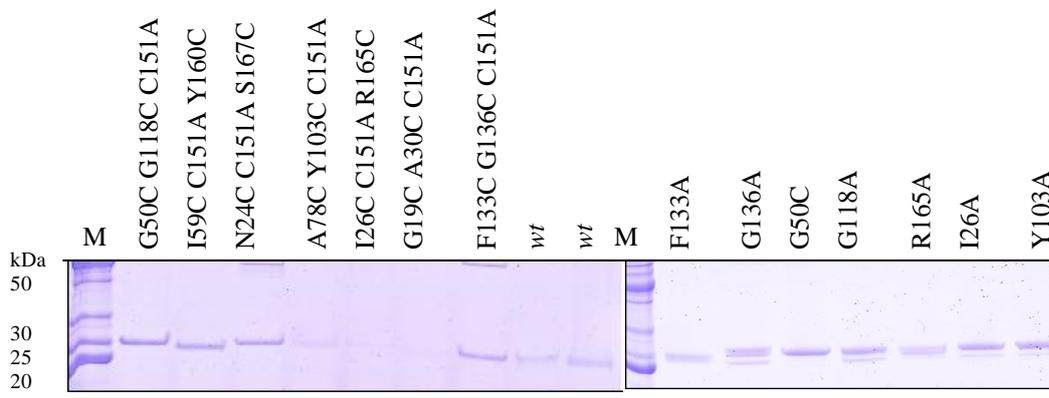
SDS PAGE (nicht-reduzierend)

Abb.3.6.4: Nicht-reduzierendes SDS-PAGE (Schägger-System, 15% Acrylamid, Coomassie Färbung, kein DTT im Laufpuffer) der gereinigten Cysteindoppelmutanten zur Vernetzung der Untereinheiten.

Nach massenspektrometrischer Analyse setzt sich diese Bande auf Höhe von ~ 60 kDa zum größten Teil aus α - und β -Untereinheiten des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* zusammen (Daten hier nicht gezeigt).

Es konnten in den nicht-reduzierenden SDS-Gelen für alle Cysteindoppelmutanten zusätzliche Banden eines Molekulargewichts von über 30 kDa detektiert werden, die in den reduzierenden SDS Gelen nicht auftraten (vergleiche Abb. 3.6.3 mit Abb. 3.6.4). Eine Ausnahme bildet die Mutante I26C C151A R165C, auch in der reduzierenden SDS PAGE mit DTT ist eine Bande von ~ 160 kDa sichtbar. Laut massenspektrometrischer Analyse setzen sich sämtliche Banden von über 30 kDa zum größten Teil aus α - und β -Untereinheiten des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* zusammen. Auch in der Western Blot Analyse konnten β -Untereinheiten bei über 30 kDa nachgewiesen werden. Exemplarisch sind in Abb. 3.6.5 Western Blots von reduzierenden und nicht-reduzierenden SDS Gelen sowie die dazugehörige SDS PAGE von ausgewählten Doppelcysteinmutanten gezeigt.

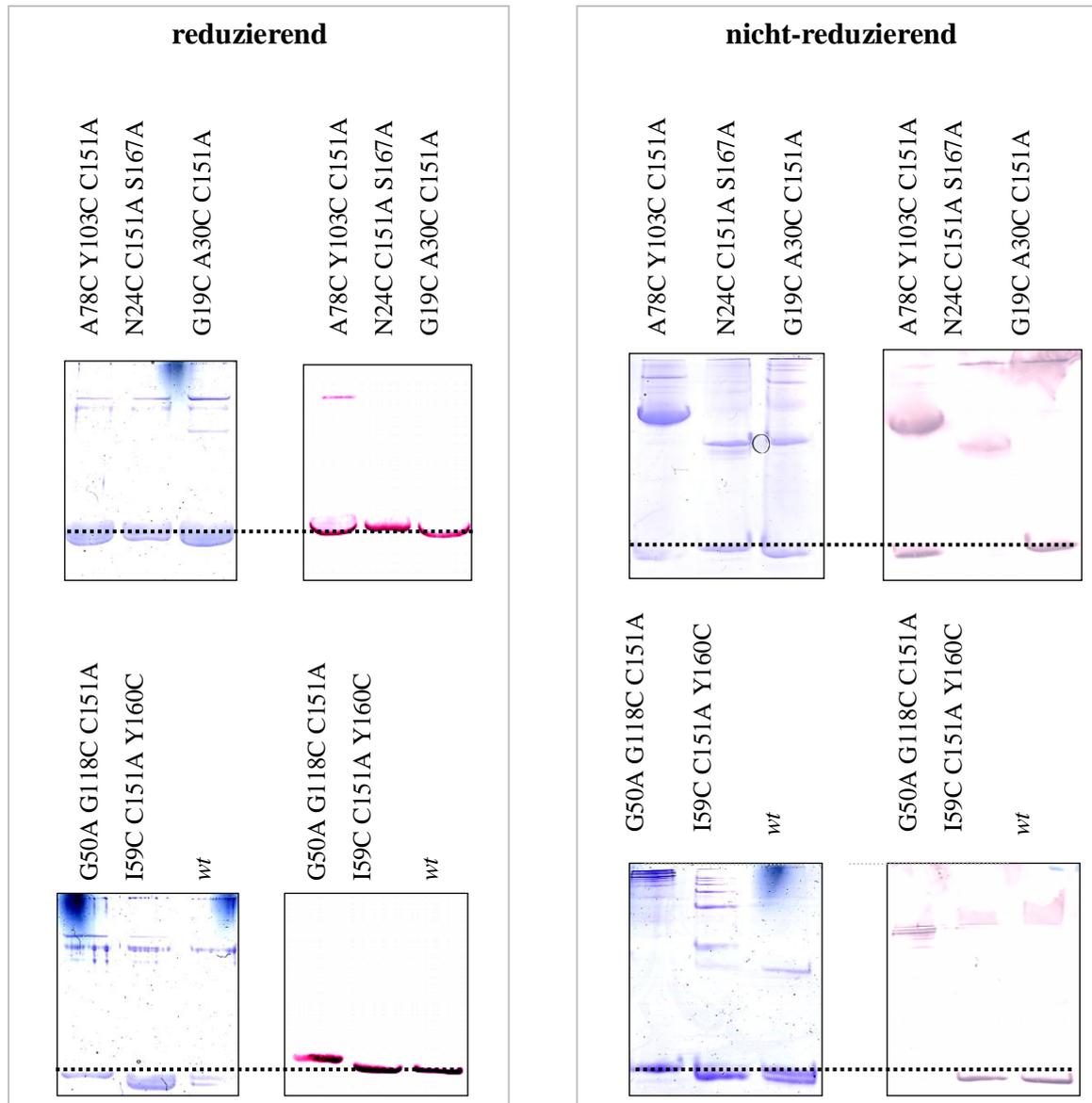


Abb. 3.6.5: SDS-PAGE und Western Blots zur Detektion des His₆-tag von β -Untereinheiten des 20S Proteasoms, jeweils links: SDS PAGE (Schägger -System, 15% Acrylamid, Coomassie Färbung), jeweils rechts: dazugehörige Immunfärbung (BCIP/NBT); gestrichelte Linien bei ~ 25 kDa

Alle Cysteinendoppelmutanten zur Vernetzung der Untereinheiten sind im Nativ Gel (vergleiche Abb. 3.6.2) mit Ausnahme von Mutante I26C C151A R165C vollständig assembliert. In EM-Aufnahmen der Doppelcysteinmutanten (ausgenommen I26C C151A R165C – wahrscheinlich Aggregate) waren ausschließlich vollständig assemblierte 20S Proteasomen zu sehen (nicht gezeigt).

Von den Alaninmutanten (siehe Unterpunkte Tab. 3.6.1) sind F133A, G136A, G50A, R165A, I26A und Y103A in der Native PAGE nicht vollständig assembliert. Lediglich die Mutante G118A zeigt im Nativ-Gel eine Bande vollständig assemblierter 20S Proteasomen. Auch in

den EM-Aufnahmen der Mutanten F133A, G136A, G50A, R165A, I26A und Y103A wurden Partikel detektiert, die ungefähr die Größe von Halbproteasomen und einzelnen Ringen haben. Exemplarisch ist in Abb. 3.6.6 eine EM-Aufnahme der Alaninmutante F133A gezeigt.

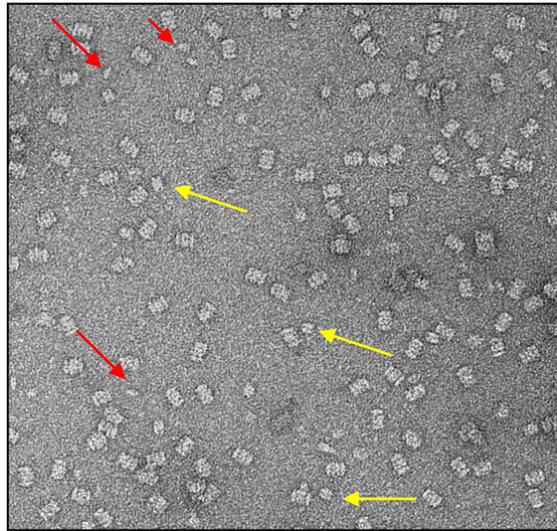
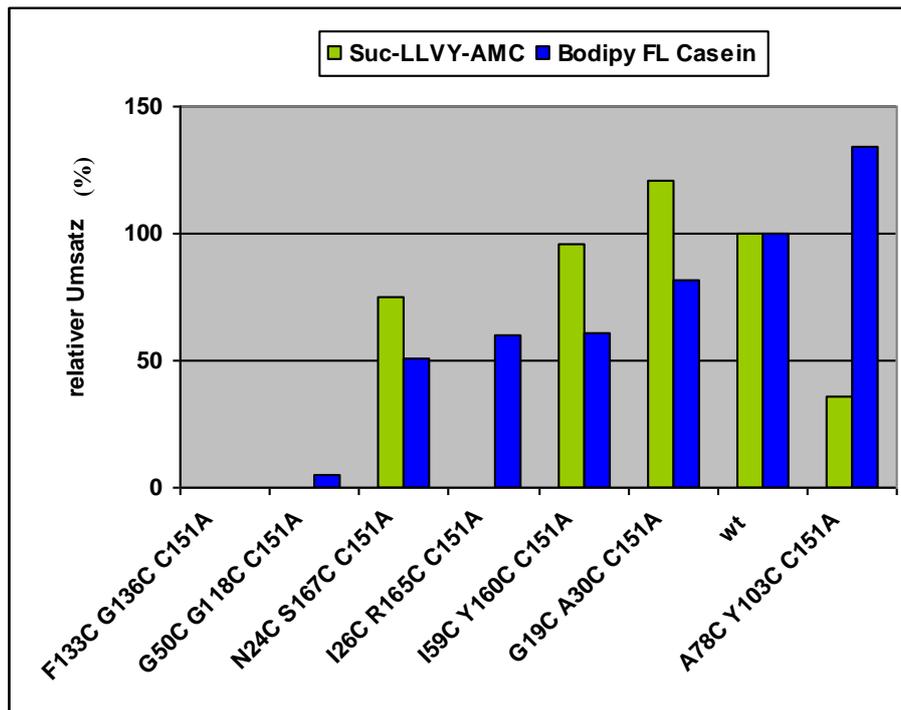


Abb. 3.6.6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Alaninmutante F133A. Kontrastierung mit Uranylacetat, aufgenommen bei einer Vergrößerung: 50000, Defocus: -1500 nm. Vermutliche Halbproteasomen mit gelben Pfeilen, vermutliche Einzelringe mit roten Pfeilen gekennzeichnet.

Mit den in HEPES Puffer, pH 8,0, gereinigten Doppelcysteinmutanten und Alaninmutanten wurden Aktivitätsstudien mit Suc-LLVY-Amc und Bodipy FL Casein durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Abb. 3.6.7 gezeigt. Die Mutanten F133C G136C C151A, G50C G118C C151A zeigen sowohl für Suc-LLVY-Amc als auch für Bodipy FL Casein einen im Vergleich zum *wt* geringeren Substratumsatz. Die Mutante I26C R165C C151A zeigt nur für Suc-LLVY-Amc einen im Vergleich zum *wt* signifikant geringen Substratumsatz, aber für Bodipy FL Casein ist der Umsatz ähnlich dem des *wt*. Für die zu diesen Doppelcysteinmutanten gehörigen Alaninmutanten F133A, G136A, G50A, I26A und R165A wurde in allen Fällen ein signifikant niedrigerer Umsatz von Suc-LLVY-Amc und Bodipy FL Casein gemessen. Die Punktmutante G118A zeigt hingegen für beide Substraten eine *wt*-ähnlichen Umsatz. Von den Alaninmutanten ist diese auch als einzige in der Native PAGE und EM-Aufnahmen vollständig assembliert.

(A)



(B)

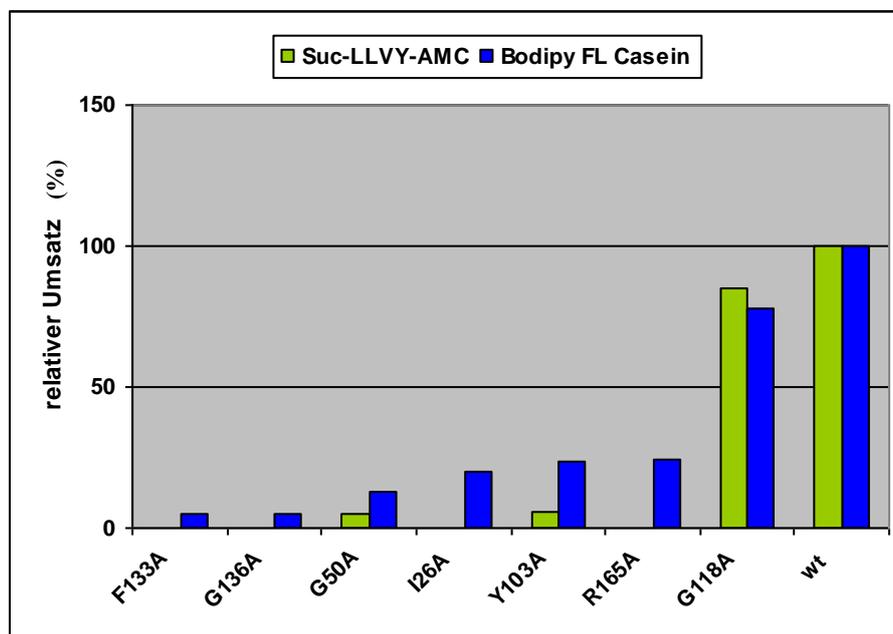


Abb. 3.6.7: (A) Aktivitätsmessungen zu den Cysteindoppelmutanten (Tab. 3.6.1; A-G) zur Vernetzung der Kontaktflächen. (B) Aktivitätsstudien zu den Alaninmutanten (Tab. 3.6.2; A_1 bis D_1).

Zusammenfassend betrachtet konnten für die exprimierten und gereinigten Doppelcysteinmutanten der Kontaktflächen ausgebildeten Disulfidbrücken nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die zusätzlichen Banden in den nicht-reduzierenden SDS Gelen geben aber Hinweise darauf, dass zumindest ein Teil der geplanten Disulfidbrücken ausgebildet werden konnte. Durch massenspektrometrische Analysen dieser Banden konnte des Weiteren gezeigt werden, dass sie sich hauptsächlich aus α - und β -Untereinheiten zusammensetzen. Es ist bemerkenswert, dass bestimmte Punktmutationen der β -Untereinheiten das Proteasom strukturell zu destabilisieren und gleichzeitig zu inaktivieren (F133A, G136A, G50A, I26A, R165A) scheinen. Anscheinend reichen subtile strukturelle Veränderungen an den β - β Grenzflächen aus, um das aktive Zentrum in eine inaktive Konformation zu versetzen.

4. Diskussion und Ausblick

Über eine aktive Rolle des 20S Proteasoms bei der Substrat-Translokation ist nur wenig bekannt. In verschiedenen mathematischen Modellen wird das 20S Proteasom als hohler Zylinder betrachtet in dem sowohl der Eintritt von Substraten als auch deren Translokation einzig über die Pore reguliert wird [Luciani et al. 2005; Mishto et al. 2008]. Die vorgeschlagenen Modelle messen der Unterteilung des 20S Proteasoms in Kompartimente (Vorkammern und Hauptkammer) sowie einem vielleicht über die Untereinheiten vermittelten Translokationsmechanismus keine Bedeutung bei.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der strukturellen Eigenschaften des 20S Proteasoms für den Translokationsvorgang zu untersuchen.

Dabei wurde einerseits versucht, die Substratverteilung im Proteasom über Einzelmolekülanalyse von Host-Guest-Komplexen oder NMR Analysen von Synuclein-Proteasom-Hybridproteinen zu visualisieren.

Des Weiteren wurde die Flexibilität der Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten im Rahmen einer Mutationsanalyse erhöht und der Einfluß dieser größeren Flexibilität auf den Substratumsatz von Suc-LLVY-AMC und Bodipy FL Casein untersucht.

Ein anderer Ansatz bestand darin, die Flexibilität der Kontaktflächen durch kovalente Vernetzung zu verringern. Hierzu wurden gezielt Cysteinmutationen zwecks Bildung von Disulfidbrücken eingeführt.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Substratverteilung (3.4), zu den Kontaktflächen der Untereinheiten und deren Einfluß auf den Translokationsvorgang (3.5) sowie des Einfluß der kovalenten Bindung der Untereinheiten aneinander auf den Translokationsvorgang (3.6) werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Substratverteilung im 20S Proteasom

4.1.1 Fluoreszenzuntersuchungen von Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene

Im Rahmen der Fluoreszenzuntersuchungen von Host-Guest-Komplexen auf Einzelmolekülebene wurde ein signifikanter Unterschied in der prozentualen Anzahl von kolokalisierten Proteasomen (Donor) und Cytochrom C (Akzeptor) bei inhibierten und aktiven Host-Guest-Komplexen festgestellt. Inhibierte Host-Guest-Komplexe zeigen ungefähr 10 % mehr kolokalisierte Donoren und Akzeptoren als aktive Host-Guest-Komplexe (vergleiche Tab. 3.4.1.2). Da aktive Proteasomen Cytochrom C degradieren können, wäre es möglich, dass ein großer Anteil des in der Hauptkammer befindlichen Cytochrom C degradiert wurde, was dazu führen würde, dass die Werte für Kolokalisation von Proteasom und Cytochrom C sinken. Gleichzeitig zeigen die aktiven Host-Guest-Komplexe tendenziell einen erhöhten prozentualen Anteil von Lichtpunkten mit Kolokalisation und FRET-Signal. Der erhöhte Anteil an Komplexen mit FRET-Signal lässt vermuten, dass in den aktiven Host-Guest-Komplexen mehr Cytochrom C in den Vorkammern lokalisiert ist (größere räumliche Nähe als zur Hauptkammer). Leider war es auf Basis des gewählten Aufbaus nicht möglich, die Substratverteilung in den Kammern genauer zu analysieren und damit Aussagen über Belegungszahlen und den Weg des Substrats im Proteasom zu treffen. Das FRET-Paar Alexa Fluor 488 / Alexa Fluor 594 hat einen Försterradius von etwa 6 nm, was dazu führt dass unterschiedliche Belegungen der Kammern nicht signifikant messbar sind. Von den Alexa Fluorfarbstoffen hat das FRET Paar Alexa Fluor 555 / Alexa Fluor 594 mit 4,7 nm den kleinsten Försterradius [Molecular Probes]. Mit diesem kleineren Försterradius wäre eine eindeutigere Zuordnung von FRET- und Kolokalisationssignalen zu Belegungszahlen der Kammern möglich. Die Emissionsspektren von Alexa Fluor 555 und Alexa Fluor 594 weisen allerdings einen größeren Überlappungsbereich auf als die Emissionsspektren von Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594. Im Bereich des Emissionsmaximums von Alexa Fluor 594 emittiert Alexa 555 ebenfalls signifikant, was die spätere Signalzuordnung und damit die Auswertung der Daten erschwert.

Ein weiteres Problem stellt die statistische räumliche Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe bei den erreichten Markierungseffizienzen der 20S Proteasomproben dar. Im Rahmen der Auswertung wäre es von Vorteil, wenn entweder eine sehr hohe Markierungseffizienz von 14 Farbstoffmolekülen pro Proteasom erreicht werden könnte, oder jedes Proteasom genau einen

Farbstoff tragen würde. Dies würde eine eindeutigere Interpretation von FRET-Signalen bzw. Kollokalisierungssignalen ohne FRET-Signale ermöglichen.

Eine größere Markierungseffizienz von 14 Farbstoffmolekülen pro Proteasom zu erreichen, gestaltet sich schwierig. Zur Markierung der Proteasomen wurde bereits ein 10x Überschuß an Farbstoffmolekülen pro Cystein eingesetzt. Um eine größere Markierungseffizienz zu erreichen, müsste man Farbstoff in einer höheren Konzentration und einem größeren Überschuß zugeben. Bei einer höheren Farbstoffkonzentration würde aber die Löslichkeitsgrenze des Farbstoffes in DMSO überschritten. Von der Zugabe eines größeren Überschuß von Farbstoff in größeren Volumina DMSO und folglich höheren DMSO-Konzentration im Markierungsansatz ist ebenfalls abzuraten. Schon in dem gewählten Ansatz fiel auf Grund der DMSO Zugabe häufig Protein aus (Hydrophobizität).

Um eine durchschnittliche Markierungseffizienz von einem Farbstoff pro Proteasom zu erreichen, ließen sich einerseits die Untereinheiten getrennt exprimieren, markieren und in günstigen Verhältnissen mit unmarkierten Untereinheiten mischen. Andererseits wäre es möglich, den Überschuß an Farbstoff im Markierungsansatz zu verringern, so dass durchschnittlich ein Proteasom einen Farbstoff trägt. Eine Markierung mit genau einem Farbstoff ist aber bei homooligomeren Komplexen nicht möglich.

4.1.2 Untersuchungen von Hybridproteinen des 20S Proteasoms und α -Synuclein

Im zweiten Lösungsansatz sollten Hybridproteine des 20S Proteasoms und α -Synuclein in NMR-Messungen untersucht werden. Leider assemblierten die meisten der gereinigten Hybridproteine nicht oder in den Hybridproteinen erst ab einer α -Synucleinlänge von 10 Aminosäuren. Eine Ausnahme bildet das Hybridprotein α -syn α -loop, in dem α -Synuclein *wt* in einen loop der α -Untereinheiten inseriert wurde. In EM-Aufnahmen ist α -syn α -loop partiell und vollständig assembliert (siehe Abb. 3.4.2.3) und in der Native PAGE Analyse wurde ein Bande auf Höhe des Molekulargewichts vollständig assemblierter 20S Proteasomen detektiert. Die Insertion eines möglichst großen α -Synuclein Anteils in das 20S Proteasom hat zwei Vorteile. Einerseits kommt ein möglichst großer α -Synuclein Anteil dem nativen Substrat α -syn *wt* am nächsten - und damit auch der natürlichen Substratverteilung auf Grund der erhöhten Anzahl an Freiheitsgraden (Entfernung vom „Ankerpunkt“). Andererseits stehen für die Isotopenmarkierungsansätze von Isoleucin, Leucin und den Methylgruppen der Valine

im statistischen Mittel mehr markierbare Aminosäuren für die NMR Messungen zur Verfügung, was das Signalverhältnis verbessern und die Signalzuordnung vereinfachen sollte. Aus den genannten Gründen wären NMR-Messungen mit α -syn α -loop am sinnvollsten. Eine weitere Möglichkeit würde die getrennte Expression der Untereinheiten bieten. Diese hätte den Vorteil, Untereinheiten mit und ohne α -Synucleinanteil in verschiedenen Mischungsverhältnissen in Assemblierungsansätzen verwenden zu können. Das könnte die Assemblierung begünstigen, da im einzelnen 20S Proteasom weniger α -Synucleinanteile integriert werden müssten.

4.2 Einfluß der Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten auf die Substrattranslokation

Das ATP-abhängige Ubiquitin-Proteasomsystem nimmt für die Proteindegradation in Zellen einen besonderen Stellenwert ein. Ein Teil der Substrate des 26S Proteasoms wird unabhängig von einer Ubiquitin-Markierung abgebaut, dazu gehören beispielsweise der Transkriptionsfaktor c-Jun (Jariel-Encontre et al. 1995), Ornithine Decarboxylase (Murakami et al. 1992) oder Apocalmodulin (Tarcza et al. 2000). Diese Proteine werden von dem 19S Partikel ATP-abhängig entfaltet und anschließend in das 20S Proteasom inseriert. Der Zugang in das 20S Proteasom ist zunächst durch die flexiblen N-Termini der α -Untereinheiten begrenzt. Diese verschließen z.B. das Hefe 20S Proteasom vollständig [Groll et al. 1997], und es wird erst durch das regulatorische Partikel oder SDS aktiviert. In vielen Studien wird deshalb die Pore des 20S Proteasoms als „Tor“ betrachtet, das über eine Öffnung oder Schließung die Geschwindigkeit der Proteolyse regelt. Die Funktionsweise dieser Porenöffnung oder -schließung wurde intensiv untersucht [Smith et al. 2005; Smith et al. 2007; Benaroudj et al. 2003] und diskutiert [Saeki et al. 2007; Finley 2009]. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Porenöffnung durch das regulatorischen Partikel wurde auch die Frage gestellt, Substrate welchen Durchmessers wie die Pore passieren können. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass nur eine Peptidkette die Pore passieren kann. Später wurde gezeigt, dass auch drei Aminosäurestränge gleichzeitig die Pore passieren können [Lee et al. 2002].

Das 20S Proteasom kann eine Reihe von Substraten ohne ein regulatorisches Partikel abbauen. Dazu gehören p21^{WAF1/CIP1} [Touitou et al. 2001], Casein [Kisselev et al. 1999];

Davies 2001], α -Synuclein [Tofaris et al. 2001] und das β -Sekretase abgeleitete C-terminale Fragment des amyloiden Vorläufer-Protein [Nunan et al. 2001].

Von Liu et al. (2003) wurde beobachtet, dass das 20S Proteasom für α -Synuclein Hybride mit GFP eine endoproteolytische Aktivität zeigt. Diese Untersuchungen geben starke Hinweise darauf, dass auch ein loop und somit zwei Polypeptidketten gleichzeitig in das Innere des 20S Proteasoms gelangen, und dort anschließend prozessiert werden kann. In den Untersuchungen von Lee et al. (2002) wurde gezeigt, dass die Passage von drei Aminosäuresträngen keinen Einfluß auf die Proteolysegeschwindigkeit hat. Dies steht im Gegensatz zu mathematischen Modellen, in denen der Durchtritt durch die Pore als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Proteolyse gesehen wird [Luciani et al. 2005; Mishto et al. 2008]. Damit ist es fraglich, ob die „Pore“ für den Abbau von 20S-Substraten denselben Stellenwert einnimmt wie in Zusammenhang mit der Interaktion des regulatorischen Partikels, wie in Kapitel 1.3 der Einleitung beschrieben.

Des Weiteren wäre vorstellbar, dass bei Interaktion mit einem regulatorischen Partikel neben der Öffnung der Pore zusätzliche strukturelle Änderungen des 20S Proteasoms induziert werden, die einen wesentlich größeren Einfluß auf den Substratumsatz haben als die Öffnung der Pore. So wurde eine radiale Verschiebung der Untereinheiten des 20S Proteasoms in der einer elektronenmikroskopischen 26S-Struktur wurde von Fonesca et al. 2008 beobachtet. Eine solche Verschiebung der Untereinheiten bei Bindung des regulatorischen Partikel würde wahrscheinlich auch Änderungen auf den Kontaktflächen der 20S-Untereinheiten hervorrufen.

In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Änderungen in Form von Mutationen auf den α - α Kontaktflächen und in deren Nähe einen gesteigerten (Kapitel 3.5.2) Casein-Umsatz bewirken. Dies traf im Besonderen auf Mutationen der S2-S3 loop Kontaktfläche und dessen benachbarter α -Untereinheit zu.

Bezüglich der Länge des Substrates kommt der Abbau von Casein - von allen hier verdauten Substraten - dem *in vivo* Abbau am nächsten. Das 20S Proteasomen baut bei Assoziation mit einem regulatorischen Partikel in Zellen ganze Proteine ab [Hershko und Ciechanover 1992; Jentsch et al. 1992; Rock et al. 1994]. Für den weiteren Peptidabbau sind verschiedene Aminopeptidasen und TOP (Thimet Oligopeptidase) zuständig [Saric et al. 2004]. Ein Nachteil der hier diskutierten fluoreszenzbasierten Aktivitätsstudien mit Bodipy FL Casein ist die hier in vergleichenden Messungen eingesetzte hohe GuHCl-Konzentration (2M), die der zellulären Umgebung vollkommen fremd ist. Es wäre möglich, dass die hohe Konzentration an chaotropen Agens auch strukturelle Änderungen in der Porenregion mit sich zieht, die zu

dem gesteigerten Substratumsatz führen. So können z.B. Hefeproteasomen mit SDS aktiviert werden, und es wurde nachgewiesen, dass dies ausschließlich für Hefeproteasomen mit geschlossener Pore der Fall ist. Folglich scheint SDS eine Öffnung der Pore zu bewirken.

Allerdings hat ein großer Teil der Mutanten in 2M GuHCl einen *wt* ähnlichen oder auch signifikant geringeren Casein-Umsatz als der *wt*. Des Weiteren liegen alle Mutationen nicht in der Nähe der Pore (Ausnahmen: G127 / G128). Zusammen genommen scheint damit die Möglichkeit struktureller Änderungen an der Pore in 2M GuHCl – und damit eines Messartefakts - recht unwahrscheinlich.

Interessanterweise wird ein signifikant größerer Substratumsatz von Bodipy FL Casein durch die Mutante E99 erst bei einer GuHCl Konzentration von mindestens 2M gemessen, bei einer GuHCl Konzentration von 1M verhält sie sich wie der *wt*. Casein hat – obwohl es häufig als nativ entfaltetes Protein betrachtet wird – wenige Sekundärstrukturelemente [ca. 10 % α -helikal und ca. 15 % β -Faltblatt; Song 1992]. Bei einer GuHCl-Konzentration von 2M liegt es wesentlich stärker entfaltet vor als bei 1M [Song 1992]. Diese Beobachtung legt nahe, dass Mutante und *wt* bei einer GuHCl-Konzentration von 1M deshalb einen ähnlichen Substratumsatz haben, weil Casein hier noch Sekundärstrukturelementen enthält. In diesem Fall scheint der Durchtritt durch die (in Mutante und *wt* vermutlich gleich großen) Pore der limitierende Schritt zu sein. Ab einer Konzentration von 2M könnte Casein so stark entfaltet in Lösung vorliegen, dass der Porendurchmesser nicht mehr der limitierende Faktor ist. In diesem Fall würden die strukturellen Unterschiede in der Flexibilität der Struktur zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt.

Die durch Mutationen induzierten strukturellen Änderungen könnten sowohl Änderungen in der Porenregion als auch am aktiven Zentrum oder dessen Bindungstasche bewirken. Diese könnten ebenfalls den signifikant größeren Casein-Umsatz einiger Mutanten erklären. Wie auch für die Porenregion, liegt keine der eingeführten Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums oder dessen definierter Bindungstasche [Seemüller et al 1996]. Das macht strukturelle Änderungen nicht sehr wahrscheinlich. Sie sind aber aufgrund der häufig bei Enzymen beobachteten Plastizität nicht auszuschließen [Todd et al. 2002]. Um einen direkten Beweis für strukturelle Unversehrtheit zu erbringen, wäre es sinnvoll, röntgenkristallographische Strukturen von „auffällig“ eingestuften Mutanten miteinander abzugleichen.

Interessanterweise bewirken Mutationen der „Keilspitze“ (Spitze der α -Helix der β -Untereinheit, die zwischen den α -Untereinheiten liegt, und so die Kontaktflächen α_1 - β und α_2 - β bildet) einen geringeren Caseinumsatz. Dies könnte wie folgt begründet sein: Die

Aminosäuren R70 und R71, die auf der „Keilspitze“ liegen, bilden Wasserstoffbrücken zu Aminosäuren der α_1 und α_2 -Untereinheit aus. So werden auf sehr kleinem Raum Interaktionen zwischen drei Untereinheiten vermittelt (R70 – E99 / N108 α_1 - β ; R71 – E65 α_2 - β). Punktmutationen der Kontaktflächen der β -Untereinheiten scheinen zu einer „Deaktivierung“ des Komplexes führen zu können. Im Gegensatz dazu wäre für das Proteasom von Vorteil, eine schnelle Degradation bei korrekter Assoziation mit einem regulatorischen Partikel zu gewährleisten. Da das regulatorische Partikel an die Oberflächen der α -Untereinheiten bindet, könnte es dort eine Verschiebung der Kontaktflächen induzieren und im besonderen strukturell wenig steife Regionen – wie die S2-S3 loop Region – verschieben. Wie hier gezeigt, erhöht die Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit der Flexibilität in dieser Region den Caseinumsatz wesentlich. Die Aktivierung des 20S Proteasoms durch ein regulatorisches Partikel läge damit nicht nur in der Öffnung der Pore begründet, sondern auch in einer globalen strukturellen Aktivierung.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass strukturelle Veränderungen an den Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten einen Einfluß auf die Translokationseffizienz des 20S Proteasoms haben. Es wäre vorstellbar, dass ein regulatorischer Partikel durch die Interaktion mit den Oberflächen der α – Untereinheiten ebenfalls Änderungen in den Kontaktflächen und deren Umgebung induziert. Wenn die induzierten strukturellen Veränderungen zu der Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen der S2 – S3 loop Region (R57 oder L58) oder der Region um E99 führen würden, würde dies zu einer Aktivierung des *wt* 20S Proteasoms führen (größerer Substratumsatz). Damit würde die Assoziation des 20S Proteasoms mit einem regulatorischen Partikel nicht ausschließlich die Öffnung der Pore und Translokation von entfaltenen Proteinen bewirken [Smith 2005], sondern auch zu einer zusätzlichen globalen Aktivierung des 20S Proteasoms über Unterbrechung von Wasserstoffbrückenbindungen führen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste ein Ansatz gewählt werden, in dem eine strukturelle Verschiebung des S2 - S3 loops oder der E99 Region gegenüber der benachbarten Kontaktfläche bei Bindung des regulatorischen Partikels direkt nachgewiesen kann. Ein solcher direkter Nachweis könnte über die Röntgenkristallstruktur von 20S Proteasom mit regulatorischem Partikel erbracht werden. Es konnte aber bis zum heutigen Zeitpunkt kein 20S Proteasom zusammen mit dem regulatorischen Partikel kristallisiert werden. Die Auflösung der vorliegenden cryo-elektronenmikroskopischen Struktur des 26S Proteasoms

aus *Drosophila melanogaster* [Nickel 2009; nominale Auflösung von 2.5 nm] ist ebenfalls nicht hinreichend, um eine Aussage über die entsprechenden loop Region / Region um E99 treffen zu können. Die von Fonesca (2008) beobachtete radiale Verschiebung der Untereinheiten basiert auf einer negativ kontrastierten elektronenmikroskopischen Struktur – eine cryo-elektronenmikroskopische Struktur würde an dieser Stelle eine detaillierte Aussage über mögliche Verschiebungen der 20S-Untereinheiten 26S Proteasom nah am nativen Zustand zulassen.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis einer Verschiebung des S2 – S3 loops würde dessen Markierung und der zugehörigen Kontaktfläche der α – Untereinheit mit einem Quench-Paar bieten. Bei Bindung des regulatorischen Partikels an die Oberfläche und hinreichend weiter Verschiebung des Quenchers am S2 – S3 loop von dem Quencher an der zugehörigen Kontaktfläche der zweiten α – Untereinheit könnte so eine strukturelle Änderung analysiert werden. Voraussetzung für eine solche Analyse wäre eine ausreichend lange Verweildauer des regulatorischen Komplexes auf dem 20S Proteasom, so dass im Rahmen der Messzeit eine Änderung des Signals detektiert werden kann.

Durch die Analyse anderer 20S Proteasomen aus Eubakterien und Eukaryonten in den angesprochen Regionen ließe sich zeigen, ob es sich hier um ein allgemein gültiges Prinzip handelt.

4.3 Versteifung der 20S Proteasomstruktur

Neben den Auswirkungen einer erhöhten Flexibilität der Kontaktflächen sollten auch die Effekte einer Versteifung der 20S – Struktur untersucht werden. Dazu wurden Aminosäuren zweier verschiedener Untereinheiten mit den geringsten Abständen zueinander für eine Cysteinmutation ausgewählt (siehe Tab. 3.6.1). Leider konnte die Bildung der geplanten Disulfidbrücken eindeutig nachgewiesen werden.

Interessanterweise zeigten drei der **Cysteindoppelmutanten** (F133C G136C / G50C G118C / I26C R165C), die eigentlich zur Vernetzung der β -Unterheiten konzipiert waren, nur eine geringen oder keinen Umsatz von Suc-LLVY-Amc oder Casein.

Auch die korrespondierenden **Alaninmutanten** (F133A / G136A / G50A / I26A / R165A) hatten im Vergleich zum *wt* nur einen sehr geringen Substratumsatz. Nativ-Gel und EM-

Aufnahmen geben für diese Mutanten starke Hinweise auf Assemblierungsintermediate – im Gegensatz zu den Cysteindoppelmutanten. Die eingeführten Alanin-Punktmutationen scheinen eine destabilisierende Wirkung auf die β - β Kontaktflächen-Wechselwirkung zu haben, da sich in den EM-Aufnahmen im Gegensatz zum *wt* Proteasomenfragmente finden. Unter den moderat destabilisierenden Bedingungen der Native PAGE liegt das Proteasom von F133A / G136A / G50A / I26A / R165A / Y103 A weitgehend fragmentiert vor, während das *wt* Proteasom stabil ist. Zusätzlich sind diese Mutanten kaum aktiv. Eine unvollständige Prozessierung des Propeptids kann als Ursache für weniger Assemblierung / Aktivität zwar nicht ausgeschlossen werden, es ist jedoch folgende These zu prüfen: Es wäre möglich, dass die Alaninmutanten wegen der Punktmutationen an den β - β Grenzflächen das aktive Zentrum in eine nicht native Konformation bringen und aus diesem Grund inaktiv sind. Hierin könnte ein Sicherungsmechanismus bestehen, der verhindert, dass zu aktiven Zentren von Halbproteasomen nahezu unlimiteder Substratzugang besteht, und diese indifferenziert proteolytisch aktiv sind.

5. Anhang

5.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalie	Abkürzung/Formel, Firma
Acrylamid 30% Bisacrylamid 8,8%	Rotiphorese Gel 30, Roth
Agarose	Sigma
Alexa Fluor® 488 C ₅ -maleimid	Invitrogen
Alexa Fluor® 488 Carboxylsäure, Succinimidylester	Invitrogen
Alexa Fluor® 594 Carboxylsäure, Succinimidylester	Invitrogen
7-Amino-4-methylcoumarin	Amc, Bachem
Ammoniumperoxodisulfat	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , Roth
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄ , Merck
Ampicillin	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S, Roth
Bacto Agar	Difco
Bacto Tryptone	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
BCIP/NBT Tabletten	Sigma
Betain Monohydrat	C ₅ H ₁₃ NO ₃ , Fluka
Bovine Serum Albumin	BSA, Sigma
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ · 2H ₂ O, Merck
Carbenicillindinatriumsalz	Carb, Sigma
Chloramphenikol	Cam, AppliChem

Chemikalie	Abkürzung/Formel, Firma
clasto-Lactacystin β -lacton	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
Cytochrome C aus dem Pferdeherzen	Sigma
3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl- phenanthridiumbromid	$C_{12}H_{20}BrN_3$, Ethidumbromid, plusone
Dimethylsulfoxid	DMSO, Serva
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4 , Merck
1,4-Dithiothreitol	DTT, Merck
Eisen (III) chlorid	$FeCl_3$,
Eisen (II) sulfat	$FeSO_4$
Essigsäure, konz.	HAc, Merck
Ethanol, abs.	EtOH, Merck
Ethylendiamin-N,N,N',N'- Tetraessigsäure	Titriplex, EDTA, Merck
D(+)-Glukose	$C_6H_{12}O_6$, Merck
Glyzerin, etwa 87%	Merck
Glyzin	H_2NCH_2COOH , Merck
Guanidiniumchlorid	CH_6ClN_3 , Merck
Guanidiniumchlorid, <i>ultra purissima</i>	Fluka
Harnstoff	$CO(NH_2)_2$, Merck
Imidazol	Merck
Isopropyl- β -D1-thiogalaktopyranosid	IPTG, Roth
Kanamycinsulfat	Kan, Serva
Kaliumchlorid	KCl, Merck
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Alfa Aesar

Chemikalie	Abkürzung/Formel, Firma
Kaliumdihydrogenphosphat Kupfersulfat	KH_2PO_4 , Merck CuSO_4 ,
α -Laktose Monohydrat	Sigma
6x Loading Dye (6x Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese)	Fermentas
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck
Manganchlorid-Tetrahydrat	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma
Mca-OH	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5$, nova biochem
Mca-RPPGFSAFK(Dpn)-OH	R&D systems
2-Morpholinoethansulfonsäure Monohydrat	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck
Natriumazid	NaN_3 , Sigma
Natriumchlorid	NaCl , Merck
Natriumhydroxid	NaOH , Merck
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure	HEPES, Biomol
3-N-Morpholinopropansulfonsäure	MOPS, Biomol
N,N,N',N'-Tetramethylethylene- diamin	$\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$, TEMED, Serva
Natriumchlorid	NaCl , Merck
Natriumdihydrogenphosphat	NaH_2PO_4 , Fluka
Natriumdodecylsulfat	SDS, Roth
Natriumhydroxid	NaOH , Merck
Nickelsulfat-Hexahydrat	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Riedel-de-Häen
N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin- Tyrosin-7-amino-4-methylcoumarin	Suc-LLVY-Amc, Bachem
Salzsäure, konz.	HCl , Merck

Chemikalie	Abkürzung/Formel, Firma
SigmaFast™ BCIP/NBT	Sigma
Tetracyclinhydrochlorid	Tet, Fluka
Tricine	C ₆ H ₁₃ NO ₅ , Roth
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ , Merck
Tween®20	Sigma-Aldrich
Zinkchlorid	ZnCl ₂ ,
Verbrauchsmaterial	Bezeichnung, Firma
Chromatographiesäulen	HisTrap™HP, GE Healthcare HiLoad 16/60 Superdex 200 Prep Grade, GE Healthcare HiPrep Desalting Column 26/10; GE Healthcare
Deckgläschen	siliziert, ø: 22mm, Dicke 0,22mm
Feinstaubmaske 3M	FFPI
Filtermembranen	Supor®; ø: 47mm; 0,45µm, Pall Supor®; ø: 47mm; 0,22µm, Pall
Gaskartuschen	camping gaz
Handschuhe, Latex und Nitril	Semperguard
Impfeschlingen	PS; 200mm; 10 µl, Greiner Bio-one GmbH
Konzentratoren	Amicon® Ultra-15 versch. MWCO, Millipore Vivaspin versch. MWCO, Vivaspin
Kryoröhrchen	CryoTubeVials; 1,8 ml, Nunc
Küvetten	Einmalküvetten 1,5 ml PMMA, Roth
Mikrotiterplatten	Microlon, 96K; 655080, Greiner bio-one GmbH Masterblock 96-well; 2ml, Greiner bio-one GmbH
PCR-Reaktionsgefäße	MicroAmp®, Applied Biosystems

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung, Firma
Pipettenspitzen	PP blau; 100-1000 µl, Peske PP weiß; 1-200 µl, Peske PP kristall; 0,1-10 µl, Peske
Reaktionsgefäße	15 ml und 50 ml Gamma sterilisiert, TPP 1,5 ml und 2 ml, Eppendorf
Spritzen	50 ml, BD 2 ml Norm-Jet, Henke Sass Wolf GmbH 1 ml Omnifix-F, Braun
Spritzenaufsatzfilter	Millex®-GS (0,22 µm), Millipore Millex®-GV (0,22 µm), Millipore Millex®-PVDF (0,45 µM) Millex®-GP Express (0,22 µM)
Zellophanfolien	GelAir Cellophane Support, BioRad

5.2. Geräte

Gerät	Bezeichnung, Firma
Agarose Gelelektrophorese-Appartur	MPI Werkstatt
Autoklav	Tecnomara
Blockthermostat	BT200, Kleinfeld Labortechnik
Brutschrank	Haraeus
Eismaschine	Ziegra
Filter- und Entgasappartur für Puffer	Nalgene
Fluoreszenzspektrometer	LS 50 B, Perkin Elmer FLUOstar Optima, BMG
Geltrockner	GelAir Dryer, BioRad
FPLC	ÄKTA™ Purifier 10, GE Healthcare ÄKTA™ Explorer 10, GE Healthcare ÄKTA™ 3D-Kit, GE Healthcare
Kühlkabinett	Schulz

Gerät	Bezeichnung, Firma
Kulturschüttler	Cellstar, Nunc Innova 3000, New Brunswick Scientific
Lichtmikroskop	Leica DM1RM, Leica
Magnetrührer	Ika-comimag RCT, Ika Labor Technik
Mikrowelle	R93-Sta, Sharp
Milli-Q-Anlage	PLUS Ultra Pure Water System, Millipore
PAGE Zubehör	Mighty Small II-System (8x7 cm), GE Healthcare Glasplatten (10x8 cm), GE Healthcare Aluplatten (10x8 cm), GE Healthcare Spacer (0,75 mm), GE Healthcare Kämme (0,75 mm, 10 well), GE Healthcare Gießkammern (12 Gele), GE Healthcare XCell Sure Lock Mini Cell, Invitrogene
PCR-Thermocycler	PCR System 2400, Perkin Elmer C1000 Thermal Cycler, Biorad
Peristaltikpumpe	EconoPump, BioRad
Uhr	Oregon Scientific
pH-Meter	pH-Meter 744, Calimatic pH-Meter 766, Knick
Photometer	UV/Vis Spectrometer Lambda 40, Perkin Elmer UV/Vis Spectrometer Lambda 20, Perkin Elmer
Pipetten	Pipetman, 2, 10, 20, 100, 1000 µl, Gilson 5 ml, 10 ml, 25 ml, Falcon
Quarz-Küvetten	Suprasil® Typ 105.251-QS, 3mm, Hellma
Sicherheitswerkbank	antair BSK, GLW
Spannungsquelle	PowerPac 300, BioRad E443, Consort
Thermomixer	5436, Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifier 250, Branson
UV-Tisch	Transilluminator, Herolab Image Reader, Herolab

Gerät	Bezeichnung, Firma
Vakuum Konzentrator	BA-VC-300 H, Bachhofer GmbH
Vortexer	Vortex Genie 2, Bender und Hobein
Waage	Santorius
Wasserbad	MT/2, Lauda
Zentrifugen	5417R (Rotor: F 45-30-11), Eppendorf Rotanta 46 RS, Hettich Sorvall RC-SB (Rotor: SS34), DuPont Instruments
Zentrifugenröhrchen	Sorvall

5.3. Plasmide

Tab. 5.1.: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide und deren Antibiotikaresistenz. Bei allen Konstrukten, die die Strukturgene des 20S Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* enthalten, wurde der Vektor *pRSET5a* benutzt.

Nummer	Plasmid	Resistenz	Quelle	in dieser Arbeit verwendete Abkürzung (Protein)
1	<i>pRSET5a_βHis₆_α (TA)</i>	Amp	Erika Seemüller	<i>wt</i>
2	<i>pRSET5a_αsynuclein 1-30_β T1A His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
3	<i>pRSET5a_αsynuclein 1-30_β T1A His₆_α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn aa 1-10 T1A
4	<i>pRSET5a_αsynuclein 1-120_β T1A His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
5	<i>pRSET5a_αsynuclein 1-120_β T1A His₆_α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn aa 1-30 T1A
6	<i>pRSET5a_αsynuclein 1-210_β T1A His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
7	<i>pRSET5a_αsynuclein 1-210_β T1A His₆_α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn aa 1-70 T1A
8	<i>pRSET5a_αsynuclein 1-420_β T1A His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
9	<i>pRSET5a_αsynuclein 1-420_β T1A His₆_α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn aa 1-140 T1A
10	<i>pRSET5a_αsynuclein 210-420_β T1A His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
11	<i>pRSET5a_αsynuclein 210-420_β T1A His₆_α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn aa 70-140 T1A
12	<i>pRSET5a_αsynuclein 300-420_β T1A His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
13	<i>pRSET5a_αsynuclein 300-420_β T1A His₆_α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn aa 100-140 T1A

5. Anhang

Nummer	Plasmid	Resistenz	Quelle	in dieser Arbeit verwendete Abkürzung (Protein)
14	<i>pRSET5a_asynuclein 360-420_β T1A His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
15	<i>pRSET5a_asynuclein 360-420_β T1A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn aa 120-140 T1A
16	<i>pRSET5a_asynuclein 390-420_β T1A His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
17	<i>pRSET5a_asynuclein 390-420_β T1A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn aa 130-140 T1A
18	<i>pRSET5a_β T1C His₆ α</i>	Amp	Erika Seemüller	T1C
19	<i>pRSET5a_β N24C S167C His₆ α C151A</i>	Amp	Mutagenese	N24C S167C C151A
20	<i>pRSET5a_β I26A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese	I26A
21	<i>pRSET5a_β I26C R165C His₆ α C151A</i>	Amp	Mutagenese	I26C R165C C151A
22	<i>pRSET5a_β G50A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese	G50A
23	<i>pRSET5a_β G50C G118C His₆ α C151A</i>	Amp	Mutagenese	G50C G118C C151A
24	<i>pRSET5a_β R70A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese	R70A
25	<i>pRSET5a_β R70A R71A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese	R70A R71
26	<i>pRSET5a_β R70C His₆ α E99C</i>	Amp	Mutagenese	R70C E99C
27	<i>pRSET5a_β R71A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese	R71A
28	<i>pRSET5a_β R71C His₆ α E65C</i>	Amp	Mutagenese	R71C E65C
29	<i>pRSET5a_β R71C His₆ α E65C C151A</i>	Amp	Mutagenese	R71C E65C C151A
30	<i>pRSET5a_β R71A His₆ α R115A</i>	Amp	Mutagenese	R71A R115A
31	<i>pRSET5a_β R71A His₆ α R115A K161A</i>	Amp	Mutagenese	R71A R115A K161A
32	<i>pRSET5a_β A78C His₆ α Y103C C151A</i>	Amp	Mutagenese	A78C Y103C C151A
33	<i>pRSET5a_β M93 asynuclein f.l. P94 His₆ α</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn β-loop
34	<i>pRSET5a_β M93 asynuclein f.l. P94 His₆</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
35	<i>pRSET5a_β G118A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese	G118A
36	<i>pRSET5a_β F133A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese	F133A
37	<i>pRSET5a_β F133C G136C His₆ α C151A</i>	Amp	Mutagenese	F133C G136C C151A
38	<i>pRSET5a_β G136A His₆ α</i>	Amp	Mutagenese	G136A
39	<i>pRSET5a_β His₆ α G19C A30C C151A</i>	Amp	Mutagenese	G19C A30C C151A
40	<i>pRSET5a_β His₆ α delta V54</i>	Amp	Mutagenese	Δ V54
41	<i>pRSET5a_β His₆ α delta V54 R55</i>	Amp	Mutagenese	Δ V54 R55
42	<i>pRSET5a_β His₆ α R57A L58A</i>	Amp	Mutagenese	R57A L58A
43	<i>pRSET5a_β His₆ α delta R57</i>	Amp	Mutagenese	Δ R57
44	<i>pRSET5a_β His₆ α delta R57 L58</i>	Amp	Mutagenese	Δ R57 L58
45	<i>pRSET5a_β His₆ α I59C C151A Y160C</i>	Amp	Mutagenese	I59C C151A Y160C
46	<i>pRSET5a_β His₆ α E60A</i>	Amp	Mutagenese	E60A
47	<i>pRSET5a_β His₆ α E60A E65A</i>	Amp	Mutagenese	E60A E65A
48	<i>pRSET5a_β His₆ α E60C K161C</i>	Amp	Mutagenese	E60C K161C
49	<i>pRSET5a_β His₆ α E65A</i>	Amp	Mutagenese	E65A
50	<i>pRSET5a_β His₆ α S95A</i>	Amp	Mutagenese	S95A
51	<i>pRSET5a_β His₆ α S95A Q98A</i>	Amp	Mutagenese	S95A Q98A
52	<i>pRSET5a_β His₆ α S95A Q98A E99A</i>	Amp	Mutagenese	S95A Q98A E99A

Nummer	Plasmid	Resistenz	Quelle	in dieser Arbeit verwendete Abkürzung (Protein)
53	<i>pRSET5a_βHis₆_α S95A Q98A E99A R115A</i>	Amp	Mutagenese	S95A Q98A E99A R115A
54	<i>pRSET5a_βHis₆_α S95A Q98A K161A E182A</i>	Amp	Mutagenese	S95A Q98A K161A E182A
55	<i>pRSET5a_βHis₆_α S95C R115C</i>	Amp	Mutagenese	S95C R115C
56	<i>pRSET5a_βHis₆_α S95C R115C C151A</i>	Amp	Mutagenese	S95C R115C C151A
57	<i>pRSET5a_βHis₆_α Q98A</i>	Amp	Mutagenese	Q98A
58	<i>pRSET5a_βHis₆_α Q98C R115C</i>	Amp	Mutagenese	Q98C R115C
59	<i>pRSET5a_βHis₆_α Q98C R115C C151A</i>	Amp	Mutagenese	Q98C R115C C151A
60	<i>pRSET5a_βHis₆_α Q98E</i>	Amp	Mutagenese	Q98E
61	<i>pRSET5a_βHis₆_α E99A</i>	Amp	Mutagenese	E99A
62	<i>pRSET5a_βHis₆_α E99C R115C</i>	Amp	Mutagenese	E99C R115C
63	<i>pRSET5a_βHis₆_α E99C R115C C151A</i>	Amp	Mutagenese	E99C R115C C151A
64	<i>pRSET5a_βHis₆_α E99Q</i>	Amp	Mutagenese	E99Q
65	<i>pRSET5a_βHis₆_α S95A R115A</i>	Amp	Mutagenese	S95A R115A
66	<i>pRSET5a_βHis₆_α R115A</i>	Amp	Mutagenese	R115A
67	<i>pRSET5a_βHis₆_α R115A K161A</i>	Amp	Mutagenese	R115A K161A
68	<i>pRSET5a_βHis₆_α R115K</i>	Amp	Mutagenese	R115K
69	<i>pRSET5a_βHis₆_α Y103A</i>	Amp	Mutagenese	Y103A
70	<i>pRSET5a_βHis₆_α G127A</i>	Amp	Mutagenese	G127A
71	<i>pRSET5a_βHis₆_α G127A G128A</i>	Amp	Mutagenese	G127A G128A
72	<i>pRSET5a_βHis₆_α G127F</i>	Amp	Mutagenese	G127F
73	<i>pRSET5a_βHis₆_α G127F G128F</i>	Amp	Mutagenese	G127F G128F
74	<i>pRSET5a_βHis₆_α G128A</i>	Amp	Mutagenese	G128A
75	<i>pRSET5a_βHis₆_α G128F</i>	Amp	Mutagenese	G128F
76	<i>pRSET5a_βHis₆_α G128 asynuclein f.l. V129</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	α-syn α-loop
77	<i>pRSET5a_α G128 asynuclein f.l. V129</i>	Amp	Mutagenese, Klonierung	-
78	<i>pRSET5a_βHis₆_α C151A</i>	Amp	Mutagenese	C151A
79	<i>pRSET5a_βHis₆_α C151A K161C Y180C</i>	Amp	Mutagenese	C151A K161A Y180A
80	<i>pRSET5a_βHis₆_α Y160A</i>	Amp	Mutagenese	Y160A
81	<i>pRSET5a_βHis₆_α K161A</i>	Amp	Mutagenese	K161A
82	<i>pRSET5a_βHis₆_α K161C Y180C</i>	Amp	Mutagenese	K161C Y180C
83	<i>pRSET5a_βHis₆_α K161C E182C</i>	Amp	Mutagenese	K161C E182C
84	<i>pRSET5a_β R165A His₆_α</i>	Amp	Mutagenese	R165C
85	<i>pRSET5a_βHis₆_α Y180A</i>	Amp	Mutagenese	Y180A
86	<i>pRSET5a_βHis₆_α Y180A E182A</i>	Amp	Mutagenese	Y180A E182A
87	<i>pRSET5a_βHis₆_α E182A</i>	Amp	Mutagenese	E182A
88	<i>pRSET5a_βHis₆_α E205A</i>	Amp	Mutagenese	E205A
89	<i>pRSET5a_βHis₆_α E205A E206A</i>	Amp	Mutagenese	E205A E206A
90	<i>pRSET5a_βHis₆_α E206A</i>	Amp	Mutagenese	E206A
91	<i>pET 28a asynuclein</i>	Kan	Remco Spangers	α-Synuclein wt
92	<i>pProEX HTb asynuclein 1-210</i>	Amp	Remco Spangers	α-Synuclein aa 1-70
93	<i>pProEX HTb asynuclein 210-420</i>	Amp	Remco Spangers	α-Synuclein aa 70-140

His₆-tags, die mit den C-Termini der β -Untereinheiten des 20S Proteasoms fusioniert sind, liegen im vollständig assemblierten 20S Proteasom an den Aussenseiten und üben keinen Einfluß auf die proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms aus [Dahlmann et al. 1992].

5.4. Primer

Tab. 5.2.: Sequenzen der verwendeten Primer

Nummer	Funktion	Template	Sequenz
1	Einführung einer NdeI-Schnittstelle vor Beginn des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	5'- CTT TAA GAA GGA GAT ATC ATA TGG ATG -3'
2	Einführung einer NdeI-Schnittstelle in der Mitte des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	5'-GTT GGA GGA CAT ATG GTG ACG GGT G-3'
3	Einführung einer KasI-Schnittstelle in der Mitte des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	5'-GTC ACA CCG GCG CCC ACT GCT CCT C-3'
4	Einführung einer KasI-Schnittstelle am Ende des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	5'-GGC CGC AAG GGC GCC GGC TTC AGG-3'
5	Einführung einer KasI-Schnittstelle nach bp 60 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-GGC TGC TGC TGA GGG CGC CAA ACA GGG TGT GGC-3' Antisense: 5'-GCC ACA CCC TGT TTG GCG CCC TCA GCA GCA GCC-3'
6	Einführung einer KasI-Schnittstelle nach bp 120 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-CTC TAT GTA GGC GCC AAA ACC AAG GAG GG-3' Antisense: 5'-CCC TCC TTG GTT TTG GCG CCT ACA TAG AG-3'
7	Einführung einer NdeI-Schnittstelle vor bp 360 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-GGA ATT CTG GAA GAT ATG CCT GTG CAT ATG GAC AAT GAG GC-3' Antisense: 5'-GCC TCA TTG TCC ATA TGC ACA GGC ATA TCT TCC AGA ATT CC-3'
8	Einführung einer NdeI-Schnittstelle nach bp 300 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-GCC ACT GGC TTT GTC AAA AAG GAC CAT ATG GGC AAG- 3' Antisense: 5'-CTT GCC CAT ATG GTC CTT TTT GAC AAA GCC AGT GGC-3'
9	Einführung einer NdeI-Schnittstelle vor bp 120 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-GCA GCA GGA AAG ACA AAA GAG GGT GTT CAT ATG GTA GGC TCC-3' Antisense: 5'-GGA GCC TAC CAT ATG AAC ACC CTC TTT TGT CTT TCC TGC TGC-3'
10	Einführung einer KasI-Schnittstelle nach bp 300 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-GCC CCA CAG GGC GCC ATT CTG GAA GAT ATG CCT GTG GAT CC-3' Antisense: 5'-GGA TCC ACA GGC ATA TCT TCC AGA ATG GCG CCC TGT

Nummer	Funktion	Template	Sequenz
			GGG GC-3'
11	Einführung einer KasI-Schnittstelle nach bp 30 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-GAA AGG ACT TTC AAA GGG CGC CGA GGG AGT TGT GGC TGC TGC TGA G-3' Antisense: 5'-CTC AGC AGC AGC CAC AAC TCC CTC GGC GCC CTT TGA AAG TCC TTT C-3'
12	Einführung einer NdeI-Schnittstelle vor bp 120 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-CCA AAC AGG GTG TGG CAC ATA TGG CAG GAA AGA CAA AAG AGG GTG-3' Antisense: 5'-CAC CCT CTT TTG TCT TTC CTG CCA TAT GTG CCA CAC CCT GTT TGG -3'
13	Einführung einer KasI-Schnittstelle nach bp 390 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-GGC TTA TGA AAT GCC TTC TGG CGC CGG GTA TCA AGA CTA CGA ACC-3' Antisense: 5'-GGT TCG TAG TCT TGA TAC CCG GCG CCA GAA GGC ATT TCA TAA GCC-3'
14	Einführung einer NdeI-Schnittstelle vor bp 390 des Strukturgens	<i>pET 28a_asyuclein</i>	Sense: 5'-GGA CAA TGA GGC TTA TGA AAT GCA TAT GGA GGA AGG GTA TCA AGA C-3' Antisense: 5'-GTC TTG ATA CCC TTC CTC CAT ATG CAT TTC ATA AGC CTC ATT GTC C-3'
15	Deletion eines Adenins im Religationsansatz zur Herstellung des Plasmids <i>pRSET5a_βHis₆_α G128 asyuclein f.l. V129</i> , Erhaltung des Leserasters	<i>Religationsansatz zur Herstellung des Plasmids pRSET5a_βHis₆_α G128 asyuclein f.l. V129</i>	Sense: 5'-CCA GAT GCA GCA GTA CCA TAT GGA TGT ATT CAT GAA AGG-3' Antisense: 5'-CCT TTC ATG AAT ACA TCC ATA TGG TAC TGC TGC ATC TGG-3'
16	Insertion eines Adenins im Religationsansatz zur Herstellung des Plasmids <i>pRSET5a_βHis₆_α G128 asyuclein f.l. V129</i> , Erhaltung des Leserasters	<i>Religationsansatz zur Herstellung des Plasmids pRSET5a_βHis₆_α G128 asyuclein f.l. V129</i>	Sense: 5'-GAC AAA TGT TGG AGG AGC AGT GGT GAC GGG-3' Antisense: 5'-CCC GTC ACC ACT GCT CCT CCA ACA TTT GTC-3'
17	Austausch eines Threonins zu Alanin im Religationsansatz Herstellung des Plasmids <i>pRSET5a_βHis₆_α G128 asyuclein f.l. V129</i> , Erhaltung der Sequenz	<i>Religationsansatz zur Herstellung des Plasmids pRSET5a_βHis₆_α G128 asyuclein f.l. V129</i>	Sense: 5'-GAC AAA GCC AGT GGC TGC TGC AAT GCT CCC-3' Antisense: 5'-GGG AGC ATT GCA GCA GCC ACT GGC TTT GTC-3'
18	Mutation des Cysteins 151 der α-Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆_α</i>	Sense: 5'-CGG CC CAA GGC TGT TCG ACG CTG ATC CCG CCG GTA CTA TAA ATG-3' Antisense: 5'-CAT TTA TAG TAC CGG CGG GAT CAG CGT CGA ACA GCC TTG GGC CG-3'
19	Mutation des Tyrosins 160 der α-Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆_α C151A</i>	Sense: 5'-GCC GGT ACT ATA AAT GAG TGC AAG GCA ACG G-3' Antisense: 5'-CCG TTG CCT TGC ACT CAT TTA TAG TAC CGG C-3'
20	Mutation des Isoleucins 59 der α-Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆_α C151A</i>	Sense: 5'-CCG ATA AGA AGG TAA GAA GCA GAC TTT GCG AGC AGA ATT CAA TTG-3' Antisense: 5'-CAA TTG AAT TCT GCT CGC AAA GTC TGC TTC TTA CCT

Nummer	Funktion	Template	Sequenz
			TCT TAT CGG-3'
21	Mutation des Glycin 19 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-CAC CAG ATT GCA GAC TTT TCC AGG TAG AGT ATG CAA GGG AAG C-3' Antisense: 5'-GCT TCC CTT GCA TAC TCT ACC TGG AAA AGT CTG CAA TCT GGT G-3'
22	Mutation des Alanin 30 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-CCA GGT AGA GTA TGC AAG GGA ATG CGT TAA GAA AGG TTC AAC GGC-3' Antisense: 5'-GCC GTT GAA CCT TTC TTA ACG CAT TCC CTT GCA TAC TCT ACC TGG-3'
23	Mutation des Tyrosin 103 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-GCA GGA AAA GGT AAC GTG CGG ATC GCT TGT AAA TAT TGA G-3' Antisense: 5'-CTC AAT ATT TAC AAG CGA TCC GCA CGT TAC CTT TTC CTG C-3'
24	Mutation des Alanin 78 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-GAG AAG AGT AAA CAT GCC AAT AGA GTG CGT TGC CAC TCT GCT TTC-3'
25	Mutation des Glycin 50 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-GAC AAT AGC CGG CCT TGT GTG CGA TGC CCA AGT ACT GG-3' Antisense: 5'-CCA GTA CTT GGG CAT CGC ACA CAA GGC CGG CTA TTG TC-3'
26	Mutation des Glycin 118 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-CCA TAG ATG CGG CTG GAT GCT CCG TTG AGG ATA TCT ATG CC-3' Antisense: 5'-GGC ATA GAT ATC CTC AAC GGA GCA TCC AGC CGC ATC TAT GG-3'
27	Mutation des Arginin 165 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-GGG CCA TAA GCG CGG CAA AGC AGT GCG ATT CAG CAT CTG G-3' Antisense: 5'-CCA GAT GCT GAA TCG CAC TGC TTT GCC GCG CTT ATG GCC C-3'
28	Mutation des Isoleucin 26 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-GGC GTG TCA CAA TGG AGA ATT TCT GCA TGC ACA AGA ATG G-3' Antisense: 5'-CCA TTC TTG TGC ATG CAG AAA TTC TCC ATT GTG ACA CGC C-3'
29	Mutation des Asparagin 24 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-GGC GTG TCA CAA TGG AGT GCT TCA TCA TGC ACA AGA ATG G-3' Antisense: 5'-CCA TTC TTG TGC ATG ATG AAG CAC TCC ATT GTG ACA CGC C-3'
30	Mutation des Serin 167 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-GCG CGG CAA AGC AGA GGG ATT GCG CAT CTG GAG GTA TG-3' Antisense: 5'-CAT ACC TCC AGA TGC GCA ATC CCT CTG CTT TGC CGC GC-3'

Nummer	Funktion	Template	Sequenz
31	Mutation des Phenylalanin 133 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-GCA CAG GAT CAG GCT CAC CAT GCG TAT ACG GCG-3' Antisense: 5'-CGC CGT ATA CGC ATG GTG AGC CTG ATC CTG TGC-3'
32	Mutation des Glycin 136 der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Cystein	<i>pRSET5a_βHis₆α C151A</i>	Sense: 5'-CAG GCT CAC CAT TCG TAT ACT GCG TTC TCG AAT CGC AG-3' Antisense: 5'-CTG CGA TTC GAG AAC GCA GTA TAC GAA TGG TGA GCC TG-3'
33	Mutation des Arginin 57 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-CCG ATA AGA AGG TAA GAA GCG CTC TTA TTG AGC AGA ATT C-3' Antisense: 5'-GAA TTC TGC TCA ATA AGA GCG CTT CTT ACC TTC TTA TCG G-3'
34	Deletion des Arginin 57 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-CCG ATA AGA AGG TAA GAA GCC TTA TTG AGC AGA ATT CAA TTG-3' Antisense: 5'-CAA TTG AAT TCT GCT CAA TAA GGC TTC TTA CCT TCT TAT CGG-3'
35	Deletion des Leucin 58 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-GAT ATC CGA TAA GAA GGT AAG AAG CAT TGA GCA GAA TTC AAT TG-3' Antisense: 5'-CAA TTG AAT TCT GCT CAA TGC TCT TAC CTT CTT ATC GGA TAT C-3'
36	Deletion des Valin 54 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-GCT CTT GAT ATC CGA TAA GAA GAG AAG CAG ACT TAT TGA GC-3' Antisense: 5'-GCT CAA TAA GTC TGC TTC TCT TCT TAT CGG ATA TCA AGA GC-3'
37	Deletion des Arginin 55 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-GCT CTT GAT ATC CGA TAA GAA GAG CAG ACT TAT TGA GC-3' Antisense: 5'-GCT CAA TAA GTC TGC TCT TCT TAT CGG ATA TCA AGA GC-3'
38	Mutation des Arginin 57 und Leucin 58 der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-CCG ATA AGA AGG TAA GAA GCG CTG CTA TTG AGC AGA ATT C-3' Antisense: 5'-GAA TTC TGC TCA ATA GCA GCG CTT CTT ACC TTC TTA TCG G-3'
39	Mutation des Arginin 86 und der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-CCG GGC TGG TGG CAG ACG CGG CTG TAC TTG TGG ACT TTG CC-3' Antisense: 5'-GGC AAA GTC CAC AAG TAC AGC CGC GTC TGC CAC CAG CCC GG-3'
40	Mutation des Aspartat 118 und der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-CTA GTT AAG AGA GTT GCT GCT CAG ATG CAG CAG TAC ACA C-3' Antisense: 5'-GTG TGT ACT GCT GCA TCT GAG CAG CAA CTC TCT TAA CTA G-3'
41	Mutation des Aspartat 90 und	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5'-CGC GAG AGT ACT TGT

Nummer	Funktion	Template	Sequenz
	der α -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin		GGC TTT TGC CAG GAT AAG CGC CC-3'
42	Mutation des Arginin 67 und der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5' - GGC AGA GCT TGA ACT TTA CGC TCT CCA GAG AAG AGT AAA CAT GC-3'
43	Mutation des Glutamat 64 und der β -Untereinheit des 20S Proteasoms zu Alanin	<i>pRSET5a_βHis₆α</i>	Sense: 5' - CGT ATA TGA AGG CAG AGC TTG CTC TTT ACA GGC TCC AGA GAA GAG-3' Antisense: 5' - CTC TTC TCT GGA GCC TGT AAA GAG CAA GCT CTG CCT TCA TAT ACC-3'

5.5. Massenspektrometrische Analyse der Schnittstellen in Bodipy FL Casein zu verschiedenen Verdauzeitpunkten

Die in der massenspektrometrischen Analyse identifizierten Schnittstellen sind als Pfeile dargestellt, Peptide in der Referenz in blau, Peptide im Verdau in orange.

Full β -Casein, 224aa, P02666

Referenz

mkvlilacLv alalarelee lnvgeives lssseesitr inkkiekfqs eeqqqtede
qdkihpfaqt qslvypfpgp ipnslpqnip pltqtpvvvp pflqpevmgv skvkeamapk
hkempfpkyp vepftesqsl tldvenlhl plpllqswmh qhqqlpptv mfppqsvlsl
sqskvlpvqp kavpypqrdm piqaflllyqe pvlgpvrgpf piiv

0 min

mkvlilacLv alala↓relee↓ l↓nvpg↓e↓ive↓s lssseesitr inkkiekfqs eeqqqtedel
qdkihpfaqt qslvypfpgp ipnslpqnip pltqtpvvvp pflqpevmgv skvkeamapk
hk↓empfpk↓yp vepf↓tesqsl tldve↓nlhl plpllqswmh qhqqlpptv mfppqsvlsl
sqskvlpvqp ka↓vpyppq↓rdm piqaf↓llyqe pvl↓gpvrgpf piiv

30 sec

mkvlilacLv alala↓relee lnv↓p↓ge↓ive↓s lssseesitr inkkiekfqs eeqqqtedel
qdkihpfaqt qslvypfpgp ipn↓slpqnip pltq↓tpvvvp pflqpevmgv skvkeamapk
hkempfpkyp vepftes↓qsl t↓ldven↓lhl plpllqs↓wmh qhqqlpptv m↓fppqsvl↓sl↓
sqskvlpvqp ka↓vpyppq↓rdm piqa↓f↓llyqe e pv↓l↓gpvrg↓pf piiv↓

1 min

mkvlilacLv alala↓relee lnv↓p↓ge↓ive↓s↓ lssseesitr inkkiekfqs eeqqqte↓del
qdkihp↓faqt qslvypfpgp ipnslpqnip pltqtp↓vvvp pflqpevmgv skv↓keamapk
hkempfpkyp vepftes↓qsl t↓ldvenlhl plpllqs↓wmh qhqqlpptv m↓fppqs↓vl↓sl↓

sqskvlpvpg ka↓vpypq↓rdm piq↓af↓llyq↓e pvlgpvrg↓pf piiv

10 min

mklilacvl alala↓relee l↓nv↓pge↓ive↓s lssseesitr inkkieqfs eeqqqt↓edel
 qd↓ki↓hpfaqt qslvypfpgp ipn↓slpqnip pltqt↓tpvvvp pflqpevmg↓v skvkeamapk
 hk↓empfpk↓yp vepftes↓qs↓l ↓tl↓tdv↓enlhl↓ plpllqs↓wmh q↓p↓hqpplpvt↓
 m↓f↓ppqs↓vl↓sl↓
 sq↓sk↓vlpvpg↓ k↓a↓vpypq↓rdm↓ piq↓a↓f↓l↓l↓yq↓e pvlgpvrg↓pf piiv

30 min

mklilacvl alala↓relee l↓nv↓pge↓i↓ives↓ lssseesitr inkkieqfs eeqqqt↓edel
 qd↓ki↓hpfaqt q↓slvypfpgp ipn↓slpqnip pltqt↓tpvvvp pflqpevmg↓v
 skvkeamapk
 hkempfpky↓p vepftes↓qs↓l ↓tl↓tdv↓enlhl↓ plpllqs↓wmh q↓p↓hqpplpvt↓
 m↓f↓ppq↓svl↓sl↓
 sqskvlpvpg k↓a↓vpypq↓rdm↓ piq↓a↓f↓l↓l↓yq↓e pvlgpvrg↓pf pii↓v

α-s1-Casein, 214aa, P02662

Referenz

mklilacvl avalarpkhp ikhgglpgev lnenllrffv apfpevfge kvnelkdig
 sestedqame dikqmeaesi ssseeivpns veqkhiqked vpserylgyl eqlrlkkyk
 vpqleivpns aerlshsmke gihaqqkepm igvnqelayf ypelfrqfyq ldaypsgaw
 yvplgtqytd apsfdsdipnp **igsensekt mplw**

0 min

mklilacvl avalarpkhp ikhgglpgev lnenllrffv apfpevfge kvnelkdig
 sestedqame di↓kqmeaesi sss↓eeivpns veqkhiqked vpserylgyl eqlrlkkyk
 vpqleivpns aerlshsmke gihaqqkepm igvnqelayf ypelfrqfyq ldaypsgaw
yvplgtqytd apsf↓sdipnp igsen↓sekt mplw

30 sec

mklilacvl avalarpkhp ikhgglpgev lnenllrffv apfpevfge kvnelkdig
 sestedqame di↓kqmeaesi sss↓eeivpns veqkhiqked vpserylgyl eqlrlkkyk
 vpqleivpns aerlshsmke gihaqqkepm igvnqelayf ypelfrqfyq ldaypsgaw
yvplgtqytd apsf↓sdipnp igsen↓sekt mplw

1 min

mklilacvl avalarpkhp ikhgglpgev lnenllrffv apfpevfge kvnelkdig
 sestedqame dikqmeaesi ssseeivpns veqkhiqked vpserylgyl eqlrlkkyk
 vpqleivpns aerlshsmke gihaqqkepm igvnqelayf ypelfrqfyq ldaypsgaw
yvplgtqytd apsf↓sdipnp igsen↓sekt mplw

10 min

mklilacvl avalarpkhp ikhgglpgev lnenllrffv apfpevfge kvnelkdig
 sestedqame dikqmeaesi ssseeivpns veqkhiqked vpserylgyl eqlrlkkyk
 vpqleivpns aerlshsmke gihaqqkepm igvnqelayf ypelfrqfyq ldaypsgaw
ldaypsgaw yvplgtqytd apsf↓sdipnp igsen↓sekt mplw

30 min

mkl1iltclv avararpkhp ikh↓qg↓lpqev ↓lne↓nllrf↓f↓v↓ apfpevfg↓ke kvnelksdig
sestedqame dikqmeaesi ssseeivpns veqkhiqk↓e↓d vpseryl↓g↓y↓l ↓eqllrl↓kkyk
v↓pqlei↓vpns a↓eerlhs↓mke giha↓qqkepm igvn↓qe↓l↓a↓yf y↓pel↓frq↓f↓y↓q↓
l↓da↓ypsg↓a↓wy↓
y↓v↓plgt↓q↓y↓t↓d↓ a↓psf↓s↓dipn↓p ig↓sen↓s↓ekt↓t↓ m↓plw

Full kappa-Casein, 190aa, P02668

Referenz

mmksfflvvt ilaltlpflg aeqnqeppi rcekderffs dkiakyipiq yvlsrypsyg
lnyyqqkpva linnqflpyp yyakpaavrs paqilqwqvl sntvpakscq aqpttmarhp
hphlsfmaip pkknqdktei ptintiasge ptstptteav estvatleds **peviesppei**
ntvqvtstav

0 min

mmksfflvvt ilaltlpflg aeqnqeppi rcekderffs dkiakyipiq yvlsrypsyg
lnyyqqkpva linnqflpyp yyakpaavrs paqilqwqvl sntvpakscq aqpttmarhp
hphlsfmaip pkknqdktei ptintiasge ptstptteav estvatleds peviesppei
n↓**tvqvtstav**

30 sec

mmksfflvvt ilaltlpflg aeqnqeppi rcekderffs dkiakyipiq yvlsrypsyg
lnyyqqkpva linnqflpyp yyakpaavrs paqilqwqvl sntvpakscq aqpttmarhp
hphlsfmaip pkknqdktei ptintiasge ptstptteav estvatleds peviesppei
n↓**tvqvtstav**

1 min - keine

mmksfflvvt ilaltlpflg aeqnqeppi rcekderffs dkiakyipiq yvlsrypsyg
lnyyqqkpva linnqflpyp yyakpaavrs paqilqwqvl sntvpakscq aqpttmarhp
hphlsfmaip pkknqdktei ptintiasge ptstptteav estvatleds peviesppei
ntvqvtstav

10 min

mmksfflvvt ilaltlpflg aeqnqeppi rcekderffs dkiakyipiq yvl↓**srypsyg**
l↓nnyqqkpva linnqflpyp yyakpaa↓**vrs paqi**↓lqwqvl sntvpakscq aqpttmarhp
hphlsfmaip pkknqdktei ptintiasge ptstptteav estvatleds peviesppei
n↓**tvqvtstav**

30 min

mmksfflvvt ilaltlpflg aeqnqeppi rcekderffs dkiakyipiq yv↓l↓**srypsyg**
l↓ny↓yqqkpva li↓**nnqflpyp yya**↓kpa↓**vrs paqi**↓lqwqvl sn↓tvpakscq aqpttmarhp
hphlsfmaip pkknqdktei ptintiasge ptstptteav estvatleds peviesppei
n↓**tvqvtstav**

Hypothetical protein, 466aa, Q0VC49

Referenz

```
melrvgnkyr lgrkigsgsf gdiylgania sgeevaikle cvktkhpqlh ieskfykmmq
ggvgipsikw cgaegdynam vmellgpsle dlfnfcsr kf slktvlllad qmisrieyih
sknfihrdvk pdnflmglgk kgnlvyyidf glakkyrdar thqhipyren knltgtarya
sinthlgieq srrddleslg yvlmyfnlgs lpwqglkaat krqkyerise kkmstpievl
ckgypsefst ylnfcrslrf ddkpdysylr qlfrnlfhrq gfsydyvfdw nmlkfvslk
aeagmgdwtg kanvtlwwag lpeagsyeld gtrdphssfi radslccrgg qggggvppps
gperahlgp svldawvsga rmalvgpptv lilacsvlll vsctcqlaaf aesplasldp
fivasfslvv apwvllgtsl fslslkscgg gvgrsvqplg lglnrl
```

0 min

```
melrvg↓nkyr 1↓grkigsgsf gdiylgania sgeevaikle cvktkhpqlh ieskfykmmq
ggvgipsikw cgaegdynam vmellgpsle dlfnfcsr kf slktvlllad qmisrieyih
sknfihrdvk pdnflmglgk kgnlvyyidf glakkyrdar thqhipyren knltgtarya
sinthlgieq srrddleslg yvlmyfnlgs lpwqglkaat krqkyerise kkmstpievl
ckgypsefst ylnfcrslrf ddkpdysylr qlfrnlfhrq gfsydyvfdw nmlkfvslk
aeagmgdwtg kanvtlwwag lpeagsyeld gtrdphs↓sfi rads↓lccrgg qggggvppps
gperahlgp svldawvsga rmalvgpptv lilacsvlll vsctcqlaaf aesplasldp
fivasfslvv apwvllgtsl fslslkscgg gvgrsvqplg lglnrl
```

30 sec

```
melrvgnkyr lgrkigsgsf gdiylgania sgeevaikle cvktkhpqlh ieskfykmmq
ggvgipsikw cgaegdynam vmellgpsle dlfnfcsr kf slktvlllad qmisrieyih
sknfihrdvk pdnflmglgk kgnlvyyidf glakkyrdar thqhipyren knltgtarya
sinthlgieq srrddleslg yvlmyfnlgs lpwqglkaat krqkyerise kkmstpievl
ckgypsefst ylnfcrslrf ddkpdysylr qlfrnlfhrq gfsydyvfdw nmlkfvslk
aeagmgdwtg kanvtlwwag lpeagsyeld gtrdphs↓sfi rads↓lccrgg qggggvppps
gperahlgp svldawvsga rmalvgpptv lilacsvlll vsctcqlaaf aesplasldp
fivasfslvv apwvllgtsl fslslkscgg gvgrsvqplg lglnrl
```

1 min

```
melrvg↓nkyr 1↓grkigsgsf gdiylgania sgeevaikle cvktkhpqlh ieskfykmmq
ggvgipsikw cgaegdynam vmellgpsle dlfnfcsr kf slktvll↓lad qmisri↓eyih
sknfihrdvk pdnflmglgk kgnlvyyidf glakkyrdar thqhipyren knltgtarya
sinthlgieq srrddleslg yvlmyfn↓lgs lpwqglkaat krqkyerise kkmstpievl↓
ckgypse↓fst ylnfcrslrf ddkpdysylr qlfrnlfhrq gfsydyvfdw nmlkfvslk
aeagmgdwtg kanvtlwwag lpeagsyeld gtrdphs↓sfi rads↓lccrgg qggggvppps
gperahlgp svlda↓wvsga rmalvgpptv↓ lilacsvlll vsctcqlaaf aesplasldp
fivasfslvv apwvllgtsl fslslkscgg gvgrsvqplg lglnrl
```

10 min

```
melrvgnkyr lgrkigsgsf gdiylgania sgeevaikle cvktkhpqlh ie↓skfykm↓mq
ggvgipsikw cgaegdynam vmellgpsle dlfnfcsr kf slktvlllad qmisrieyih
sknfihrdvk pdnflmglgk kgnlvyyidf glakkyrdar thqhipyren knltgtarya
sinthlgieq srrddleslg yvlmyfnlgs lpwqglkaat krqkyerise kkmstpievl
ckgypsefst ylnfcrslrf ddkpdysylr qlfrnlfhrq gfsydyvfdw nmlkfvslk
aeagmgdwtg kanvtlwwag lpeagsyeld gtrdphs↓sfi rads↓lccrgg qggggvppps
gperahlgp svldawvsga rmalvgpptv lilacsvlll vsctcqlaaf aesplasldp
fivasfslvv apwvllgtsl fslslkscgg gvgrsvqplg lglnrl
```

30 min

melrvgnkyr lgrkigsgsf gdiylgania sgeevaikle cvktkhphlh ie↓skfykm↓mq
ggvgipsikw cgaegdynam vmellgpsle dlfnfcsrkf slktvlllad qmisrieyih
sknfihrdvk pdnflmglgk kgnlvviidf glakkyrdar thqhipyren knltgtarya
sinthlgieq srrddleslg yvlmyfnlgs lpwqglkaat krqkyerise kkmstpievl
ckgypsefst ylnfcrslrf ddkpdysylr qlfrnlfhrq gfsydyvfdw nmlkfvslk
aeagmgdwtg k↓anvtlwag lpe↓agsyeld gtrdphs↓sfi rads↓ccrgq qpggvppps
gperahlgp svldawvsga rmalvgpvtv lilacsவில் vsctcqlaaf aesplasldp
fivasfslv apwvllgtsl fslslkscgg gvgrsvqplg lglnl

Casein kinase isoform beta, 336aa, P35507

Reference

masssrpktd vlvggryklv reigfgsfgh vylaidltnh eqvavklese ntrqprllhe
kelynlqgg vgipqirwyg qetdynvlvm dllgpsledl fnfcsrrfsm ktvlmladqm
isrieyvhsr nlihrdikpd nflmgtgpqw kklflvdfgl akkyrdnrtg qhiphrsgks
figtpfcasi sahlgieqsr rddmesigyv lmyfnrgslp wqglkaatlk qkcekisemk
mttpvdlck gfpiefamyl kyclrlsf ee apdyrylrql frllfrklsy qhdyafdwiw
lkqkaeqqas sssgegqqaq tptgksdntk semkhs

0 min - keine

masssrpktd vlvggryklv reigfgsfgh vylaidltnh eqvavklese ntrqprllhe
kelynlqgg vgipqirwyg qetdynvlvm dllgpsledl fnfcsrrfsm ktvlmladqm
isrieyvhsr nlihrdikpd nflmgtgpqw kklflvdfgl akkyrdnrtg qhiphrsgks
figtpfcasi sahlgieqsr rddmesigyv lmyfnrgslp wqglkaatlk qkcekisemk
mttpvdlck gfpiefamyl kyclrlsf ee apdyrylrql frllfrklsy qhdyafdwiw
lkqkaeqqas sssgegqqaq tptgksdntk semkhs

30 sec - keine

masssrpktd vlvggryklv reigfgsfgh vylaidltnh eqvavklese ntrqprllhe
kelynlqgg vgipqirwyg qetdynvlvm dllgpsledl fnfcsrrfsm ktvlmladqm
isrieyvhsr nlihrdikpd nflmgtgpqw kklflvdfgl akkyrdnrtg qhiphrsgks
figtpfcasi sahlgieqsr rddmesigyv lmyfnrgslp wqglkaatlk qkcekisemk
mttpvdlck gfpiefamyl kyclrlsf ee apdyrylrql frllfrklsy qhdyafdwiw
lkqkaeqqas sssgegqqaq tptgksdntk semkhs

1 min

masssrpktd vlvggryklv reigfgsfgh vylaidltnh eqvavklese ntrqprllhe
kelynlqgg vgipqirwyg qetdynvlvm dllgpsledl fnfcsrr↓fsm ktvlmladq↓m
isr↓ieyvhsr n↓lihrdikpd nflmgtgpqw kklflvdfgl akkyrdnrtg qhiphrsgks
figtpfcasi sahlgieqsr rddmesigyv lmyfnrgslp wqglkaatlk qkcekisemk
mttpvdlck gfpiefamyl kyclrlsf ee apdyrylrql frllfrklsy qhdyafdwiw
lkqkaeqqas sssgegqqaq tptgksdntk semkhs

10 min

masss↓rpkt↓v vlvggryklv reigfgsfgh vylaidltnh eqvavklese ntrqprllhe
kelynlqgg vgipqirwyg qetdynvlvm dllgpsledl fnfcsrrfsm ktvlmladqm
isrieyvhsr nlihrdikpd nflmgtgpqw kklflvdfgl akkyrdnrtg qhiphrsgks

figtpcfasi sahlgieqsr rddmesigyv lmyfnrgslp wqglkaatlk qkcekisemk
 mtppvdlck gfpiefamyl kyclrslfee apdyrylrql frllfrklsy qhdyafdwiw
 ↓lkqkaeqqas sssge↓gqqaq tptgksdntk semkhs

30 min

masssrpctd vlvggryklv reigfgsfgh vylaidltnh eqvavklese ntrqprllhe
 kelynflqgg vgipqirwyg qetdynvlvm dllgpsledl fnfcsrrfsm ktvlmladqm
 isr↓ieyvhsr n↓lihrdikpd nflmgtgpqw kklflvdfgl akkyrdnrtg qhiphrsgks
 figtpcfasi sahlgieqsr rddmesigyv lmyfnrgslp wqglkaatlk qkcekisemk
 mtppvdlck gfpiefamyl kyclrslfee apdyrylrql frllfrklsy qhdyafdwiw
 lkqkaeqqas sssgegqqaq tptgksdntk semkhs

5.6. Kinetische Analyse verschiedener Mutanten des 20S Proteasoms

Die Reaktionsgeschwindigkeit bei der jeweiligen Substratkonzentration wurde durch lineare Regression der gemessenen Kurven nach Injektion der 20S Proteasommutanten berechnet und über drei Messungen innerhalb einer Platte gemittelt. Zusätzlich wurde die Standardabweichung der drei Messungen voneinander ermittelt. Zur Berechnung der kinetischen Konstanten wurden die ermittelten Messwerte mittels nichtlinearer Regression an Gleichung (5.1) angeglichen. Hierfür wurde das Programm Igor Pro 5.00 verwendet. Igor Pro 5.00 berechnet nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate die Koeffizienten, deren jeweilige Standardabweichungen und die Güte des Kurvenfits χ^2 . χ^2 gibt an, wie nah die gemessenen Werte und das gefittete Model aneinander liegen und stellt eine Möglichkeit dar, die Güte des Kurvenfits zu bestimmen.

$$\frac{v}{[E]} = \frac{\alpha_1[S] + \alpha_2[S]^2 + \dots + \alpha_n[S]^n}{1 + \beta_1[S] + \beta_2[S]^2 + \dots + \beta_n[S]^n}$$

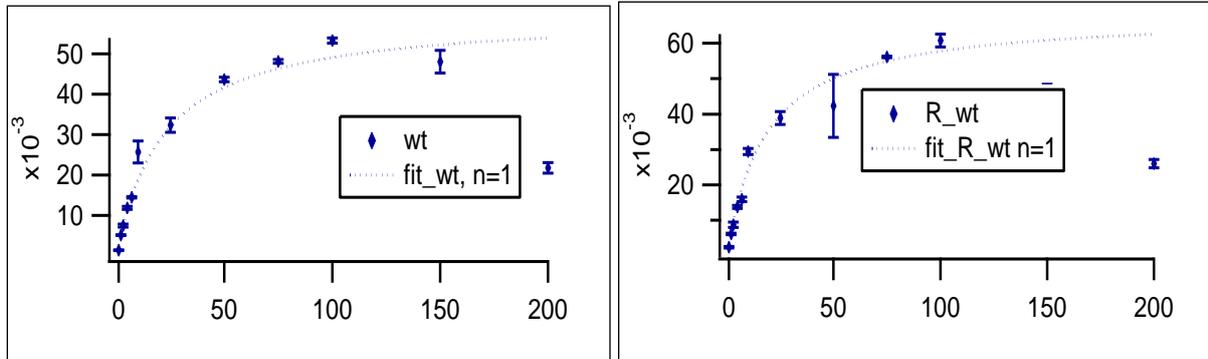
Gleichung 5.1: Berechnung des Kurvenfits zur Bestimmung von kinetischen Parametern nach Bardsely et al. (1979).

Im Folgenden sind die Kurvenfits für jede Mutanten aus Gleichung (1) mit n=1 und n=2 dargestellt. Auf allen x-Achsen ist die Substratkonzentration in μM aufgetragen, auf allen y-Achsen der Substratumsatz in $\text{mol}_{\text{Substrat}}/(\text{mol}_{\text{Proteasom}} \cdot \text{s})$. Für den *wt* wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

5.6.1 Kinetiken zum Verdau von Suc-LLVY-Amc mit ausgewählten Mutanten

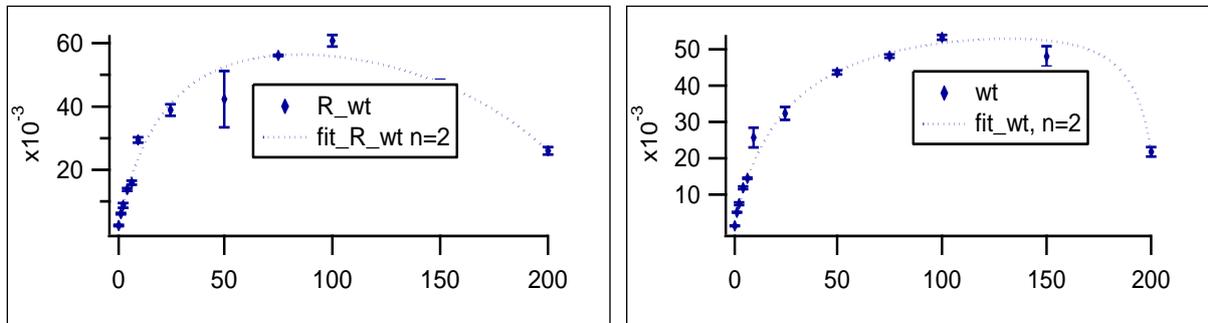
- *Wild type* 20S Proteasom

n=1



Fit	a	b	χ^2
wt, n=1	$a = 0.0027508 \pm 3.84e-05$	$b = 0.14046017 \pm 0.000947$	803
R_wt n=1	$a = 0.0037708 \pm 7.52e-05$	$b = 0.055271 \pm 0.00139$	1107.95

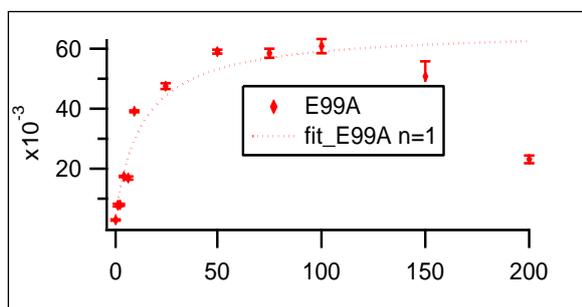
n=2



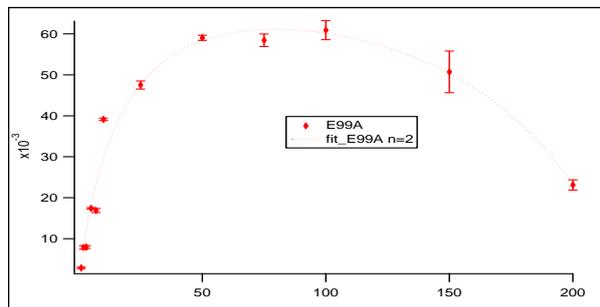
Fit	a	b	χ^2
wt, n=2	$a_1 = 0.002607 \pm 3.89e-05$ $a_2 = -1.2792e-05 \pm 2.97e-07$	$b_1 = 0.034122 \pm 0.00124$ $b_2 = -0.00018446 \pm 1.29e-05$	130.175
R_wt n=2	$a_1 = 0.0032889 \pm 7.21e-05$ $a_2 = -1.4241e-05 \pm 6.26e-07$	$b_1 = 0.034783 \pm 0.00177$ $b_2 = -0.00011434 \pm 2.25e-05$	78.6944

- E99A

n=1



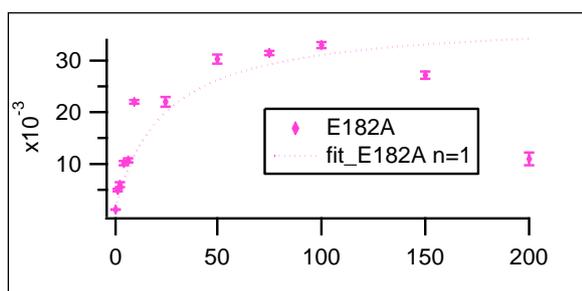
n=2



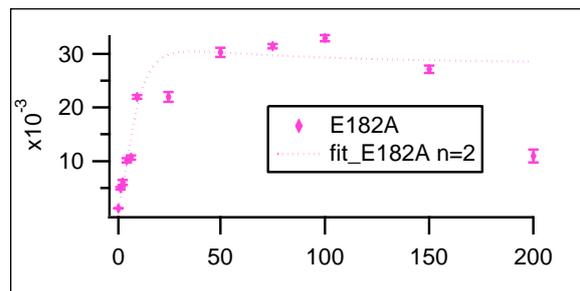
Fit	a	b	χ^2
E99A, n=1	$a = 0.0053003 \pm 6.34e-05$	$b = 0.079804 \pm 0.00167$	2618.18
E99A, n=2	$a_1 = 0.0046161 \pm 0.00073$ $a_2 = -2.0951e-05 \pm 3.93e-06$	$b_1 = 0.050445 \pm 0.0143$ $b_2 = -0.00018543 \pm 9.28e-05$	0.00015

- E182A

n=1



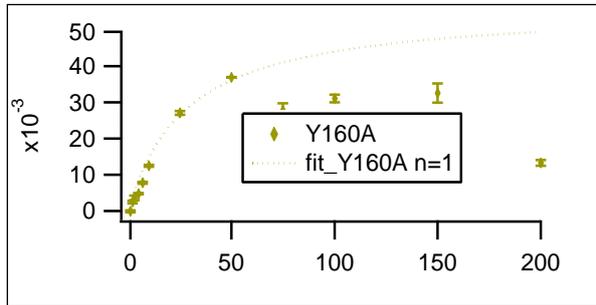
n=2



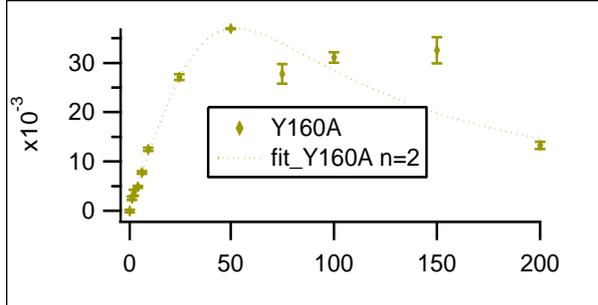
Fit	a	b	χ^2
E182A, n=1	$a = 0.0016782 \pm 2.37e-05$	$b = 0.04408 \pm 0.000957$	1753.18
E182A, n=2	$a_1 = 0.0010282 \pm 3.78e-05$ $a_2 = 0.00021108 \pm 3.04e-05$	$b_1 = -0.019724 \pm 0.00543$ $b_2 = 0.007645 \pm 0.000965$	538.08

• Y160A

n=1



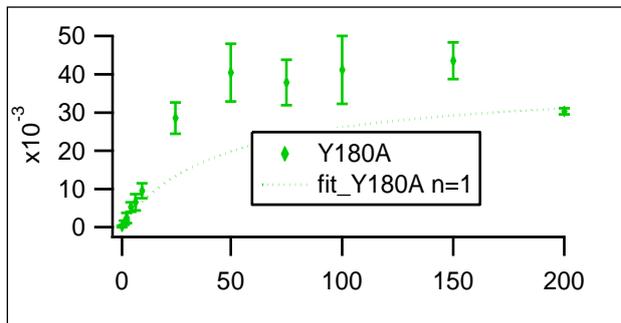
n=2



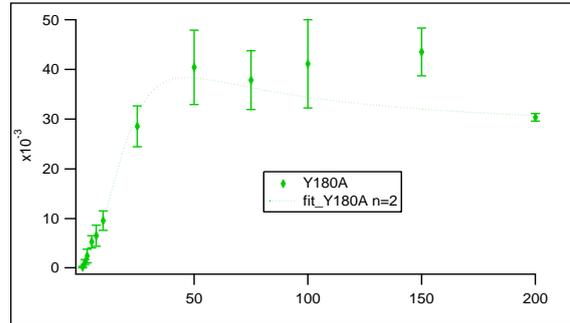
Fit	a	b	χ^2
Y160A, n=1	$a = 0.0020035 \pm 3.36e-05$	$b = 0.035467 \pm 0.000933$	3261.02
Y160A, n=2	$a_1 = 0.0010841 \pm 3.19e-05$ $a_2 = -6.2272e-07 \pm 7.08e-07$	$b_1 = -0.0088917 \pm 0.0018$ $b_2 = 0.00034771 \pm 4.02e-05$	96.0767

• Y180A

n=1



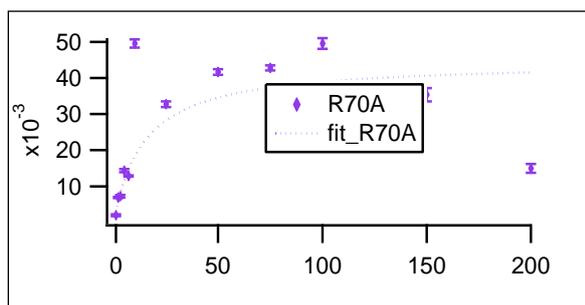
n=2



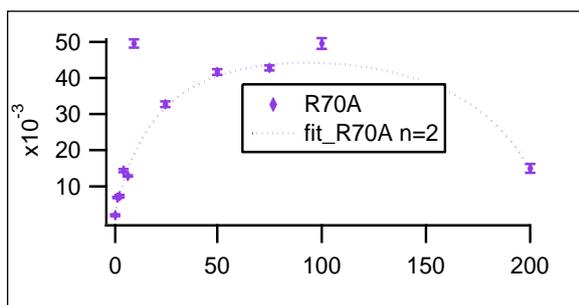
Fit	a	b	χ^2
Y180A, n=1	$a = 0.0020035 \pm 3.36e-05$	$b = 0.035467 \pm 0.000933$	3261.02
Y180A, n=2	$a_1 = 0.0010841 \pm 3.19e-05$ $a_2 = -6.2272e-07 \pm 7.08e-07$	$b_1 = -0.0088917 \pm 0.0018$ $b_2 = 0.00034771 \pm 4.02e-05$	96.0767

- R70A

n=1



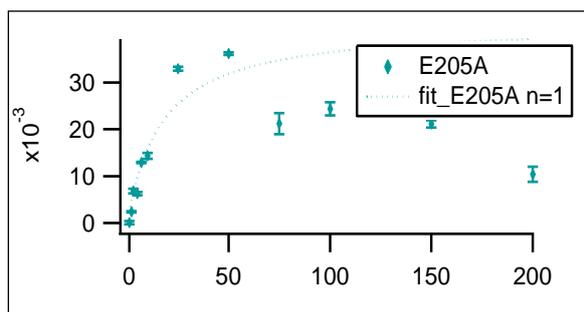
n=2



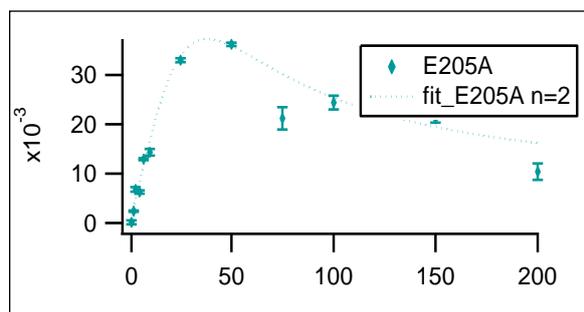
Fit	a	b	χ^2
R70A, n=1	$a = 0.0030926 \pm 4.32e-05$	$b = 0.069472 \pm 0.00177$	1791.44
R70A, n=2	$a_1 = 0.0027217 \pm 3.98e-05$ $a_2 = -1.2889e-05 \pm 3.19e-07$	$b_1 = 0.040121 \pm 0.00182$ $b_2 = -0.00017654 \pm 1.86e-05$	1140.96

- E205A

n=1



n=2

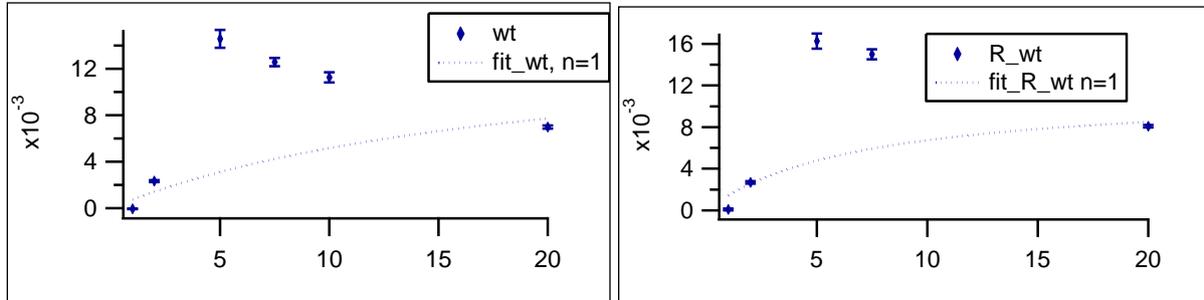


Fit	a	b	χ^2
E205A, n=1	$a = 0.0025206 \pm 4.22e-05$	$b = 0.059202 \pm 0.00153$	1823.24
E205A, n=2	$a_1 = 0.0016015 \pm 3.86e-05$ $a_2 = 4.8202e-06 \pm 1.52e-06$	$b_1 = -0.0093545 \pm 0.0021$ $b_2 = 0.00081452 \pm 6.46e-05$	212.735

5.6.2. Kinetiken zum Verdau von Bodipy FL Casein mit ausgewählten Mutanten

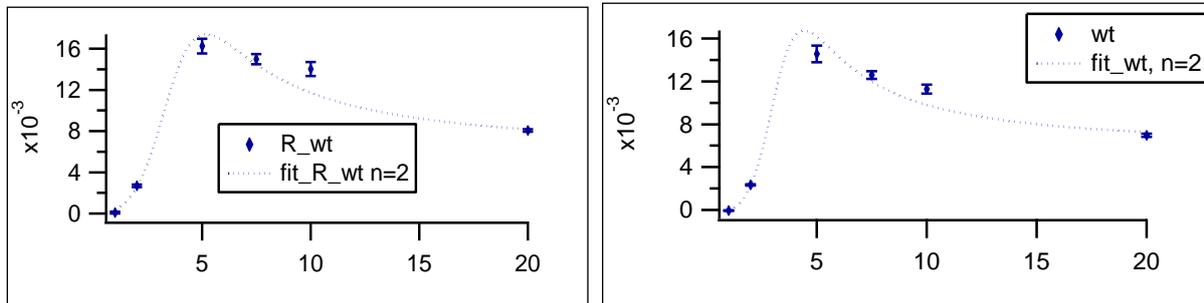
- *Wild type* 20S Proteasom

n=1



Fit	a	b	χ^2
wt, n=1	$a = 0.0007765 \pm 3.11e-05$	$b = 0.050465 \pm 0.00461$	1621
R_wt n=1	$a = 0.0016373 \pm 8.28e-05$	$b = 0.14294 \pm 0.0104$	907

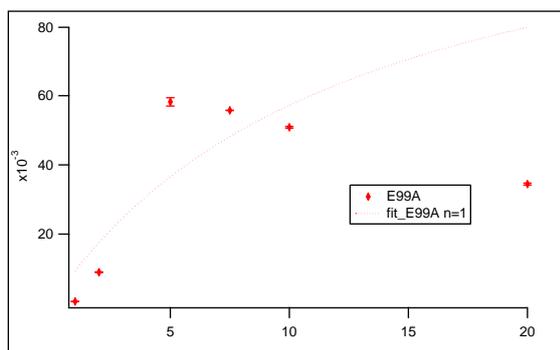
n=2



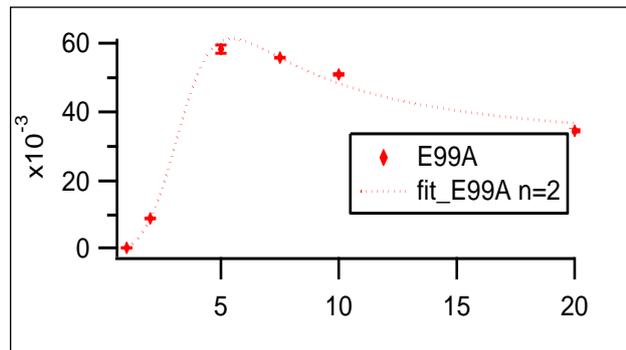
Fit	a	b	χ^2
wt, n=2	$a_1 = -0.00043654 \pm 3.57e-05$ $a_2 = 0.00041771 \pm 1.79e-05$	$b_1 = -0.47756 \pm 0.00946$ $b_2 = 0.075885 \pm 0.00228$	23
R_wt n=2	$a_1 = -7.2642e-05 \pm 8.47e-05$ $a_2 = 0.00031935 \pm 3.22e-05$	$b_1 = -0.39027 \pm 0.0181$ $b_2 = 0.055619 \pm 0.00421$	23

- E99A

n=1



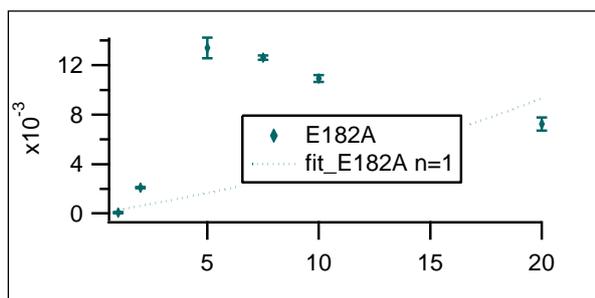
n=2



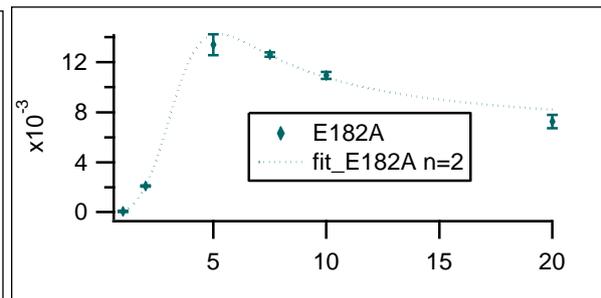
Fit	a	b	χ^2
E99A, n=1	$a = 0.010132 \pm 3.82e-05$	$b = 0.077035 \pm 0.000753$	89791
E99A, n=2	$a_1 = -0.0012401 \pm 5.42e-05$ $a_2 = 0.0016692 \pm 2.83e-05$	$b_1 = -0.38504 \pm 0.00329$ $b_2 = 0.0605 \pm 0.000719$	183

- E182A

n=1



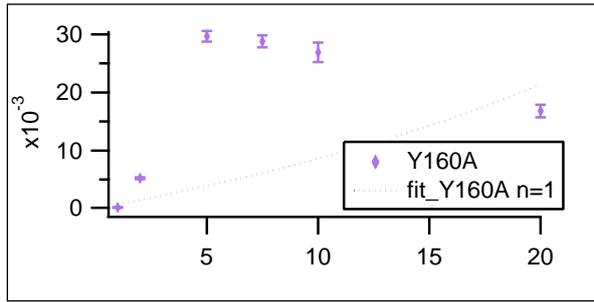
n=2



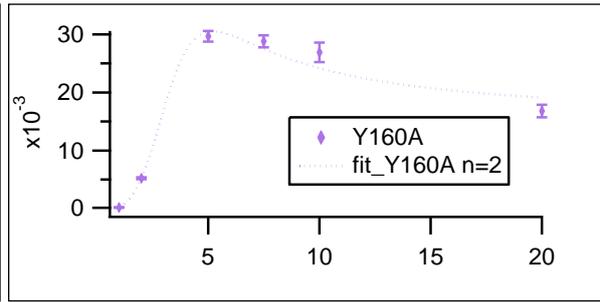
Fit	a	b	χ^2
E182A, n=1	$a = 0.0011434 \pm 2.19e-05$	$b = 0.016098 \pm 0.00253$	1873
E182A, n=2	$a_1 = -0.00034293 \pm 5.1e-05$ $a_2 = -0.00040537 \pm 2.81e-05$	$b_1 = -0.40717 \pm 0.0124$ $b_2 = 0.065138 \pm 0.00241$	4.615

• Y160A

n=1



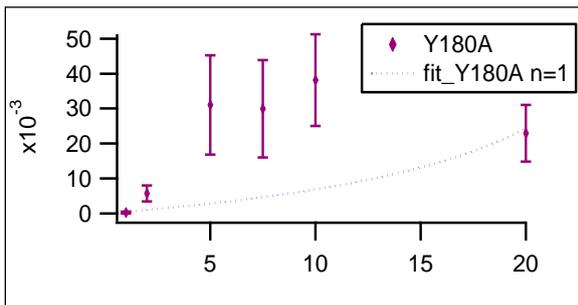
n=2



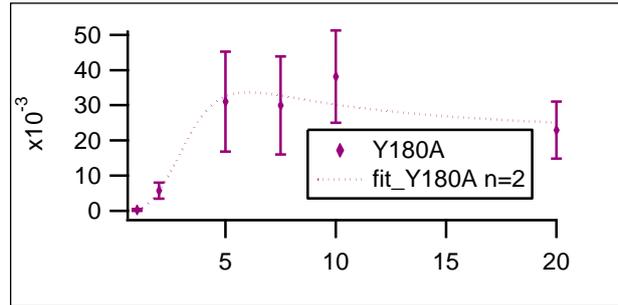
Fit	a	b	χ^2
Y160A, n=1	$a = 0.00071512 \pm 2.67e-05$	$b = -0.016567 \pm 0.00216$	2460
Y160A, n=2	$a_1 = -0.00096883 \pm 6.41e-05$ $a_2 = 0.0010791 \pm 5.76e-05$	$b_1 = -0.41552 \pm 0.0108$ $b_2 = 0.07219 \pm 0.00194$	9.81

• Y180A

n=1



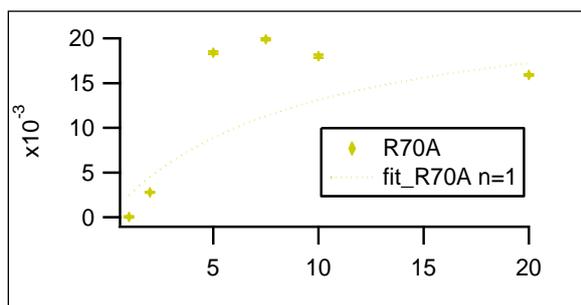
n=2



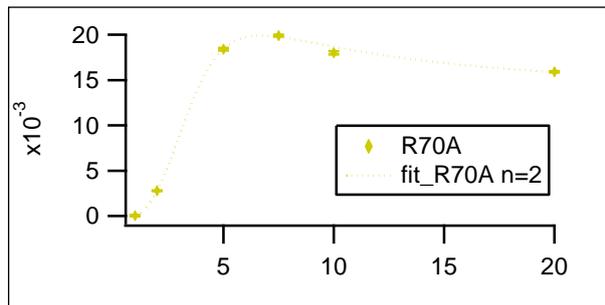
Fit	a	b	χ^2
Y180A, n=1	$a = 0.00047891 \pm 0.000216$	$b = -0.030298 \pm 0.0112$	18.62
Y180A, n=2	$a_1 = -0.0012129 \pm 0.000875$ $a_2 = 0.0013654 \pm 0.000846$	$b_1 = -0.36619 \pm 0.112$ $b_2 = 0.067811 \pm 0.0277$	0.049

- R70A

n=1



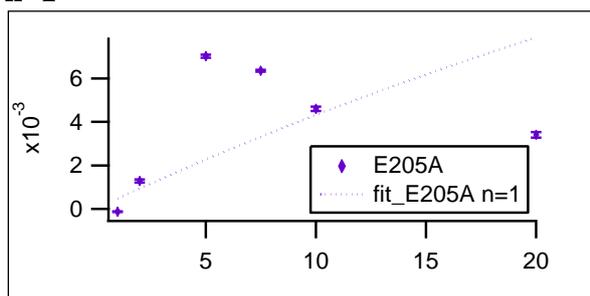
n=2



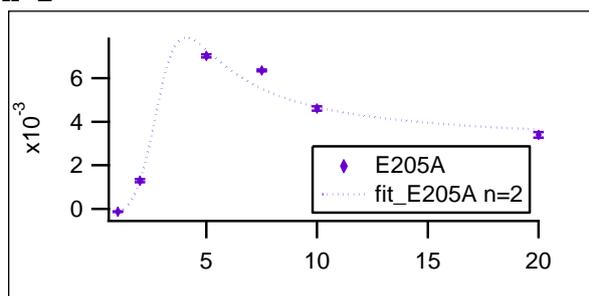
Fit	A	b	χ^2
R70A, n=1	$a = 0.0027376 \pm 2.69e-05$	$b = 0.1088 \pm 0.00173$	15745
R70A, n=2	$a_1 = -0.00081563 \pm 5.71e-05$ $a_2 = 0.00080891 \pm 2.72e-05$	$b_1 = -0.33892 \pm 0.0052$ $b_2 = 0.062849 \pm 0.00174$	14.25

- E205A

n=1



n=2



Fit	A	b	χ^2
E205A, n=1	$a = 0.00047734 \pm 6.88e-06$	$b = 0.01055 \pm 0.00145$	15182.4
E205A, n=2	$a_1 = -0.00034962 \pm 0.000689$ $a_2 = 0.00027516 \pm 0.000625$	$b_1 = -0.53337 \pm 0.445$ $b_2 = 0.094733 \pm 0.1$	0.0049

6. Quellenverzeichnis

Bardsley, W.; Leff, P.; Kavanagh, J.; Waight, R.D.. *Deviations from Michaelis-Menten Kinetics*. Biochem J; Vol. 187; pp. 739-765

Benaroudj, N.; Zwickl, P.; Seemüller, E.; Baumeister, W.; Goldberg, A.L. (2003). *ATP Hydrolysis by the Proteasome Regulatory Complex PAN Serves Multiple Functions in Protein Degradation*. Volume 11, Issue 1; pp. 69-78

Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72, pp. 248-254

Brannigan, J.A.; Dodson, G.; Duggleby, H.J.; Moody, P.C.E.; Smith, J.L.; Tomchick, D.R.; Murzin, A.G.(1995). *A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is a capable of self-activation*. Nature Vol. 378; pp. 416-419

Burns, K. E.; Darwin (2010). *Pupylation versus ubiquitylation: tagging for proteasome-dependent degradation*. Cellular Microbiology; 12(4); pp. 421-431

Chang-Wei, L.; Corboy, M.J.; DeMartino, G. N.; Thomas, P.J. (2003). *Endoproteolytic Activity of the Proteasome*. Science 299, pp. 408-412

Coux, O.; Tanaka, K.; Goldberg, A.L. (1996). *Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasoms*. Annu. Rev. Biochem.; 65: pp. 801 – 47

Creamer, L.K.; Richardson, T.; Parry, D. A.D. (1981). *Secondary structure of bovine alpha s1- and beta-casein in solution*. Arch. Biochem. Biophys. 211, 689

Da Fonesca, P.C.A.; Morris, E.P. (2008). *Structure of the Human 26S Proteasome – Subunit Radial Displacements open the gate into the proteolytic core*. J Biol Chem, Vol. 283; No. 34, pp. 23305-23314

Dahlmann, B.; Kuehn, L.; Grziwa, A.; Zwickl, P.; Baumeister, W. (1992). *Biochemical properties of the proteasome from Thermoplasma acidophilum*. Eur. J. Biochem. 208; pp. 789-797

Dahlmann, B.; Knopp, F.; Kuehn, L.; Niedel, B.; Pfeifer, G.; Hegerl, R.; Baumeister, W. (1989). *The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria*. FEBS Letters; Volume 251, number 1,2; pp. 125-131

Davies, K.J.A. (2001). *Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome*. Biochimie 83, 301-310

Dice, J. F. (1987). *Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells*. FJ Reviews pp. 349-357

Dick, L.R.; Cruikshank, A.A; Grenier, L.; Melandri, F.D.; Nunes, S.L.; Stein, R.L. (1996). *Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for the clasto-lactacystin beta-lactone*. J Biol Chem 271; pp. 7273-7276

- Ditzel, L.; Huber, R.; Mann, K.; Heinemeyer, W.; Wolf, D.H.; Groll, M. (1998). *Conformational Constraints for the Protein Self-cleavage in the Proteasome*. J Mol Biol; Vol. 279(5); pp. 1187-91
- Djuranovic, S.; Hartmann, M.D.; Habeck, M.; Ursinius, A.; Zwickl, P.; Martin, J.; Lupas, A. N.; Zeth K. (2009). *Structure and Activity of the N-Terminal Substrate Recognition Domains in Proteasomal ATPases*. Mol Cell 34; pp. 580-590
- Dolenc, I.; Seemüller, E.; Baumeister, W. (1998). *Decelerated degradation of short peptides by the 20S Proteasome*. FEBS Letters 434; pp. 357-361
- Fagan, J. M.; Waxman, L. (1991). *Purification of a protease in red blood cells that degrades oxidatively damaged haemoglobin*. Biochem. J. 277; pp. 779-786
- Felderer, K.; Groves, M.; Diez, J.; Pohl, E.; Witt, S. (2008). *Crystallization and preliminary X-ray analysis of the Thermoplasma acidophilum 20S proteasome in complex with protein substrates*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun; 64(Pt10); pp.899-902
- Finley, D. (2009). *Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome*. Annu. Rev. Biochem. 78: 477-513
- Förster, A.; Masters, E. I.; Whitby, F.G.; Robinson, H.; Hill, C.P. (2005). *The 1.9 Å Structure of a Proteasome-11S Activator Complex and Implications for the Proteasome-PAN/PA700 Interactions*. Mol Cell; Vol. 18; pp. 589-599
- Graham, E. R. B.; Malcom, G.N.; McKenzie, H.A.(1984). Int. J. biol. Macromol. 6, 155
- Goldberg, A. L.; St. John, A.C. (1986). *Intracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells: Part 2*. Annu. Rev. Biochem., 45; pp. 747-803
- Groll, M.; Ditzel, L.; Löwe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H.D.; Huber, R. (1997). *Structure of the 20S Proteasome from yeast at 2.4 Å resolution*. Nature Vol. 386; pp. 463-471
- Gronostajski, R. M.; Pardee, A. B.; Goldberg, A.L (1985). *The ATP Dependence of the Degradation of Short- and Long-lived Proteins in Growing Fibroblasts*. J Biol Chem; Vol. 260; pp. 3344-3349
- Hershko, A.; Ciechanover, A. (1992). *The Ubiquitin System for Protein Degradation*. Annu. Rev. Biochem.; 61: 761-807
- Hough, R.; Pratt, G.; Rechsteiner, M. (1987). *Purification of Two High Molecular Weight Proteases from Rabbit Reticulocyte Lysate*. J Biol Chem; pp. 8303-8313
- Huffmann, A.H.; Mehrnoosh, S.; Seemüller, E.; Baumeister, W.; Dunn, M.F. (2003). *Proteasome-Cytochrome c Interactions: A Model for the Investigation of Proteasome Host-Guest Interactions*. Biochemistry 42; pp. 8679-8686
- Jariel-Encontre, I.; Pariat, M.; Martin, F.; Carillo, S.; Salvat; C. Piechaczyk, M. (1995). *Ubiquitylation is not an absolute requirement for the degradation of c-Jun protein by the 26S Proteasom*. J Biol Chem; 270 (19); 11623-7

Jentsch, S. (1992). *Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective*. Trends in Cell Biology, Vol. 2; pp. 98-103

Kisselev, A. F.; Akopian, T.N.; Goldberg, A. L. (1998). *Range of Sizes of Peptide Products Generated during Degradation of Different Proteins by Archaeal Proteasoms*. J Biol Chem; Vol. 273; pp. 1982 – 1989

Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227; pp. 680-687

Lee, C.; Prakash, S.; Matouschek, A. (2002). *Concurrent Translocation of Multiple Polypeptide Chains through the Proteasomal Degradation Channel*. J Biol Chem; Vol. 277; pp. 34760-34765

Löwe, J.; Stock, D.; Jap, B.; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R. (1995). *Crystal Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon T.acidophilium at 3.4 Å Resolution*. Science Vol. 268; pp. 533- 539

Luciani, F.; Kesmir, C.; Mishto, M.; Or-Guil, M.; de Boer, R.J. (2005). *A Mathematical Model of Protein Degradation by the Proteasome*. Biophys J; Vol.88 2422-2432

Mishto, M.; Luciani, F.; Holzhütter, H.-G.; Bellavista, E.; Santoro, A.; Textoris-Taube, K.; Franceschi, C.; Kloetzel, P.M.; Zaikin, A. (2008). *Modeling of in Vitro 20S Proteasome Activity: The Effect of PA28- $\alpha\beta$ and of the Sequence and Length of Polypeptides on the Degradation Kinetics*. J Mol Biol; 377; pp. 1607-161

Murakami, Y.; Matsufuji, S.; Kameji, T.; Hayashi, S.-I.; Igarashi, K.; Tamura, T.; Tanaka, K.; Ichihara, A. (1992). *Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination*. Nature 360; pp. 597-599

Nelson, M.; McClelland, M. (1992). *Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes*. Methods Enzymol 216; pp. 279-303

Nickell, S.; Beck, F.; Scheres, S. H. W.; Korinek, A.; Förster, F.; Lasker, K.; Mihalache, O.; Sun, N.; Nagy, I.; Sali, A.; Plitzko, J. M.; Caazo, J.-M.; Mann, M.; Baumeister, W. (2009). *Insights into the molecular architecture of the 26S Proteasome*. PNAS Vol. 106; no.29; pp. 11943-11947

Nunan, J.; Shearman, M.S.; Checler, F.; Cappai, R.; Evin, G.; Beyreuther, K. Masters, C.L., Small, D. H. (2001) *The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase*. Eur. J. Biochem.; 268; pp. 5329-5336

Rabl, J.; Smith, D.M.; Yu, Y.; Chang, S.-C.; Goldberg, A.L.; Cheng, Y. (2008). *Mechanism of Gate Opening in the 20S Proteasome by the Proteasomal ATPases*. Mol Cell 30; pp. 360-368

Religa, T. L.; Sprangers, R.; Kay, L.E. (2010). *Dynamic Regulation of the Archaeal Proteasome Gate Opening As Studied by TROSY NMR*. Science 328; pp. 98-102

- Rock, K. L.; Gramm, C.; Rothstein, L.; Clark, K.; Stein, R.; Dick, L.; Hwang, D.; Goldberg, A. L. (1994). *Inhibitors of the Proteasome Block the Degradation of Most Cell Proteins and the Generation of Peptides Presented on MHC Class I Molecules*. Cell, Vol. 78; pp. 761-771
- Saeki, Y.; Tanaka, K. (2007). *Unlocking the Proteasome Door*. Mol Cell; Vol. 27; pp. 865-867
- Saric, T.; Graef, C.I.; Goldberg, A.L. (2004). *Pathway for Degradation of Peptides Generated by Proteasomes*. J Biol Chem; Vol. 279; No. 45; pp. 46723-46732
- Schägger, H.; von Jagow, G. (1991). *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem 166; pp. 368-379
- Schoenheimer, R. (1942). *The Dynamic State of Body Constituents*. Cambridge, Mass: Harvard Univ. Press pp. 25-46.
- Shabek, N.; Ciechanover, A. (2010). *Degradation of ubiquitin – The fate of a cellular reaper*. Cell Cycle 9: 3, 523-530
- Sharon, M.; Witt, S.; Felderer, K.; Rockel, B.; Baumeister, W.; Robinson, CV. (2006). *20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation*. J Biol Chem; 281(14), 9569-75
- Seemüller, E.; Lupas, A.; Baumeister, W. (1996). *Autocatalytic processing of the 20S proteasome*. Nature Vol. 382; pp. 468-470
- Seemüller, E.; Lupas, A.; Stock, D.; Löwe, J.; Huber, R.; Baumeister, W. (1995). *Proteasome from Thermoplasma acidophilum: A Threonine Protease*. Science Vol. 268; pp. 579-582
- Smith, D.M.; Chang, S.-S.; Park, S.; Finley, D.; Cheng, Y.; Goldberg, A. L. (2007). *Docking of the Proteasomal ATPases' Carboxyl Termini in the 20S Proteasome's α Ring Opens the Gate for Substrate Entry*. Mol Cell 27; pp. 731-744
- Smith, D. M.; Kafri, G.; Cheng, Y.; Ng, D.; Walz, T.; Goldberg, A.L. (2005). *ATP Binding to PAN or the 26S ATPases Causes Association with the 20S Proteasome, Gate Opening, and Translocation of Unfolded Proteins*. Mol Cell; Vol. 20; pp. 687-698
- Song, K.B.; Damodaran, S. (1992). *Effect of Chaotropic Salts on the Secondary Structure of β -Casein*. Korean Biochem J; No. 5 pp. 393-396
- Sprangers, R.; Kay, L. E. (2007). *Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR*. Nature; Vol. 445(7128); pp. 618-22
- Tamura, T.; Nagy, I.; Lupas, A.; Lottspeich, F.; Cejka, Z.; Schoofs, G.; Tanaka, K.; de Mot, R.; Baumeister, W. (1995). *The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of Rhodococcus*. Current Biology; 5: pp. 766-774
- Tanaka, K.; Kunio, I.; Ichihara, A. (1986). *A High Molecular Weight Protease in the Cytosol of Rat Liver*. J Biol Chem; Vol. 261; No. 32; pp. 15197-1512003

- Tarcsa, E.; Szymanska, G.; Lecker, S.; O'Connor, C.M.; Goldberg, A.L. (2000). *Ca²⁺-free calmodulin and calmodulin damaged by in vitro aging are selectively degraded by the 26S proteasomes without ubiquitination*. J Biol Chem; Vol. 275; pp. 20295-20301
- Tawa, N. E.; Kettelhut, I. C.; Goldberg, A.L. (1992). *Dietary protein deficiency reduces lysosomal and nonlysosomal ATP-dependent proteolysis in muscle*. The American Physiological Society; pp. E326-E334
- Todd, A.E.; Orengo, C.A.; Thornton, J.M.(2002). *Plasticity of enzyme active sites*. Trends in Biochemical Sciences; Vol. 27; pp. 419-426
- Touitou; G.K.; Layfield, R. Spillantini, M.G. (2001). *Alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome*. FEBS Lett. 509, pp. 22-26
- Wang, W. Y. und Malcom, B.A. (1999). *Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange™ site-directed mutagenesis*. Biotechniques 26; pp. 680-682
- Zhang F.; Hu, M.; Tian, G.; Zhang, P.; Finley, D.; Jeffery, P.D.; Shi, Y. (2009_a). *Structural Insights into the Regulatory Particle of the Proteasome from Methanocaldococcus jannaschii*. Mol Cell 34; 473-484
- Zhang, F.; Wu, Z.; Zhang, P.; Tian, G.; Finley, D.; Shi, Y. (2009_b). *Mechanism of Substrate Unfolding and Translocation by the Regulatory Particle of the Proteasome from Methanocaldococcus jannaschii*. Mol Cell 34; 485-496
- Zwickl, P.; Lottspeich, F.; Baumeister, W. (1992). *Expression of functional Thermoplasma acidophilum proteasomes in Escherichia coli*. FEBS Letters; Vol. 312; number 2,3; pp. 157-160
- Zwickl, P.; Ng, D., Woo, K.M.; Klenk, H.-P.; Goldberg, A.L.(1999). *An Archaeobacterial ATPase, Homologous to the ATPases in the Eukaryotic 26S Proteasome, Activates Protein Breakdown by 20S Proteasoms*. J Biol Chem; Vol. 274; No. 37; pp. 26008-26014
- Zwickl, P.; Seemüller, E.; Kapelari, B.; Baumeister, W. (2001). *The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis*. Adv Protein Chem; Vol. 59: pp. 187-222

Danksagungen

Bei Prof. Dr. Baumeister möchte ich mich für die Unterstützung dieser Arbeit in vielerlei Hinsicht bedanken – „Dives qui sapiens est“ oder „Prudentia potentia est“.

Bei Dr. Susanne Witt möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit bedanken – „Facta loquuntur“.

Bei Dr. Jürgen Peters möchte ich mich für Korrekturen, Diskussionen sowie dass „ein wirklich guter und wahrhaftiger Mensch“ sein bedanken – „Nonum semper ea sunt, quae videntur!“

Bei Dr. Reinhard Guckenberger für die Physik und die Kooperationen im Rahmen der Arbeit - „Verba docent – exempla trahunt“.

Bei Dr. Beate Rockel möchte ich mich für gute Gespräche und eine objektive Sicht der Dinge bedanken – „Non scholae, sed vitae dicimus“.

Bei Dr. Mirjam Classen möchte ich mich für ein ungeschränktes Vertrauen sowie uneingeschränkte Voraussicht bedanken – „Sapientia felicitas“.

Bei Istvan Nagy, Silvia Schweiger, Marius Boicu, Jan Lubieniecki, Roland Knispel und Agnes Hubert möchte ich mich für die gute Kooperation im Labor bedanken – „Audaces fortuna adiuvat“.

Bei der Werkstatt der Abt. Baumeister möchte ich mich für Reparaturen und Kameradschaft bedanken – „Ego sum, qui sum“ oder auf bayrisch „Mia san mia“.

Bei Sabina von Polenz und Birgit Book möchte ich mich für Loyalität und Integrität bedanken – „Semper fidelis“.

Der gesamten Abteilung Baumeister danke ich für den Zusammenhalt und die Unterstützung. Im Besonderen: Shoh Asano, Stefan Bohn, Dr. Harald Engelhardt, Dr. Friedrich Förster, Dr.

Manuela Gruska, Dr. Reiner Hegerl, Christian Hoffmann, Thomas Hoffmann, Tim Laugks, Oana Mihalache, Ganesh Pathare, Marietta Peters, Günther Pfeifer, Annemarie Schönege, Nikolas Schrod, Margarethe Schüler, Claudia Szalma, Dennis Thomas und Inga Wolf.

Bei meinem Bruder, Alexander Breuer, für hilfreiche Vorschläge und mathematische Diskussionen – „Sis vis pacem, para bellum“.

Bei meiner Schwester, Antonia Breuer, möchte ich mich für große Ideen bedanken – „In magnis et voluisse sat est“.

Bei meinem Schwiegervater, Erich Hartmann, möchte ich mich mit folgenden Worten bedanken: „Qualis autem homo esset, talem esse eius orationem“. Und bei allen anderen: „Oderint, dum metuant! oder „Ex nihilo nihil fit!“

Bei meiner Großmutter, Elisabeth Breuer, möchte ich mich für viele Gespräche und Erinnerungen bedanken – „Omnia tempus habent“.

Bei meinen Eltern, Dr. Ute Dederek-Breuer möchte ich mich für die Lehrstunden in Dynamik und bei Dr. Georg Breuer für die Lehrstunden in Statik bedanken – „In medio virtus“ oder „Vivere militare est“.

Bei meinem Mann, Michael Hartmann, möchte ich mich für ein durchgängiges Rückgrat bedanken – „Patria est, ubicumque est bene“ (Cicero). Danke!