

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie

**Charakterisierung des Regulatorischen Komplexes von  
26S Proteasomen aus *Drosophila melanogaster***

Harald Hölzl

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.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. W. Baumeister

2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 23.05.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17. 07. 2001 angenommen.



*Meinen Eltern*



# INHALT

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1. PROTEINABBAU IN EUKARYONTISCHEN ZELLEN.....	3
2.2. DAS UBIQUITIN-PROTEASOM SYSTEM .....	5
2.3. DAS 26S PROTEASOM.....	7
2.3.1. Die Substrate und Produkte des 26S Proteasoms .....	7
2.3.2. Das 20S Proteasom – der proteolytische Kern .....	11
2.3.3. Der Regulatorische Komplex .....	13
2.4. DEUBIQUITINIERENDE ENZYME.....	16
2.5. AUFGABENSTELLUNG .....	18
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
3.1. MATERIALIEN.....	19
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	19
3.1.2. Kits und Standards.....	20
3.1.3. Enzyme und Antikörper.....	20
3.1.4. Drosophila Zelllinie und Medien.....	21
3.1.5. Bakterienstämme und Medien .....	21
3.1.6. Plasmide .....	22
3.1.7. Primer .....	22
3.2. DROSOPHILA KULTUREN .....	23
3.2.1. Kultur von <i>D. melanogaster</i> .....	23
3.2.2. Aufschluss von <i>D. melanogaster</i> Embryonen .....	23
3.2.3. Zellkultur von <i>Drosophila</i> S2 Zellen.....	24
3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	25
3.3.1. Grundlegende Techniken .....	25
3.3.2. Klonierung von PCR Fragmenten .....	26
3.3.3. Transformation von <i>E. coli</i> .....	27

3.3.4. Transfektion.....	28
3.3.5. Punktmutation.....	28
3.4. BIOCHEMISCHE METHODEN .....	29
3.4.1. Isolierung von 26S Proteasomen aus <i>D. melanogaster</i> Embryonen .....	29
3.4.2. Isolierung von Histidininfusionsproteinen aus <i>E. coli</i> .....	30
3.4.3. Isolierung von FLAG-Fusionsproteinen aus S2 Zellen .....	31
3.4.4. Proteinbestimmung .....	32
3.4.5. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE).....	32
3.4.6. Proteinfärbung .....	34
3.4.7. Bestimmung enzymatischer Aktivität .....	35
3.4.8 Aminosäuresequenzanalyse.....	36
3.5. IMMUNOLOGISCHE METHODEN .....	36
3.5.1 Proteintransfer auf Nitrozellulose .....	36
3.5.2 Detektion mit alkalischer Phosphatase.....	37
3.6. CHEMISCHE METHODEN.....	38
3.6.1 Herstellung des Ubiquitinaldehyd-kolloidalen Gold Konjugates .....	38
3.7. ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND BILDVERARBEITUNG.....	38
3.7.1 Rastertransmissions-Elektronenmikroskopie (STEM).....	38
3.7.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	38
3.8. COMPUTERANALYSEN.....	39
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>40</b>
4.1. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON 26S PROTEASOMEN AUS <i>D. MELANOGASTER</i> EMBRYONEN.....	40
4.2. IDENTIFIZIERUNG DER UNTEREINHEITEN DES REGULATORISCHEN KOMPLEXES.....	46
4.3. DIE UNTEREINHEITEN DES REGULATORISCHEN KOMPLEXES .....	51
4.3.1. Die Untereinheiten des „base“-Komplexes .....	52
4.3.2. Die Untereinheiten des „lid“-Komplexes .....	54
4.4. STEM MASSENBESTIMMUNGEN.....	55
4.5. CHARAKTERISIERUNG VON p37A.....	58
4.5.1. Sequenzanalyse von p37A .....	58
4.5.2. Klonierung, Expression und Reinigung von p37A.....	61
4.5.3. Nachweis der deubiquitinierenden Aktivität von p37A und 26S Proteasomen..	62
4.5.4. Lokalisierung von p37A im RC.....	64
4.6. EPITOP-MARKIERUNG EINZELNER RC UNTEREINHEITEN.....	66
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>71</b>

---

5.1. DAS <i>DROSOPHILA</i> 26S PROTEASOM .....	71
5.1.1. Identifizierung der <i>Drosophila</i> RC Untereinheiten .....	71
5.1.2. Charakterisierung der <i>Drosophila</i> RC Untereinheiten .....	74
5.1.3. Die Masse des <i>Drosophila</i> 26S Proteasoms und seiner Subkomplexe .....	77
5.2. p37A, EIN NEUE RC UNTEREINHEIT .....	78
5.2.1. Deubiquitinierung, eine Aktivität des RC?.....	78
5.2.2. Identifizierung und Charakterisierung von p37A.....	79
5.2.3. Lokalisierung von p37A .....	82
5.3. REINIGUNG DES RC MITTELS EPITOP-MARKIERUNG .....	84
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>86</b>
<b>7. ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>100</b>

---



## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Das 26S Proteasom ist ein zentrales Enzym des nicht-lysosomalen Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus in eukaryontischen Zellen. Neben der Proteolyse von mutierten oder defekten Proteinen ist es an einer Reihe zellulärer Prozesse beteiligt; dazu gehören unter anderem Stoffwechselregulation, Transkriptionskontrolle, Kontrolle des Zellzyklus und Antigenpräsentation.

Über einen komplexen Mechanismus wird an Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, kovalent eine Multiubiquitinkette als Degradationssignal gebunden. Derart markierte Proteine werden vom 26S Proteasom erkannt und in einer ATP-abhängigen Reaktion zu Peptiden abgebaut. Das 26S Proteasom besteht aus mehr als 30 verschiedenen Proteinen und seine Molekularmasse liegt im Bereich von 2,5 MD. Das katalytische Kernstück bildet das zylinderförmige 20S Proteasom, eine ATP-unabhängige Protease von ~700 kD, die zwar Peptide und entfaltete, nicht jedoch gefaltete Proteine hydrolysieren kann. In Anwesenheit von ATP binden an eines oder beide Enden des 20S Proteasoms Regulatorische Komplexe (RC), deren Funktion die Auswahl der Substratproteine (Erkennen und Binden der Multiubiquitinkette) und ihre Vorbereitung für den Abbau (Entfalten und Transportieren der Proteine) ist. Aufgrund der Labilität der Regulatorischen Komplexe ist, im Gegensatz zum 20S Proteasom, noch wenig über Struktur und enzymatischen Mechanismus des 26S Proteasoms bekannt.

26S Proteasomen aus *Drosophila melanogaster* sind hinsichtlich ihrer Stabilität jenen aus vielen anderen Organismen überlegen und daher besonders für Strukturuntersuchungen geeignet. Für eine biochemische Charakterisierung wurden im Zuge dieser Arbeit 26S Proteasomen aus *D. melanogaster* Embryonen gereinigt und mittels 2D Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Untereinheiten des Regulatorischen Komplexes, die im Größenbereich zwischen 30 und 110 kD in ~25 Spots fokussierten, wurden mittels Aminosäuresequenzierung und anschließender Sequenzierung der korrespondierenden cDNA identifiziert. Der Regulatorische Komplex aus *Drosophila* besteht aus 18 Untereinheiten, wovon 17 Homologe in den Komplexen aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens* besitzen. Für die zusätzlich gefundene Untereinheit, p37A, existiert ein Homolog in höheren Eukaryonten, jedoch nicht in Bäckerhefe. Zur Abrundung der Untereinheitenbestimmung wurden die Massen des 20S ( $721 \pm 55$  kD) und des 26S Proteasoms ( $2508 \pm 196$  kD) mit Hilfe von Rastertransmissions-

Elektronenmikroskopie (STEM) ermittelt; die daraus berechnete Masse des Regulatorischen Komplexes beträgt 894 kD. Dieser Wert entspricht ziemlich genau der Summe der Massen der 18 Untereinheiten von 932 kD; folglich wurden tatsächlich alle RC Untereinheiten durch die 2D Gelelektrophorese detektiert.

Die Untereinheit p37A konnte aufgrund ihrer Aminosäuresequenz als neues Mitglied der Ubiquitin COOH-terminalen Hydrolasen (UCH) identifiziert werden. *In vitro* konnte unter Verwendung des Modellsubstrates Ubiquitin-AMC, sowohl für rekombinantes p37A als auch für gereinigte 26S Proteasomen deubiquitinierende Aktivität nachgewiesen werden. Unter Ausnützung der kovalenten Bindung des nicht hydrolysierbaren Substratanalogen, Ubiquitaldehyd, an p37A konnte erstmals mittels Elektronenmikroskopie die Lage einer Untereinheit im Regulatorischen Komplex direkt bestimmt werden.

p37A und andere Untereinheiten des *Drosophila* 26S Proteasoms wurden molekularbiologisch mit einem Epitop versehen und in stabil transfizierten *Drosophila* Schneider S2 Zellen überexprimiert. Diese Fusionsproteine wurden von den Zellen in Proteasomen eingebaut und über Epitop-spezifische Affinitätschromatographie gereinigt. Neben den freien Untereinheiten konnten mit dieser Methode 20S Proteasomen bzw. Regulatorische Komplexe, jedoch keine kompletten 26S Proteasomen isoliert werden. Die Epitop-markierten Komplexe könnten sich in Zukunft als nützlich für die Lokalisierung einzelner Untereinheiten mittels ImmunoElektronenmikroskopie erweisen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Hözl, H., B. Kapelari, J. Kellermann, E. Seemüller, M. Sümegi, A. Udvardy, O. Medalia, J. Sperling, S.A. Müller, A. Engel, und W. Baumeister. 2000. The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes: subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *J. Cell Biol.* 150:119-129.

## 2. EINLEITUNG

Alle intrazellulären Proteine sind einem kontinuierlichen Auf- und Abbau unterworfen, und durch geringfügige Veränderungen im Gleichgewicht dieser beiden Prozesse kontrollieren Zellen Proteinkonzentration und Zusammensetzung. Während der Zellentwicklung oder als Antwort auf Umwelteinflüsse passen sich Zellen an die veränderten Bedingungen durch Expression neuer bzw. Abbau nicht mehr benötigter Proteine an. Abnormale Proteine, die in Folge von Mutationen und Stresssituationen entstehen, müssen eliminiert werden, da eine Akkumulation defekter Proteine toxisch für die Zelle wäre. Bei Nährstoffmangel versorgt der Abbau von Proteinen die Zelle mit Energie und mit Aminosäurebausteinen zur Synthese neuer Proteine. Proteolyse wird aber auch als hocheffektiver, post-translationaler Mechanismus zur Regulation von Proteinfunktionen eingesetzt. Durch gezielten Abbau kann ein Protein aktiviert oder inaktiviert, bzw. seine enzymatische Funktion entscheidend verändert werden. Proteolytische Enzyme greifen damit in wichtige zelluläre Steuerprozesse ein und sind unter anderem an der Kontrolle von Zellzyklus und Zelldifferentiation, an der Steuerung von Stoffwechselwegen, an der Regulation der Proteinexpression und an der Antigen Präsentation beteiligt.

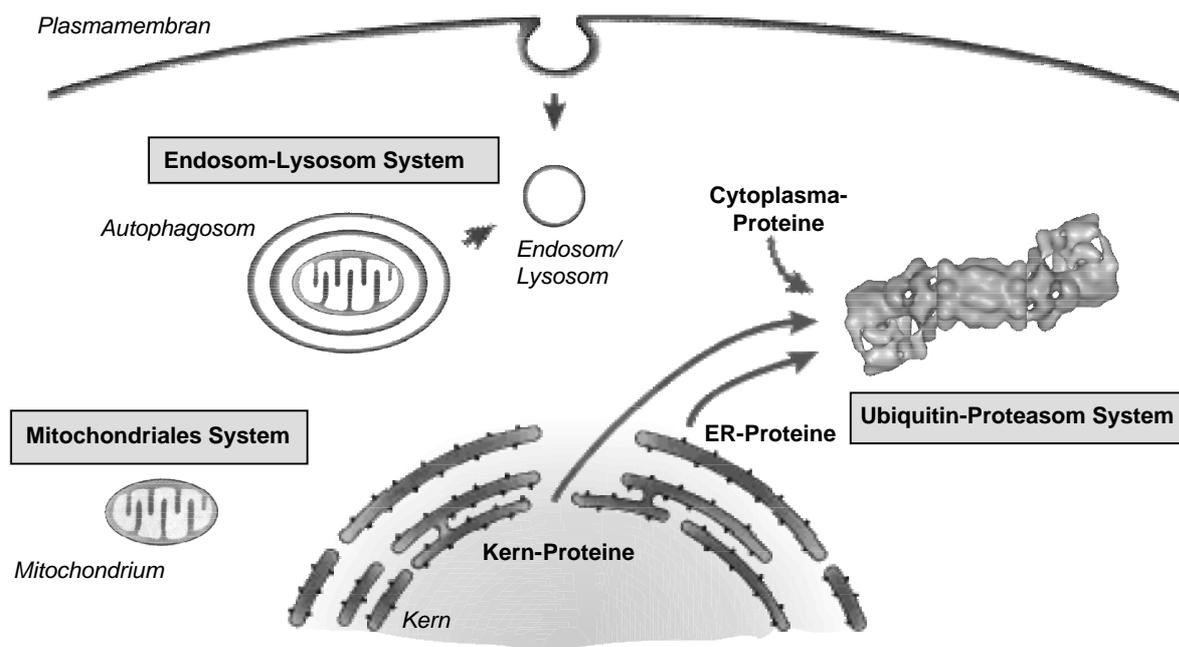
### 2.1. PROTEINABBAU IN EUKARYONTISCHEN ZELLEN

Unkontrollierter Proteinabbau würde unweigerlich zur Zerstörung der Zelle führen; um dies zu verhindern, ist eine stringente Auswahl der Proteine notwendig. In eukaryontischen Zellen haben sich im Laufe der Evolution zwei proteolytische Systeme, das Endosom-Lysosom System und das Ubiquitin-Proteasom System, ausgebildet, die diese Selektivität auf unterschiedliche Weise gewährleisten.

Im Endosom-Lysosom System wird die Proteolyse auf abgeschlossene Zellorganellen, die Lysosome, beschränkt. Lysosome besitzen die höchste Konzentration an proteolytischen Enzymen innerhalb einer Zelle und sind die Abbauorte für extrazelluläre Proteine und Proteine der Plasmamembran, die spezifisch über Endocytose von den Zellen aufgenommen werden. Der Abbau cytoplasmatischer Proteine durch lysosomale Proteasen erfolgt durch Autophagocytose. Dabei wird um einen Teil des Cytoplasmas, der ganze Organellen enthalten

kann, eine Membran, das so genannte Autophagosom gebildet, und nach Fusion mit den Lysosomen der gesamte Inhalt der Autophagosomen abgebaut (Knop, 1993; Dunn, 1994). Daneben sind Lysosomen auch für den selektiven Abbau eines geringen Prozentsatzes intrazellulärer Proteine, die ein spezifisches Degradationssignal in ihrer Aminosäuresequenz enthalten, verantwortlich (Cuervo und Dice, 1997).

Der Hauptanteil des nicht-lysosomalen Proteinabbaus erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom System, das Proteine aus dem Kern, dem Cytoplasma (Rock et al., 1994) und dem endoplasmatischen Reticulum (Plemper und Wolf, 1999) degradiert. Dieser Abbauweg erfordert in der Regel die kovalente Bindung von Ubiquitin, einem hochkonservierten 76 Aminosäuren langem Peptid, an die Proteine, die für den Abbau bestimmt sind. Derart markierte Proteine werden durch das 26S Proteasom, in einem ATP-abhängigen Mechanismus in kleine Peptide und freies Ubiquitin zerlegt.



**Abb. 1: Die proteolytischen Systeme eukaryontischer Zellen**

Extrazelluläre Proteine und Proteine der Zelloberfläche, wie Rezeptoren und deren Liganden, werden über das Endosom-Lysosom System abgebaut. Der Abbau intrazellulärer Organellen erfolgt über Autophagocytose ebenfalls durch lysosomale Proteasen. Die überragende Mehrheit der Proteine aus Kern, Cytoplasma und endoplasmatischem Reticulum wird aber über das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut. Mitochondrien verfügen über ein eigenes, an Prokaryonten erinnerndes, proteolytisches System.

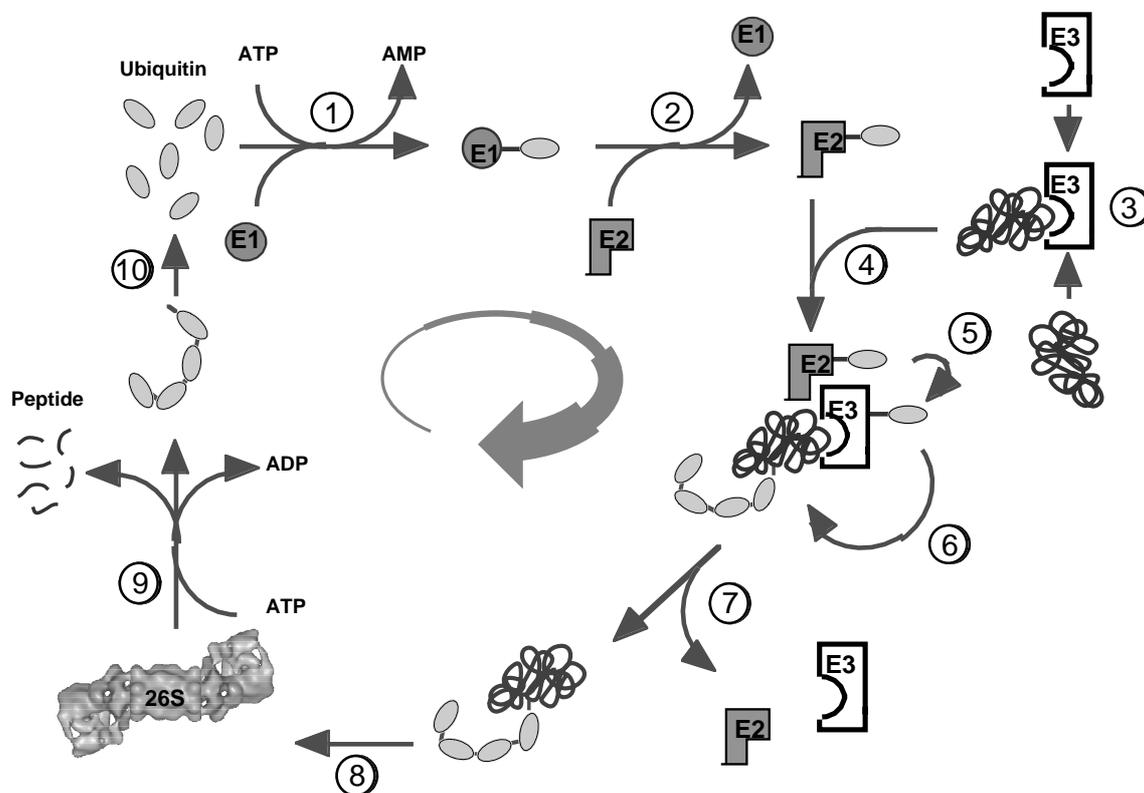
## 2.2. DAS UBIQUITIN-PROTEASOM SYSTEM

Ubiquitin wurde erstmals 1975 als universelles Protein lebender Zellen beschrieben (Goldstein et al., 1975). A. Hershko und A. Ciechanover identifizierten in den folgenden Jahren in Reticulocytensextrakten aus Kaninchen Ubiquitin als einen essentiellen Bestandteil des ATP-abhängigen proteolytischen Systems und konnten den komplexen, enzymatischen Mechanismus der Bindung von Ubiquitin an Substratproteine entschlüsseln (zur Geschichte: Hershko, 1996). Die für den Abbau ubiquitiniertes Proteine verantwortliche Protease, das 26S Proteasom, wurde kurz darauf von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert (Übersichtsartikel: Coux et al., 1996, Rechsteiner, 1998). A. Varshavsky konnte schließlich zeigen, dass dieses System auch *in vivo* an der Regulation des Proteinabbaus beteiligt ist und beschrieb einen ersten Mechanismus, der für die Auswahl der Proteine, die ubiquitiniert werden sollen, verantwortlich ist (zur Geschichte: A. Varshavsky, 1997). Diese und eine Vielzahl weiterer Arbeiten erlauben eine umfassende Beschreibung des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus (Übersichtsartikel: Hershko und Ciechanover, 1998; Scheffner et al., 1998; Abb. 2).

Eukaryontische Zellen enthalten Ubiquitin-spezifische Enzyme, die die kovalente Bindung eines einzelnen Ubiquitins oder einer Multiubiquitinkette an ein Protein katalysieren, wobei eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin, Glycin 76, und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Substratprotein gebildet wird. Ubiquitin wird für diese Bindung durch E1, dem „Ub-activating enzyme“, aktiviert, welches unter ATP Hydrolyse die Bildung einer Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen Glycin und einem spezifischen Cysteinrest von E1 katalysiert. Nach der Aktivierung überträgt ein Mitglied der E2 Enzymfamilie, der „Ub-conjugating enzymes“, das Ubiquitin von E1 auf E3, eine Ubiquitin-Protein Ligase. E3s sind jene Enzyme, die Substratproteine binden und damit für den Abbau auswählen. Die Substratproteine besitzen in ihrer Sequenz spezifische Abbausignale, die (z.B. durch Phosphorylierung) aktiviert oder inaktiviert sein können und jeweils von ganz bestimmten E3s erkannt werden (Hershko und Ciechanover, 1998). E3 Enzyme sind trotz ihrer entscheidenden Rolle für die Selektivität die am wenigsten charakterisierten Komponenten des Systems. Die bis jetzt beschriebenen Ligasen stellen eine sehr heterogene Gruppe von Enzymen mit vollkommen verschiedenen Strukturen und Reaktionsmechanismen dar (Kornitzer und Ciechanover, 2000). Nach Katalyse der Isopeptidbindung zwischen Ubiquitin und Substratprotein durch E3 werden sukzessive weitere aktivierte

Ubiquitinmoleküle an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes des vorhergehenden Ubiquitins gebunden; es kommt zur Ausbildung einer Polyubiquitinkette.

Ubiquitinierte Proteine werden vom 26S Proteasom als Substrat erkannt und in der Regel hydrolysiert. Sie können jedoch auch durch deubiquitinierende Enzyme vor diesem Abbau bewahrt werden, wodurch die Zelle eine weitere Möglichkeit zur Regulation des Proteinabbaus besitzt (Hochstrasser, 1997). In den Fällen, in denen ATP-abhängiger Abbau durch das Proteasom erfolgt, wird das Protein in Peptide zerlegt und die Ubiquitinkette wieder freigesetzt. Deubiquitinierende Enzyme hydrolysieren in einem letzten Schritt diese Kette, und wiedergewonnene Ubiquitine können von Neuem durch E1 aktiviert werden.



**Abb. 2: Das Ubiquitin-Proteasom System**

1) Aktivierung von Ubiquitin durch Bindung an E1. 2) Transfer des aktivierten Ubiquitins von E1 auf ein Mitglied der E2 Enzymfamilie. 3) Ausbildung eines Komplexes zwischen E3 und dem Substratprotein. 4) Ausbildung eines Komplexes zwischen E2, E3 und dem Substratprotein. 5) Transfer des aktivierten Ubiquitins von E2 auf E3. 6) Synthese der ans Protein gebundenen Polyubiquitinkette. 7) Recycling von E2 und E3. 8) Transfer des markierten Substratproteins zum 26S Proteasom. 9) Abbau des Substratproteins in Peptide, Freisetzung der Ubiquitinkette. 10) Recycling von Ubiquitin durch deubiquitinierende Enzyme.

### 2.3. DAS 26S PROTEASOM

Das 26S Proteasom, ein ~2,5 MD großer Proteinkomplex, besteht aus dem 20S Proteasom, das die proteolytisch aktiven Untereinheiten enthält, und dem Regulatorischen Komplex (RC), der in Anwesenheit von ATP an eines oder beide Enden des 20S Proteasoms bindet. Die ~700 kD großen 20S Proteasomen können Peptide und entfaltete Proteine hydrolysieren, sind alleine aber nicht zum Abbau gefalteter Proteine befähigt. Die Auswahl und Vorbereitung der Proteine für den Abbau geschieht demnach also durch die Regulatorischen Komplexe.

Isolierte 26S Proteasomen aus *Drosophila* (Walz et al., 1998), *Xenopus* (Peters et al., 1993), Rattenleber (Yoshimura et al., 1993) und Spinat (Fujinami et al., 1994) sehen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen ähnlich aus: Die Gesamtlänge der 26S Proteasomen beträgt ungefähr 45 nm, ihre Breite 20 nm. Die an den Seiten des zylinderförmigen 20S Proteasoms assoziierten RC sind asymmetrische Komplexe, deren Form an die Köpfe chinesischer Drachen erinnert („Chinese dragon head motif“) (Rechsteiner, 1998).

#### 2.3.1. Die Substrate und Produkte des 26S Proteasoms

Eine Hauptaufgabe des 26S Proteasoms besteht im Erkennen und Binden der ubiquitinierten Substrate (Thrower et al., 2000). Ubiquitin-vermittelte Proteolyse ist für den Abbau geschädigter und mutierter Proteine, wie sie unter Stressbedingungen wie Hitzeschock und Sauerstoffmangel vermehrt entstehen, verantwortlich (Finley et al., 1987). Stressbedingungen führen auch zu einer verstärkten Expression von Untereinheiten des Proteasoms sowie ubiquitinierender Enzyme und Ubiquitin selbst (Shang et al., 1997; Godon et al., 1998). Bis jetzt ist noch kaum etwas über die Degradationssignale abnormaler Proteine, die ja eine vollkommen inhomogene Gruppe bilden, bekannt. Da gereinigte 20S Proteasomen *in vitro* ungefaltete Proteine abbauen (Kisselev et al., 1999) und gereinigte 26S Proteasomen nicht-ubiquitinierte, ungefaltete Proteine binden können (Braun et al., 1999), ist vorstellbar, dass zumindest einige dieser defekten und falsch gefalteten Proteine auch ohne Ubiquitinierung vom Regulatorischen Komplex erkannt werden. Darüber hinaus existiert mit dem Enzym Ornithin Decarboxylase (ODC) zumindest ein Protein, das ohne vorhergehende Ubiquitinierung vom 26S Proteasom hydrolysiert wird. Eine dem Ubiquitin vergleichbare Rolle übernimmt dabei Antizym, ein 26,5 kD großes Protein, dessen Assoziation mit ODC für den Abbau notwendig ist, das aber selbst nicht abgebaut wird (Coffino, 1998).

Zusätzlich zu abnormalen Proteinen ist das Proteasom auch für den Abbau regulatorischer Proteine verantwortlich, die zuvor aufgrund spezieller metabolischer oder physiologischer Bedingungen ubiquitiniert werden. Man weiß heute, dass das Proteasom eine Schlüsselrolle in der Regulation vieler zellulärer Prozesse einnimmt, und die Anzahl der identifizierten Substrate nimmt stetig zu (Tab. 1, Übersichtsartikel: Lee und Goldberg, 1998). Der eukaryontische Zellzyklus etwa benötigt Cyclin-abhängige Kinasen zusammen mit Aktivatoren (Cyclinen) und Inhibitoren (z.B. p27). Der Ubiquitin-abhängige Abbau dieser und anderer Zellzyklus-Proteine gewährleistet einen korrekten Ablauf des Zyklus (King et al., 1996).

Transkriptionsfaktoren sind kurzlebige Proteine, deren Anhäufung letale Folgen für die Zelle hätte und die daher rasch und streng reguliert vom Ubiquitin-Proteasom System abgebaut werden (Hochstrasser und Kornitzer, 1998). Auch hier existiert eine Vielzahl von Beispielen, von denen der Abbau von I $\kappa$ B bis jetzt am intensivsten untersucht ist, da dadurch die NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression aktiviert wird (Chen et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B spielt eine wichtige Rolle bei der Expression zahlreicher Cytokine und Zelladhäsionsmoleküle; er ist entscheidend an der Regulation des Immunsystems, der Apoptose, der Reaktion auf Stress und damit an einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt (Übersichtsartikel: Perkins, 1997).

Neben dem Abbau des Inhibitors, I $\kappa$ B, kann NF- $\kappa$ B noch auf eine weitere Art aktiviert werden, nämlich durch die Prozessierung von p105, dem Vorläufer von p50, einer Komponente des heterodimeren NF- $\kappa$ B. Nach Ubiquitinierung von p105 wird die C-terminale Domäne durch das 26S Proteasom abgebaut, während die 50 kD große N-terminale Domäne als stabiles und aktiviertes Protein bleibt (Palombella et al., 1994). Die Prozessierung von Proteinen und deren damit verbundene irreversible Veränderung ist ein weiterer wirksamer Regulationsmechanismus, der von Zellen unter Beteiligung des Proteasoms durchgeführt wird.

Aus der Rolle der Proteolyse bei diesen und weiteren essentiellen zellulären Prozessen wird die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom Systems für das Funktionieren einer Zelle deutlich. Störungen des Systems sind Ursache für verschiedene, voneinander unabhängige Krankheiten; so wird unter anderem eine Beteiligung des Proteasoms an der Entstehung von Krebs und neurologischen Erkrankungen diskutiert (Übersichtsartikel: Vu und Sakamoto, 2000).

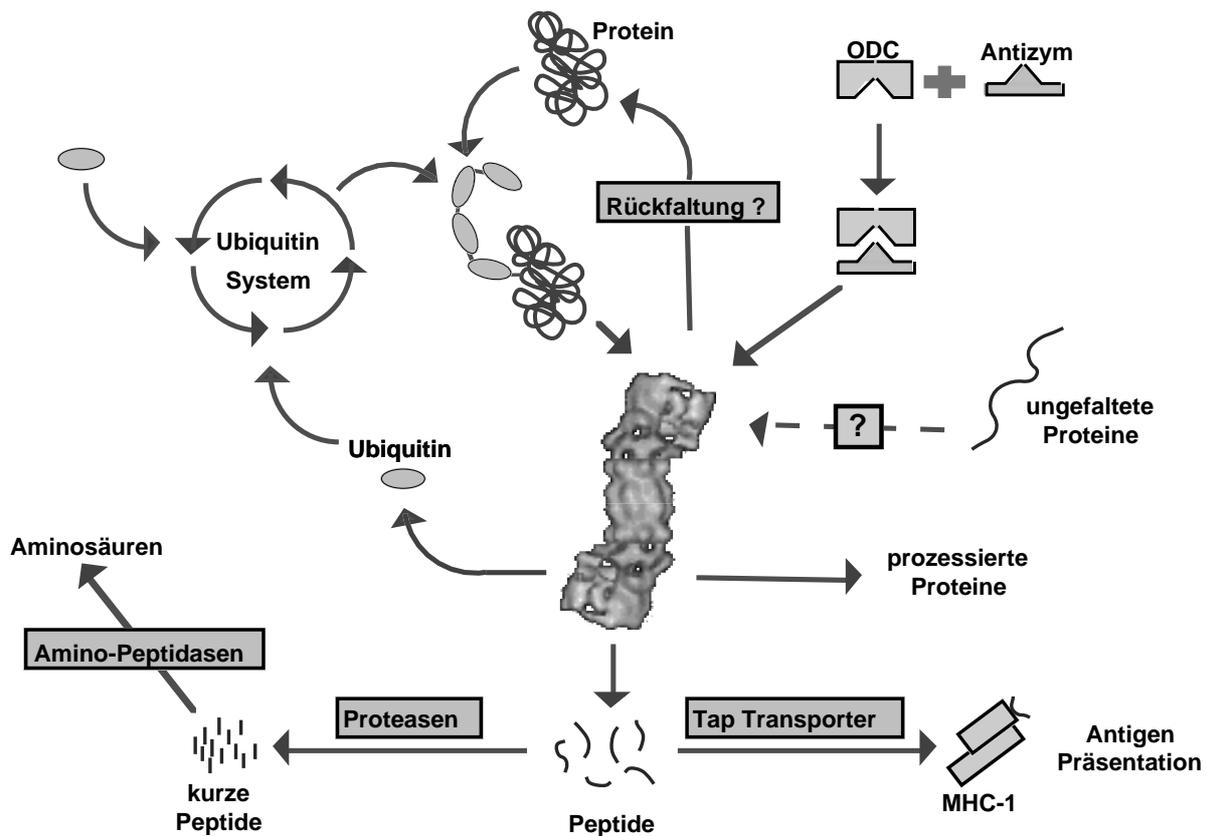
**Tab. 1: Beispiele für Substrate des 26S Proteasoms**

<b>Transkriptionsregulatoren</b>	<b>Onkogene Produkte und Tumorsuppressoren</b>
NK- $\kappa$ B (p105)	c-Jun
I $\kappa$ B	c-Fos
YY1	c-Mos
ATF2 („activating transcription factor 2“)	E2A Proteine
HIF1 („hypoxia-inducible factor 1“)	p53
ICER („inducible cAMP early repressor“)	
<b>Zellzyklus-Proteine</b>	<b>Enzyme</b>
Cycline (mitotische Cycline, G1 Cycline, etc.)	Proteinkinasen
Cyclin-abhängige Kinase (CDK) Inhibitoren	DNA Topoisomerase
	Ornithin Decarboxylase

Übersicht kurzlebiger, regulatorischer Proteine, die vom Ubiquitin-Proteasom System abgebaut werden (nach Lee und Goldberg, 1998).

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass das 26S Proteasom ungefaltete Proteine binden kann, deren Faltung katalysiert und native Proteine freisetzt (Braun et al., 1999, Strickland et al., 2000). Ein *in vivo* Beispiel für diese Chaperon-ähnliche Aktivität könnte die beobachtete Beteiligung des 26S Proteasoms an der Disassemblierung und Umordnung des „nuclear excision repair complex“ sein (Russell et al., 1999a).

In den meisten Fällen schneidet das Proteasom seine Substrate in Peptide mit einer Länge von 3 bis 23 Aminosäuren (Kisselev et al., 1999), wobei diese Peptide kurzlebig sind und sich nicht in der Zelle ansammeln. Die Mehrheit wird durch nachgeschaltete Proteasen und Aminopeptidasen, wie Tricorn (Tamura et al., 1998), Multicorn (Osmulski und Gaczyncka, 1998), THIMET (Silva et al., 1999) oder TPPII (Geier et al., 1999), in Aminosäuren zerlegt. Vom Proteasom erzeugte Peptide können auch vom TAP Transporter in das ER transportiert und in weiterer Folge für die Antigen Präsentation als MHC-Klasse-1 Liganden verwendet werden (Übersichtsartikel: Rock und Goldberg, 1999). Durch Assoziation des 20S Proteasoms mit einem weiteren Komplex, dem 200 kD großen PA28 Aktivator (Dubiel et al., 1992), kommt es zu einer Änderung der Spaltspezifität und damit zu einer vermehrten Bildung von 8 bis 9 Aminosäuren langen Antigen-Peptiden (Dick et al., 1996; Groettrup et al., 1996). Aufgrund der Beteiligung an der zellulären Immunantwort sind Proteasomen Angriffsziele für Viren. So ändern manche virale Proteine durch Interaktionen mit Untereinheiten sowohl des 20S Proteasoms als auch des Regulatorischen Komplexes die Aktivität des 26S Proteasoms dahingehend, dass die MHC-Klasse-1 Antwort minimiert und die virale Replikation verstärkt wird (Ferrell et al., 2000).



**Abb. 3: Die Aufgaben des 26S Proteasoms**

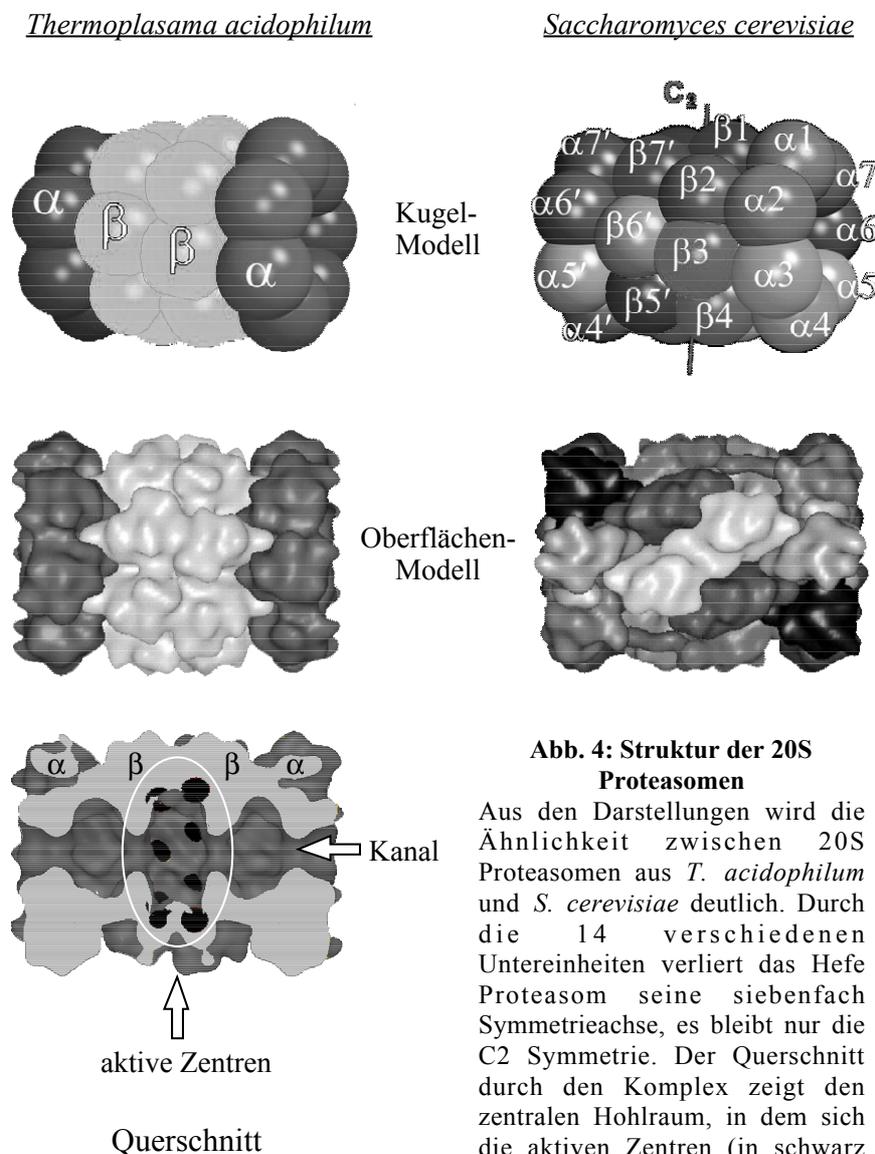
Proteine können vom 26S Proteasom durch verschiedene Mechanismen ausgewählt werden. Die meisten Proteine werden über ihre Polyubiquitinkette erkannt, zumindest in einem Fall ist aber die Markierung des Substratproteins durch ein anderes Protein bekannt. Es ist wahrscheinlich, dass 26S Proteasomen auch ungefaltete, nicht-ubiquitinierte Proteine binden können, und es gibt Hinweise, dass das 26S Proteasom auch an der Faltung von Proteinen beteiligt ist. Die Mehrheit der Substrate wird in Peptide abgebaut, die entweder durch nachgeschaltete Proteasen in Aminosäuren zerlegt oder als Antigene präsentiert werden. Einige Proteine werden nicht vollständig abgebaut, sondern spezifisch verkürzt. Diese Prozessierung führt zur Aktivierung der Proteine (modifiziert nach Glickman, 2000).

### 2.3.2. Das 20S Proteasom – der proteolytische Kern

20S Proteasomen wurden in Eukaryonten und Archaeobakterien (Übersichtsartikel: Zwickl et al., 2000) sowie einer Gruppe von Eubakterien, den Actinomyceten, gefunden (Tamura et al., 1995); die Mehrheit der Eubakterien jedoch enthält eine zwar homologe aber einfacher aufgebaute 240 kD Protease, HslV (Chuang et al., 1993). 20S Proteasomen sind über alle taxonomischen Grenzen hinweg strukturell einheitlich aufgebaut. Das archaeobakterielle Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* stellt hinsichtlich seiner Zusammensetzung gewissermaßen den Prototyp dar. Der hohle, zylinderförmige Komplex besteht aus nur zwei verwandten Untereinheiten,  $\alpha$  mit 25,9 kD und  $\beta$  mit 22,3 kD, die vier übereinandergelagerte Ringe bilden (Zwickl et al., 1992). Die beiden äußeren Ringe setzen sich aus je sieben  $\alpha$ -Untereinheiten und die beiden inneren aus je sieben  $\beta$ -Untereinheiten zusammen (Grziwa et al., 1991). Die vier Ringe des 20S Proteasoms bilden einen inneren Kanal, der sich zu drei ausgeprägten Hohlräumen erweitert und an 4 Stellen verengt (Abb. 4). Die Röntgenstrukturanalyse des *T. acidophilum* Proteasoms zeigte, dass die Öffnungen der  $\alpha$ -Ringe nur 13 Å im Durchmesser betragen (Löwe et al., 1995), weshalb nur ungefaltete Polypeptide in das Innere des Proteasoms gelangen können. Im zentralen Hohlraum befinden sich die proteolytisch aktiven Zentren der  $\beta$ -Untereinheiten, die Peptidbindungen nach dem Mechanismus der Ntn-Hydrolasen (N-terminale-nucleophile) hydrolysieren (Brannigan et al., 1995). Das N-terminale Nucleophil im Proteasom ist ein Threonin, das den Angriff auf die Peptidbindung startet und gleichzeitig als primärer Protonenakzeptor fungiert (Seemüller et al., 1995; Löwe et al., 1995). Das Abschirmen der aktiven Zentren von der Umgebung erlaubt eine effiziente Hydrolyse der Proteine, die in das Proteasom transportiert werden, während es gleichzeitig andere vor unspezifischer Proteolyse schützt.

Im Laufe der Evolution hat sich die Zahl der 20S Untereinheiten von 2 in Archaeobakterien auf je 7 verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten in Eukaryonten erhöht (Kirstensen et al., 1994). Eukaryontische Proteasomen bestehen daher aus 2 identischen Hälften, die jeweils eine Kopie jeder Untereinheit besitzen, wobei jedes Protein eine genau definierte Position einnimmt (Groll et al., 1997; Kopp et al., 1997). Da nur 3 der  $\beta$ -Untereinheiten aktiv sind, kommt es zu einer Reduktion der proteolytisch aktiven Zentren von 14 in Archaeobakterien auf nur 6 in Eukaryonten. Basierend auf Mutationsexperimenten und der Kristallstruktur des Hefe 20S Proteasoms konnte jeder der 3 Untereinheiten eine bestimmte proteolytische Aktivität (Trypsin-ähnlich, Chymotrypsin-ähnlich oder Peptidylglutamyl-hydrolysierend) zugeordnet werden (Übersichtsartikel: Baumeister et al., 1998; Bochtler et al., 1999).

In höheren Eukaryonten erhöht sich die Komplexität der 20S Proteasomen noch zusätzlich, da bei einer Immunantwort durch  $\gamma$ -Interferon die 3 aktiven  $\beta$ -Untereinheiten durch fakultative Untereinheiten, LMP2, LMP7 und MEC11, in neu synthetisierten Proteasomen ersetzt werden (Rock und Goldberg, 1999). Die Funktion dieser 3 Immuno-Untereinheiten ist noch nicht vollständig geklärt. Ihr Einbau führt zu einem höheren Anteil an Peptiden mit hydrophoben oder basischen C-Termini, wie sie die Mehrheit der von MHC-Klasse-1 Molekülen präsentierten Antigene besitzt. Diese Peptide entstehen, wenn auch in geringerer Menge, ebenso beim Abbau von Proteinen durch normale 20S Proteasomen, weshalb die Immuno-Untereinheiten auch nicht essentiell für die Antigenpräsentation sind.



### 2.3.3. Der Regulatorische Komplex

Der Regulatorische Komplex (RC), auch als *ball* (Hoffman et al., 1992),  $\mu$  *particle* (Udvardy, 1993), *PA 700* (Chu-Ping et al., 1994) und *19S cap complex* (Peters et al., 1994) bezeichnet, besteht aus mindestens 17 verschiedenen Proteinen, seine Molekularmasse beträgt ungefähr 1 MD (Glickman et al., 1998a). Während bei gereinigten Proteasomen immer eine Mischung aus freien 20S Proteasomen, 20S Proteasomen mit nur einem Regulatorischen Komplex (20S-RC<sub>1</sub>), sowie 20S Proteasomen mit zwei Regulatorischen Komplexen (20S-RC<sub>2</sub>) gefunden wird, scheint *in vivo* der überwiegende Teil als 20S-RC<sub>2</sub> vorzuliegen (Russel et al., 1999b). Aufgrund ihrer Instabilität existieren noch keine wirklich aussagekräftigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen an freien Regulatorischen Komplexen. *In vitro* kann von 26S Proteasomen aus einem Hefestamm, dessen RC Untereinheit Rpn10 deletiert ist, unter Hochsalzbedingungen ein Subkomplex abdissoziiert werden (Glickman et al., 1998b). Dieser Subkomplex entspricht jenem Teil des Komplexes, der weiter vom 20S Proteasom entfernt ist und wird daher als „lid“ bezeichnet. Die übrigen Untereinheiten des Regulatorischen Komplexes bleiben weiter assoziiert, aufgrund der direkten Interaktion mit dem 20S Proteasom wird dieser Subkomplex „base“ genannt.

Der „base“-Komplex enthält sechs verschiedene, jedoch homologe ATPasen und drei weitere Proteine (non-ATPases). Die ATPasen gehören zur Familie der AAA Proteine (ATPases associated with a variety of cellular activities) (Confalonieri und Duguet, 1995; Beyer, 1997), die als Untereinheiten vieler zellulärer Holoenzyme an so unterschiedlichen Zellaktivitäten wie Translokation, Transport, Membranfusion und Proteolyse beteiligt sind (Patel und Latterich, 1998). Biochemische und genetische Untersuchungen in verschiedenen Organismen zeigten spezifische Interaktionen einzelner proteasomaler ATPasen und legen die Annahme nahe, dass sie einen hexameren Ring bilden (Ferrell et al., 2000). Hexamere Ringe sind auch von anderen AAA ATPase Komplexen bekannt, wie zum Beispiel PAN aus *Methanococcus jannaschii* (Zwickl et al., 1999), einem Archaeobakterium, und ARC aus *Rhodococcus erythropolis* (Wolf et al., 1998), einem Eubakterium. Beide prokaryontischen Komplexe sind aber nur aus einer einzigen ATPase aufgebaut. Da durch Zugabe von PAN *Thermoplasma* 20S Proteasomen *in vitro* gefaltete Proteine, wie Casein und Lactalbumin, hydrolysieren können, dürfte es sich bei diesem Komplex um den prokaryontischen Vorläufer des Regulatorischen Komplexes handeln (Zwickl et al., 1999).

In *Drosophila* können die ATPasen im freien RC proteolytisch abgebaut werden, während sie im 26S Proteasom nicht zugänglich sind, was eine direkte Assoziation des hexameren ATPase

Rings mit dem Ring der  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms vermuten lässt (Haracska und Udvardy, 1996). Solch eine kolineare Anordnung von ATPase und Protease findet man auch bei den prokaryontischen ATP-abhängigen Proteasekomplexen, ClpAP und ClpXP (Grimaud et al., 1998), sowie HslVU (Rohrwild et al., 1997; Übersichtsartikel: Lupas et al., 1997; Zwickl et al., 1999).

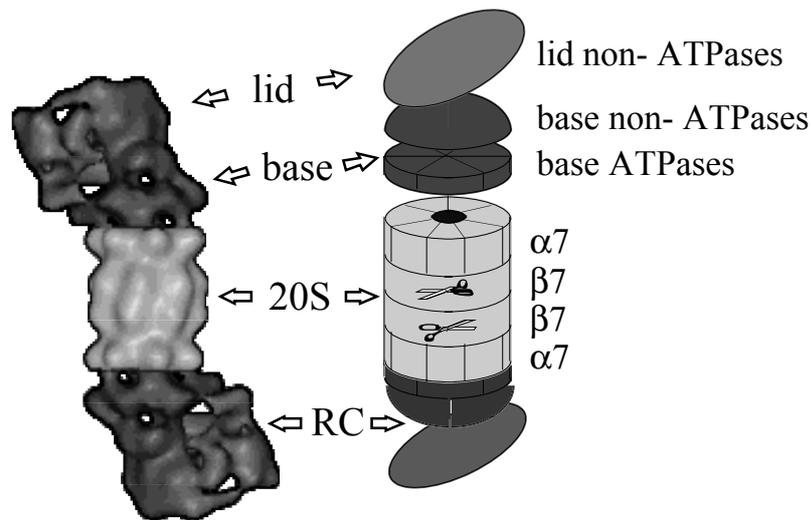
Die Hydrolyse von ATP ist für den Abbau von Proteinen durch das 26S Proteasom notwendig, experimentelle Beweise für die exakten Aufgaben der ATPasen fehlen aber noch. Da das 26S Proteasom in der Abwesenheit von ATP in das 20S Proteasom und die regulatorischen Komplexe zerfällt, dürften die ATPasen für die Assemblierung des Komplexes verantwortlich sein. Aus der Kristallstruktur des Hefe 20S Proteasoms ist ersichtlich, dass die Öffnung in das Innere des Proteasoms von den N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten blockiert wird (Groll et al., 1997). Die ATPasen dürften für das Öffnen des Kanals verantwortlich sein und dadurch den Zugang zu den proteolytisch aktiven Zentren kontrollieren. Da der Kanal zu eng ist, als dass native Proteine eindringen könnten, müssen die Proteine vor ihrem Abbau entfaltet und in das Innere des 20S Proteasoms geschleust werden (Larsen und Finley, 1997). Diese Funktion, als reverse Chaperon Aktivität bezeichnet, wird wahrscheinlich ebenfalls von den ATPasen durchgeführt. Sie wurde sowohl für PAN (Benaroudj und Goldberg, 2000), den archaebakteriellen Vorläufer des regulatorischen Komplexes, als auch für die ATPase-Komplexe der bakteriellen Proteasen ClpAP und ClpXP (Weber-Ban et al., 1999; Kim et al., 2000; Singh et al., 2000) experimentell nachgewiesen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass regulatorische Komplexe aus Säugetieren bzw. „base“-Komplexe aus Hefe *in vitro* die Aggregation von denaturierten Proteinen reduzieren und bestimmte denaturierte Proteine rückfalten können (Braun et al., 1999; Strickland et al., 2000). Ob der „base“-Komplex auch *in vivo* für die Rückfaltung von Proteinen von Bedeutung ist, oder ob die Chaperon Aktivität nur zum Entfalten dient, ist noch nicht geklärt.

Die Interaktion von 20S Proteasomen und ATPase-Ringen ist in seiner Organisation einem Zellorganell vergleichbar (Rubin und Finley, 1995): Die proteolytisch aktiven Zentren sind nach dem Prinzip der Selbst-Kompartimentalisierung (Baumeister et al., 1998) im Inneren des 20S Proteasoms vom Cytoplasma abgesondert, und der regulatorische Komplex benutzt die aus der ATP-Hydrolyse gewonnene Energie um den Zugang zu öffnen, die Substratproteine zu entfalten und anschließend durch den Kanal zu transportieren.

Obwohl Gegenstand intensiver Untersuchungen, ist noch nicht geklärt, wie die ubiquitinierten Substratproteine mit dem regulatorischen Komplex interagieren. Die vorherrschende

Hypothese geht davon aus, dass der Komplex eine Untereinheit oder Oberfläche enthält, die spezifisch die Multiubiquitinkette erkennt und bindet (Thrower et al., 2000). Bis jetzt kann noch nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung nicht unmittelbar über die Ubiquitinkette erfolgt, sondern dass die Ubiquitinierung der Proteine deren tertiäre Struktur verändert und damit die Affinität für das 26S Proteasom erhöht. *In vitro* bindet rekombinant exprimiertes Rpn10, eine der „non-ATPases“ Untereinheiten des „base“-Komplexes, Multiubiquitin-Ketten (Deveraux et al., 1994). Ähnlich dem 26S Proteasom bevorzugt freies Rpn10 Ketten von mindestens 4 Ubiquitinen. Die Deletion von Rpn10 in *S. cerevisiae* ist nicht letal;  $\Delta rpn10$  Mutanten bauen den Großteil der ubiquitinierten Proteine mit derselben Rate wie der Wildtyp ab und weisen keinen ausgeprägten Phänotyp auf. Rpn10 kann daher nicht der einzige Rezeptor des RC für Ubiquitinkonjugate sein (Van Nocker et al., 1996). Neben den verbleibenden 2 Untereinheiten des „base“-Komplexes, deren Funktion bis jetzt noch nicht geklärt ist, sind natürlich die Proteine des „lid“-Komplexes mögliche Bindungspartner der Multiubiquitinketten. Die Assoziation des „lid“ mit dem restlichen Proteasom ist für den Abbau ubiquitiniertes Substrate notwendig (Glickman et al., 1998b) und lässt daher eine direkte Interaktion von „lid“ und Ubiquitin wahrscheinlich erscheinen.

Der „lid“-Komplex konnte bis jetzt aus *S. cerevisiae* (Glickman et al., 1998b) und *H. sapiens* (Henke et al., 1999) isoliert werden. Im Gegensatz zum „base“-Komplex ist wenig über spezifische Interaktionen von „lid“-Untereinheiten bekannt (Ferrell et al., 2000), und eine erste elektronenmikroskopische Untersuchung dieses asymmetrischen Partikels (Kapelari et al., 2000) erlaubt noch keine definitiven Aussagen über seine Struktur. Die Proteine des „lid“-Komplexes enthalten 2 strukturelle Motive, das PCI und das MPN Motiv (Hofmann und Bucher, 1998). Beide wurden auch in anderen Proteinen gefunden, die ebenfalls Komponenten von großen Proteinkomplexen, dem COP9 Signalosom (Chamovitz et al., 1996; Seeger et al., 1998) und dem eukaryontischen Translations-Initiations-Faktor eIF3 (Asano et al., 1997), sind. Möglicherweise fördern PCI und MPN Motive Protein-Protein Interaktionen, experimentelle Nachweise für diese Annahme fehlen aber bis jetzt.

**Abb. 5: Struktur des 26S Proteasoms**

Das 3D Modell des *Drosophila* 26S Proteasoms basiert auf EM Aufnahmen und der Kristallstruktur des *Thermoplasma* 20S Proteasoms (Walz et al., 1998). Der RC besteht aus 2 Subkomplexen, „base“ und „lid“. Der „base“-Komplex enthält alle proteasomalen ATPasen, die wahrscheinlich einen hexameren Ring bilden, und direkt mit dem 20S Proteasom assoziiert sein dürften. In Hefe konnte gezeigt werden, dass der „lid“-Komplex abdissoziieren kann, aber für den Abbau ubiquitinerter Proteine essentiell ist (Glickman et al., 1998b).

## 2.4. DEUBIQUITINIERENDE ENZYME

Die Ubiquitinierung von Proteinen ist ein reversibler Prozess und kann durch deubiquitinierende Enzyme (DUB) wieder rückgängig gemacht werden. DUB sind Thiolproteasen, die spezifisch Ester-, Thiolester- und Amidbindungen zwischen dem C-terminalen Glycin 76 von Ubiquitin und Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen hydrolysieren. Sie können in 2 Enzymfamilien unterteilt werden: die Ubiquitin COOH-terminale Hydrolasen (UCH) und die Ubiquitin-spezifisch prozessierenden Proteasen (UBP). UCH sind charakterisiert durch eine 210 Aminosäuren lange Domäne mit 4 hochkonservierten Sequenzblöcken, die die katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat, enthalten (Wilkinson, 1997). Sie schneiden bevorzugt zwischen Ubiquitin und kleinen Molekülen, wie Thiolen, Aminen oder Peptiden (Pickart und Rose, 1985; Liu et al., 1989). Die Familie der UBPs ist weniger einheitlich, die Homologie beschränkt sich auf einige kurze Abschnitte, die wahrscheinlich die katalytischen Domänen bilden (Baker et al., 1992; Papa und Hochstrasser, 1993). UBPs hydrolysieren die Bindung zwischen 2 Ubiquitinen oder zwischen Ubiquitin und einem anderen Protein.

Ubiquitine werden entweder als Polyubiquitine oder als Fusionsproteine aus einem Ubiquitin und den ribosomalen Proteinen, S27a oder L40, exprimiert (Özkaynak et al., 1987; Finley et al., 1987). Zur Freisetzung monomerer Ubiquitine findet eine Prozessierung dieser Proproteine durch deubiquitinierende Proteine statt.

Die Aktivierung von Ubiquitin für die Bindung an andere Proteine erfolgt über die eines Thiolesters mit dem „Ub-activating enzyme“ E1, einem „Ub conjugating enzyme“ E2 und

einer „Ub-protein ligase“ E3. (siehe Kap., Scheffner et al., 1998). Intrazelluläre Nukleophile, wie Amine oder Glutathione, können an derart aktiviertes Ubiquitin binden und damit für die Zelle unbrauchbar machen. Um diese, dem Ubiquitin-Proteasom System entzogenen Ubiquitine wiederzugewinnen, kommt es zu einer Hydrolyse der inaktiven Ubiquitin-Derivate durch deubiquitinierende Proteine.

Deubiquitinierende Proteine greifen noch an anderer Stelle in den Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau ein: Proteine können durch Abspaltung der Multiubiquitinkette vor der Proteolyse durch das Proteasom bewahrt werden. Lam et al. (1997a+b) charakterisierten erstmals eine deubiquitinierende Aktivität in Regulatorischen Komplexen aus Säugetieren, die die Multiubiquitinkette eines Substratproteins schrittweise verkürzt, indem ein Ubiquitin nach dem anderen hydrolysiert wird. Erfolgt dieses „Stutzen“ der Ubiquitinkette unmittelbar nach der Assoziation mit dem Regulatorischen Komplex, könnte eine sehr kurze Kette vollständig abgebaut und damit das Degradationssignal entfernt sein, bevor das Protein entfaltet und in das Innere des 20S Proteasoms geschleust werden kann. Bei ausreichend ubiquitinierten Proteinen hingegen kann die Proteolyse beginnen bevor die Ubiquitinkette vollständig abgebaut ist, und dadurch ein Wiederabdissoziieren des Proteins verhindert werden. Ein solches Editieren der Ubiquitinkette erlaubt den Zellen eine weitere Regulation des Proteinabbaus und stellt sicher, dass nur korrekt ubiquitinierte Proteine verdaut werden.

Ubiquitin ist ein langlebiges Protein, und ein einzelnes Molekül durchläuft mehrmals den Kreislauf des Ubiquitin-Proteasom Systems (Haas und Bright, 1987). Voraussetzung dafür ist, dass freigesetzte Multiubiquitinketten in monomere Ubiquitine zerlegt werden. Für die Regenerierung von Ubiquitin wird in einem ersten Schritte das Peptid, welches nach dem Abbau des Substratproteins durch das Proteasom übrig bleibt, entfernt; in *S. cerevisiae* scheint Doa4, ein UBP Enzym, für diese Aktivität verantwortlich zu sein (Papa und Hochstrasser, 1993). Danach wird die Multiubiquitinkette von einer weiteren UBP, der Isopeptidase T, in die monomeren Ubiquitine zerlegt (Wilkinson et al., 1995; Americk et al., 1997).

Mutationsstudien zeigten, dass deubiquitinierende Enzyme an einer Vielzahl biologischer Prozesse, unter anderem an der Kontrolle des Zellwachstums, der Zelldifferentiation und der Onkogenese beteiligt sind (Übersichtsartikel: Wilkinson, 1997). Dies und die hohe Anzahl verschiedener deubiquitinierender Enzyme lassen noch weitere, spezifischere Funktionen dieser Proteine vermuten.

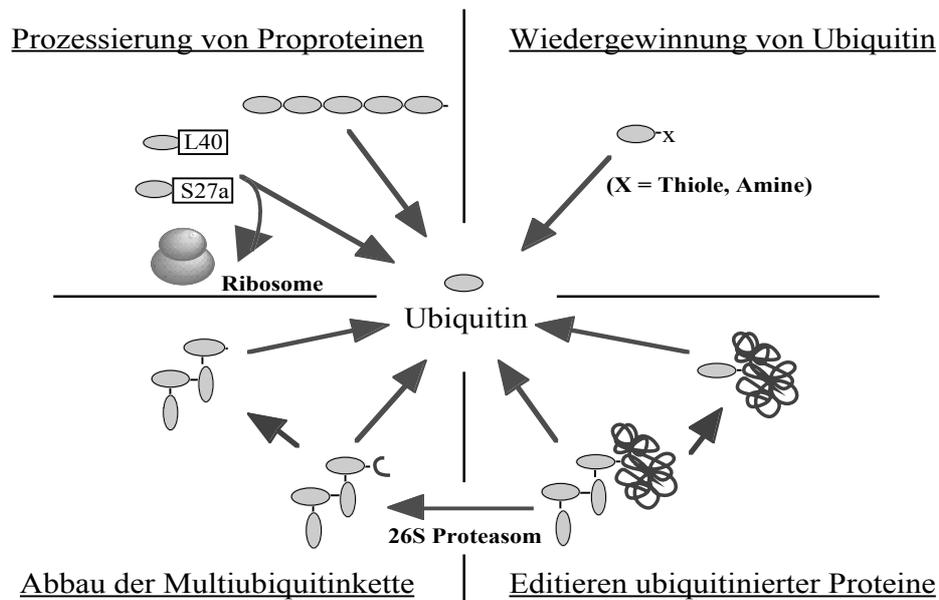


Abb. 6: Aufgaben deubiquitinierender Proteine

## 2.5. AUFGABENSTELLUNG

26S Proteasomen aus *Drosophila melanogaster* sind aufgrund ihrer Homogenität und Stabilität besonders geeignet für Strukturuntersuchungen mittels Elektronenmikroskopie, waren aber bis jetzt biochemisch noch kaum charakterisiert. Ein Ziel dieser Arbeit war daher alle Untereinheiten des *Drosophila* RC zu identifizieren und wenn möglich mit Immunoelektronenmikroskopie zu lokalisieren. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine bisher unbekannte RC Untereinheit gefunden, die kloniert, rekombinant exprimiert und eingehend biochemisch untersucht werden konnte.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. MATERIALIEN

##### 3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden generell von Merck, Sigma oder Riedel de Haen in höchster Reinheit bezogen, falls von anderen Firmen, ist dies hier oder direkt im Text angegeben. Sämtliche Puffer wurden mit Milli-Q Wasser hergestellt.

Agarose (SeaKem <sup>®</sup> LE)	FMC
AMC und Suc-LLVY-AMC	Bachem
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Hefeextrakt	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bio-Gel Hydroxyapatit	BioRad
DE-52 Sephacel (DEAE Zellulose)	Whatman, Maidstone
<i>Drosophila</i> Zuchtbehälter	Greiner
Faden-Agar	Gewürzmühle Brecht Probio GmbH
Maismehl	Neuform
Malzextrakt	Bäko
Nanosep <sup>®</sup> -, Microsep <sup>™</sup> -, Macrorep <sup>®</sup> - Konzentratoren	Pall
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Nickel-NTA Agarose	Qiagen
Optitran <sup>®</sup> Nitrozellulose Membran	Schleicher & Schuell

Petrischalen	Greiner
Protogel	National Diagnostics
Rübensirup	Grafschafter Krautfabrik
Sepharose 6B CL	Amersham Pharmacia Biotech Inc.
Sojamehl	Neuform Hensel
Triton-X 100	Roth
Trockenhefe	Hefefabrik Dr. Pleser
Ubiquitaldehyd (Ub-Al)	BostonBiochem
Ubiquitin-AMC (Ub-AMC)	BostonBiochem
Zellkulturflaschen	Greiner

### 3.1.2. Kits und Standards

ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
DNA Ligation Kit	Takara Shuzo Co., Ltd.
<i>Drosophila</i> Expressions System DEST™	Invitrogen
Qiagen Plasmid Midi und Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
DNA-Fragmentlängenstandards	Appligene
Proteingrößenstandard LMW	Bio-Rad

### 3.1.3. Enzyme und Antikörper

Restriktionsendonucleasen	Fermentas, New England Biolabs
DNaseI und RNaseT1	Roche Diagnostics
Pwo DNA Polymerase	Roche Diagnostics
Anti-FLAG® M2 mAb	Sigma
Anti-FLAG® M5 mAb	Sigma
Anti-Kaninchen-IgG (gekoppelt mit	

alkalischer Phosphatase)	Sigma
Anti-Maus-IgG (gekoppelt mit alkalischer Phosphatase)	Sigma

### 3.1.4. *Drosophila* Zelllinie und Medien

Schneider 2 (S2) Zellen:

- Makrophagen ähnliche Zellen, die ursprünglich aus einer Primärkultur von 20 – 24 Stunden alten *Drosophila melanogaster* Embryonen isoliert wurden (Schneider, 1972)
- charakterisiert und bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

S2-Medium	90	%	DES™ Expressionsmedium (Invitrogen, USA)
	10	%	hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (Biochrom KG, Berlin)
	50	U	Penicillin G pro 1 L Medium
	50	µg	Streptomycinsulfat pro 1 L Medium

### 3.1.5. Bakterienstämme und Medien

Stamm zur Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA:

Epicurian Coli® X11-Blue {*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>R</sup>)]} (Stratagene, USA)

Stamm zur Protein Expression:

BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL {*E. coli* B F-*ompT hsdS* (rB-mB-) *dcm* + Tet<sup>R</sup> *gal λ* (DE3) *endA hte* [*argU ileY leuW cam<sup>R</sup>*]} (Stratagene, USA)

*Drosophila* EST cDNA Klone (Rubin et al., 2000) wurden von Research Genetics, USA als Stichkulturen in LB-Agar erworben.

Alle *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium (Sambrook et al. 1989) bei 37°C (bzw. 20°C) und ausreichender Sauerstoffversorgung kultiviert. Transformanten wurden als Glycerinkulturen (20%) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

LB (Luria-Bertani Broth)	10	g	Bacto-Trypton
	5	g	Hefeextrakt
	5	g	NaCl
			pro 1 L H <sub>2</sub> O

### 3.1.6. Plasmide

pET22b(+)                      T7 *lac* promoter, pBR322 origin, Amp<sup>R</sup>  
pAc5/V5-His                    Ac5 promoter, SV40 polyadenylation signal, ColE1 origin, Amp<sup>R</sup>

### 3.1.7. Primer

Primer für die Klonierung von p37A-His<sub>6</sub>:

p37A-H/N-term:    5'TACTATTAACATATGGGCGACGGTGCT3'

p37A-H/C-term:    5'CTGTA ACTCGAGGTCGGTATCCTTTTTGCGC3'

Primer für die Mutation von Cys86 zu Ser in p37A-His<sub>6</sub>:

p37A-H/C86S:      5'GATCAACAACGCAAGCGCCACCCAGGC3'

3'CTAGTTGTTGCGCTTGCGGTGTGGTCCG5'

Primer für die Klonierung von FLAG-Fusionsproteinen

p37A-F/N-term:      5'CGGGGTACCATGGGCGACGGTGCTGGAAA3'

p37A-F/C-term:      5'CCGCTCGAGTTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCGTCGGT  
ATCCTTTTTGCGCTG3'

F-p42B/N-term:      5'CGGGGTACCATGGATTACAAGGACGACGATGACAAGGCCG  
GAGCAACTTTTC3'

F-p42B/C-term:      5'CCGCTCGAGTTACGACAGCTTCTTAGCCTTC3'

p42D-F/N-term:      5'CGGGGTACCATGCCGGACAATCTGCGGGT3'

p42D-F/C-term:      5'CCGCTCGAGCTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCAACGG  
GCTTGTAGTCCAGCTT3'

β2-F/N-term:        5'CGGGGTACCATGGATTTGGATAACGCACGC3'

β2-F/C-term:        5'CTAGTCTAGATACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAATCAGAA  
ATCTCCATGGGCACCG3'

## 3.2. DROSOPHILA KULTUREN

### 3.2.1. Kultur von *D. melanogaster*

Für eine ausreichende Menge an *D. melanogaster* Embryonen (Canton-S Stamm) zur Isolierung von 26S Proteasomen war es notwendig, eine Massenkultur von Fliegen anzulegen. Durch optimale Wachstumsbedingungen (25°C, 70% Luftfeuchtigkeit, 24 Stunden Licht-Dunkelzyklus) wurde eine maximale Ausbeute an Embryonen sichergestellt. Um die Möglichkeit einer Kontamination der Fliegenpopulation durch Pilze, Milben oder ähnlichen gering zu halten, wurden für jede Massenkultur frische Fliegen (je ca. 20 Stück) vom Drosophila Stock Center (Umea, Schweden) angefordert. Zur raschen Vermehrung wurden die Fliegen alle 1 – 3 Tage in neue Futterröhrchen transferiert bzw. die neugeschlüpften Fliegen auf mehrere Röhrchen verteilt. Da eine weibliche Fliege in ihrem Leben im Durchschnitt 700 – 1000 Eier legt und die Generationszeit von *Drosophila* bei 25°C 9 Tage beträgt, mussten bald einige Röhrchen bei 18°C inkubiert werden, um die Generationszeit zu verdoppeln und damit eine synchronisiertes Wachstum der Population zu erhalten. Dadurch war es möglich, in 3 bis 4 Wochen ca. 100.000 Fliegen heranzuziehen, die in einen einzigen, großen Fliegenbehälter überführt wurden. In diese Behälter wurden Apfelsaftagarplatten, die am Rand mit Bäckerhefe bestrichen waren, zur Eiablage gelegt. Die Platten wurden alle 12 – 16 Stunden gewechselt, um ein Alter der Embryonen zwischen 0 und 16 Stunden sicherzustellen, und danach bei 4°C aufbewahrt, um das Wachstum der Embryonen stark zu verringern. Damit konnten größere Mengen an Eiern gesammelt und auf einmal aufgeschlossen werden.

Fliegenfutter	160 g Faden-Agar	440 g Rübensirup
	360 g Trockenhefe	1600 g Malzextrakt
	200 g Sojamehl	126 ml Propionsäure
	1600 g Maismehl	15 g Nipagin in 100 ml EtOH pro 20 L H <sub>2</sub> O

### 3.2.2. Aufschluss von *D. melanogaster* Embryonen

Die Embryonen wurden mit deionisiertem H<sub>2</sub>O von den Agarplatten in ein Sieb gespült und intensiv mit Wasser gewaschen, bis alle Hefe und Agarreste entfernt waren. Zur Entfernung

des Chorions der Embryonen wurden diese in einer 14% Natriumhypochlorid-Lösung solange geschwenkt bis sich dieses auflöste und die Embryonen an die Oberfläche aufstiegen. Anschließend wurden sie wieder mit kaltem, deionisiertem H<sub>2</sub>O gespült, um das Natriumhypochlorid zu entfernen und durch Abwiegen die Ausbeute an Embryonen bestimmt.

Die entchorionierten Embryonen wurden in ca. 3 Volumen Homogenisierungspuffer mittels eines Dounce Homogenisierers aufgeschlossen (3 Stöße mit Pistill B), und der Extrakt wurde dann für 15 Minuten bei 20000 Upm (Sorvall SS34 Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolierung der Proteasomen bei -80°C aufbewahrt.

Homogenisierungspuffer	0,25	M	Saccharose
	20	mM	Tris-HCl pH 7,5
	100	mM	NaCl
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	1	mM	DTT
	2	mM	ATP

### 3.2.3. Zellkultur von *Drosophila* S2 Zellen

Zellkulturen wurden von gefrorenen S2 Stocks (ca.  $1 \times 10^7$  Zellen pro Cryo-Röhrchen) aus gestartet. Nach raschem Auftauen im Wasserbad (37°C) und Entfernung des DMSO durch Zentrifugation (3 min, 1000 x g) in 5 ml S2-Medium wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. S2 Zellen wurden bei 25°C in geschlossenen Zellkulturflaschen vermehrt bis sie nach ungefähr 4 Tagen eine Dichte zwischen 6 und  $20 \times 10^6$  Zellen/ml erreichten. Die Zellen wurden mit Medium auf 2 bis  $4 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt und auf weitere Flaschen aufgeteilt bis genug Zellen zur Transfektion vorhanden waren. Von stabil transfizierten Zelllinien wurden immer Aliquots in Gefriermedium in flüssigen Stickstoff weggefroren.

Zur Isolierung von Proteinen aus transfizierten Zellen wurden diese in Spinner Flaschen (Wheaton) angezogen, um eine möglichst große Menge an Zellen zu erhalten. Aus 1000 ml Medium mit einer Zelldichte von  $12 \times 10^6$  Zellen konnten ungefähr 3,5 g Zellen (Zellnaßgewicht) geerntet werden. Nach Zentrifugation (3 min, 1000 x g) wurden die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Gefriermedium	45	%	konditioniertes S2-Medium
	45	%	frisches S2-Medium
	10	%	DMSO

PBS-Puffer pH 7,4	137	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	10	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,8	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### 3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 3.3.1. Grundlegende Techniken

##### Isolierung von DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurde der QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit verwendet. Größere Mengen an Plasmid DNA für Transfektionen wurden mit dem QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Midi oder Maxi Kit isoliert. Gereinigte DNA wurde in TE-Puffer bei -20°C gelagert.

Aus Agarosegelen wurden PCR-Produkte beziehungsweise Restriktionsfragmente mit dem QIAquick<sup>™</sup> Gel Extraction Kit eluiert.

TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl pH 8,0
	1	mM	EDTA pH 8,0

##### Konzentrationsbestimmung von DNA

Konzentrationen von wässrigen DNA-Lösungen wurden durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für die Berechnung der Konzentration wurde für eine OD<sub>260</sub> von 1,0 eine Konzentration von 20 mg Plasmid-DNA/ml angenommen.

##### Agarose Gelelektrophorese

Zur Analyse und Reinigung von PCR-Produkten und geschnittenen DNA-Fragmenten wurden die DNA-Proben elektrophoretisch bei konstanter Spannung (5 V/cm) in 0,5 bis 1%igen horizontalen Flachbett-Agarosegelen aufgetrennt. Zur Detektion der DNA unter UV-Licht wurden die Gele anschließend 15 min in einer 0,4 %igen Ethidiumbromidlösung geschwenkt.

TAE-Laufpuffer	40	mM	Tris/Acetat pH 8,0
	80	mM	Na-Acetat
	2	mM	EDTA pH 8,0

### DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA (EST cDNA Klone und Expressionsvektoren) wurde mit dem ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit sequenziert. Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente wurde von Marius Boicu (MPI für Biochemie, Martinsried) mit einem 337A DNA Sequenzer (Applied Biosystems) durchgeführt.

### Oligonukleotidsynthese

Oligonukleotide wurden von Uta Schimanko (MPI für Biochemie, Martinsried) mit einem DNA Synthesizer 381A (Applied Biosystems) nach dem Phosphoramiditverfahren synthetisiert.

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR Reaktionen wurden mit der hitzestabilen Pwo DNA Polymerase aus *Pyrococcus woesei* in 50 µl Ansätzen nach dem Herstellerprotokoll in einem GeneAmp® PCR System 2400 Thermal Cycler (Perkin Elmer) durchgeführt.

### Restriktionsspaltung von DNA

dsDNA verschiedener Herkunft (Plasmide, PCR-Produkte) wurde in 20 µl Ansätzen mit spezifischen Restriktionsendonukleasen gespalten, wobei pro µg DNA 3 – 5 U Enzym eingesetzt und bei der optimalen Reaktionstemperatur (normalerweise 37°C) 1 – 3 h inkubiert wurde.

### Ligation

Die Ligation von PCR Produkten und Plasmiden erfolgte mit dem DNA Ligation Kit (TaKaRa). Auf eine Dephosphorylierung der DNA wurde verzichtet. Die Menge an eingesetztem Vektor betrug 20 – 50 ng, das Insert wurde in 10fachen molarem Überschuss eingesetzt.

### 3.3.2. Klonierung von PCR Fragmenten

cDNA, die den ORF für p37A Protein kodiert, wurde durch eine PCR mit den beiden Primern p37A-H/N-term und p37A-H/C-term amplifiziert, wobei eine N-terminale *NdeI* und eine C-terminale *XhoI* Restriktionsschnittstelle eingeführt wurden. Nach Verdau und Reinigung des PCR Produktes wurden es in den prokaryontischen Expressionsvektor pET22b subkloniert,

dadurch kodierte die resultierende DNA ein Fusionsprodukt aus p37A mit einem His<sub>6</sub>-tag am C-terminus. Ähnlich wurde bei den RC Untereinheiten die mit einem FLAG-Epitop versehen wurden, vorgegangen, mit dem Unterschied, dass das Epitop über die PCR eingeführt wurde und die PCR-Produkte in den *Drosophila* Expressionsvektor pAC5.1 subkloniert wurden.

### 3.3.3. Transformation von *E. coli*

#### Chemisch kompetente Zellen

XL1-Blue oder BL21(DE3)RIL *E. coli* Zellen wurden in 100 ml LB-Medium (für BL21(DE3)RIL mit 34 µg/ml Chloramphenicol) zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 angezchtet. Nach Ernte der Zellen (5 min, 2000 UpM, 4°C) wurden sie vorsichtig in 30 ml kaltem (4°C) TFB 1 Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (5 min, 2000 UpM, 4°C) und in 4 ml eiskaltem TFB 2 Puffer aufgenommen. Aliquots zu 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C gelagert.

TFB 1 Puffer pH 5,8	100	mM	RbCl
	50	mM	MnCl <sub>2</sub>
	30	mM	KAc
	10	mM	CaCl <sub>2</sub>
	15	%	Glyzerin

#### Transformation

2 µl der Ligationsansätze wurden mit 50 µl frisch aufgetauten chemisch kompetenten Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einem Hitzeschock (42°C für 45 Sekunden) ausgesetzt und danach weitere 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 950 µl SOC Medium wurden die Zellen für 90 min bei 37°C unter Schütteln regeneriert, bevor 100 µl der Transformationskultur auf LB/Amp(Camp)-Agarplatten ausplattiert und inkubiert (16 h bei 37°C) wurden. 12 – 24 willkürlich ausgewählte Kolonien wurden in jeweils 3 ml LB/Amp-Medium inokuliert und für 12 – 16 h unter Schütteln angezogen. Positive Klone wurden anschließend durch Plasmid Mini-Präparationen und Restriktionsverdaus identifiziert und selektiert.

SOC-Medium	2	g	Bacto-Trypton
	0,5	g	Hefeextrakt
	1	ml	1 M NaCl
	0,25	ml	1 M KCL

1	ml	2 M MgCl <sub>2</sub>
1	ml	2 M Glucose pro 100 ml H <sub>2</sub> O

### 3.3.4. Transfektion

Für die heterologe Proteinexpression in *Drosophila* S2 Zellen wurde das *Drosophila* Expressions System (DES™, Invitrogen) verwendet. Ungefähr  $3 \times 10^6$  S2 Zellen wurden für die Transfektion in 35 mm Platten in 3 ml S2-Medium bei 25°C inkubiert bis die Zelldichte  $2 - 4 \times 10^6$  Zellen/ml betrug. 19 µg des Expressionsvektors und 1 µg des Selektionsvektor in 300 µl einer 240 µM CaCl<sub>2</sub> Lösung wurden unter kontinuierlichem Mixen langsam zu 300 µl einer 2xHBS Lösung zugetropft. Die Mischung wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend der Zellsuspension langsam zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Calciumphosphat-Lösung entfernt, die adherenten Zellen 2x mit Medium gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Nach 2 Tagen erfolgte ein weiterer Mediumwechsel, die Zellen wurden nun in selektiven Medium (S2-Medium mit 300 µg Hygromycin/ml) aufgenommen. Zum Selektionieren der transfizierten Zellen wurde 4 Wochen lang alle 4 – 5 Tage das Medium gewechselt, erst danach wurde begonnen, die Zellen zu expandieren. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurden die Zellen immer mit 300 µg Hygromycin/ml inkubiert.

Zur Überprüfung der heterologen Proteinexpression wurden Zellen aus 3 ml Suspensionen geerntet, und das Zellpellet in 50 µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurden die unlöslichen Zellteile abzentrifugiert, das Lysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot das heterologe Protein detektiert.

S2 Lysepuffer	50	mM	Tris-HCl pH 7,4
	150	mM	NaCl
	2	mM	ATP
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	1	mM	DTT
	1	%	Nonident P-40

### 3.3.5. Punktmutation

Um das aktive Cystein von p37A gegen ein Serin auszutauschen, wurde mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eine Punktmutation durchgeführt. Die Sequenzänderung wurde im dsDNA Vektor durch eine PCR mit 2 zueinander

komplementären Primern, die den gewünschten Basenaustausch enthalten, durchgeführt. Der Einbau der Primer resultierte in einem mutiertem Plasmid mit versetzten Bruchstellen. Das DNA-Template wurde mit *DpnI*, einer Endonuklease (Zielsequenz: 5'-Gm6ATC-3'), die spezifisch methylierte DNA schneidet, verdaut. Dadurch blieb nur mutierte, zirkuläre dsDNA übrig, die in kompetente XL1-BLue *E. coli* Zellen transformiert wurde.

### **3.4. BIOCHEMISCHE METHODEN**

#### **3.4.1. Isolierung von 26S Proteasomen aus *D. melanogaster* Embryonen**

26S Proteasomen wurden ähnlich der von Udvardy (1993) beschriebenen Methode isoliert. Nach Auftauen des Embryonenextraktes, hergestellt aus ca. 30 g Eiern, wurde dieser für eine Stunde bei 40.000 Upm zentrifugiert (Beckman SW28 Rotor), um die unlöslichen Zellbestandteile abzutrennen. Anschließend wurde die DNA unter Rühren auf Eis mit 0,1 Volumen einer 10%igen Streptomycinsulfat Lösung in Homogenisierungspuffer gefällt und der Niederschlag für 10 min bei 20000 Upm (Sorvall SS34 Rotor) abzentrifugiert.

Als erster Reinigungsschritt wurde eine Hydroxyapatit Chromatographie im Batch-Modus durchgeführt; die Menge an eingesetztem Hydroxyapatit betrug 1 ml pro 30 mg Protein, üblicherweise ~30 ml. Bio-Gel HT Hydroxyapatit wurde mit Hydroxyapatitpuffer equilibriert und anschließend in einem Reagenzglasröhrchen mit dem Lysat für 30 min bei 4°C inkubiert. Nachdem sich das Gel abgesetzt hatte, wurde der Überstand durch Dekantieren entfernt und das Gel zweimal mit dem gleichen Volumen Puffer gewaschen. Zur Proteinelution wurde die Matrix 15 min mit 1 Volumen Hydroxyapatitpuffer mit 250 mM Kaliumphosphat, pH 6,7 inkubiert. Diese Elution wurde noch 2 mal wiederholt.

Die Elutionen wurden mit dem fluorogenen Peptid-Substrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC auf proteolytische Aktivität bzw. mittels Immunodot-Blots auf ihren Gehalt an RC Untereinheiten hin getestet. Elution 1 und 2 wurden vereinigt, über Nacht gegen Puffer A dialysiert und anschließend auf eine mit Puffer A equilibrierte DEAE-Zellulose Säule (Säulenvolumen: 20 ml, Durchmesser: 2 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min gründlich mit Puffer A gewaschen, bevor die Proteine mit 100 ml eines linearen NaCl Gradienten (80 – 400 mM in Puffer A) eluiert wurden. Die fraktionierten Proben (2,5 ml) wurden wieder mit Aktivitätstest und Immunodot-Blots auf ihren Gehalt an Proteasomen

untersucht. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt und mittels Macrosep™ Konzentratoren (Ausschlussgröße: 100 kD) so weit einkonzentriert, dass die Proteinkonzentration zwischen 5 und 10 mg/ml lag. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Saccharosedichtegradientenzentrifugation (15 – 40% Saccharose, Beckman SW28 Rotor, 28000 Upm, 20 h) durchgeführt. Der Gradient wurde ebenfalls fraktioniert (1 ml), und nach Aktivitätstest und Immunodot-Blot wurden die 26S Proteasomen enthaltenden Fraktionen entweder sofort für weitergehende Experimente verwendet oder aliquotiert bei –80°C aufbewahrt.

Hydroxyapatitpuffer	25	mM	Kaliumphosphat, pH 6,7
	oder 250	mM	Kaliumphosphat, pH 6,7
	5	%	Glyzerin
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	5	mM	β-Mercaptoethanol
	2	mM	ATP
Puffer A	20	mM	HEPES pH 7,6
	5	%	Glyzerin
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	5	mM	β-Mercaptoethanol
	2	mM	ATP
	80 oder 400	mM	NaCl
Puffer für Gradienten- Zentrifugation	20	mM	HEPES pH 7,6
	80	mM	NaCl
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
	5	mM	β-Mercaptoethanol
	2	mM	ATP
	15 oder 40	%	Saccharose

### 3.4.2. Isolierung von Histidininfusionsproteinen aus *E. coli*

Rekombinante Proteine wurden im *E. coli* Stamm BL21(DE3)RIL exprimiert (Studier et al., 1990). Die transformierten Bakterien wurden in 200 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) für 20 h bei 20°C angezogen. Diese Vorkultur wurde 1:10 in LB-Medium, dem 14 mM β-Mercaptoethanol zugesetzt war, überimpft und die Proteinexpression wurde sofort mit 0,2 mM IPTG für 16 h induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 g (Beckman JA10 Rotor) geerntet und im fünffachen Volumen an Lysepuffer resuspendiert. Nach Lyse der Zellen mit Lysozym (1 mg/ml, 30 min, auf Eis) und Ultraschall

(Sonifier W250, Branson, Stufe 6, 50% Intervalle, 10 min, auf Eis) wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt (20000 g, Beckman JA25.50 Rotor, 30 min). Das Lysat wurde für 2 h mit 2 ml Ni-NTA-Matrix, die mit Lysepuffer equilibriert war, bei 4°C gerührt und anschließend in eine Säule gepackt. Nicht gebundenes Material wurde mit Lysepuffer ausgewaschen, schwach bindende Proteine mit 20 mM Imidazol entfernt und die Histidin-fusionsproteine schließlich mit Imidazol (linearer Gradient 10 – 300 mM Imidazol in Lysepuffer; 50 ml) eluiert. p37A enthaltende Fraktionen wurden durch SDS-PAGE identifiziert, vereinigt und mittels Macrosep™ Konzentratoren (Ausschlussgröße: 10kD) auf 6 ml einkonzentriert.

<i>E.coli</i> Lysepuffer	50	mM	Natriumphosphat, pH 8,0
	300	mM	NaCl
	14	mM	β-Mercaptoethanol
	10	mM	Imidazol

### 3.4.3. Isolierung von FLAG-Fusionsproteinen aus S2 Zellen

Ca. 4 g transfizierte S2 Zellen wurden nach Auftauen in möglichst wenig S2 Lysepuffer + 20% Glycerin aufgenommen und 10 min bei 37°C inkubiert. Um einen vollständigen Aufschluss zu erreichen, wurden die Zellsuspension kurz sonifiziert (Sonifier W250, Branson, Stufe 4, 30% Intervalle, 3 x 30 sec mit je 30 sec Pause, auf Eis) und zur Abtrennung der Membranen wurde dann der Rohextrakt 1h bei 75000 g (Beckman JA 25.50) zentrifugiert. Mit dem so erhaltenen Lysat wurde eine ATP-Regeneration durchgeführt, indem es 1 h bei 30°C mit Phosphokreatin (20 mM) und Kreatinkinase (20 U/ml) inkubiert wurde. Zur Vorreinigung des Lysats (Volumen: ~8 ml) wurde nun eine Gelfiltration in Puffer C durchgeführt (Sephacrose 6B CL, Säulenvolumen: 600 ml, Ø: 3 cm, Fließrate: 0,6 ml/min). Nach Durchlaufen von 200 ml wurden Fraktionen zu 5 ml gesammelt und mittels Immunodot-Blot und Peptidaseaktivitätstest auf ihren Gehalt an 26S Untereinheiten, bzw. FLAG-Fusionsprotein getestet. Fraktionen, die Fusionsproteine enthielten, wurden vereinigt und über Nacht mit 1,5 ml, in Puffer C equilibrierten, Anti-FLAG® M2 Affinity Gel (Sigma) inkubiert bei 4°C in einem Überkopfmischer. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde das Gel in eine Säule gefüllt und ausgiebig mit Puffer C gespült (~30 ml Puffer, Fließrate: 1 ml/min). FLAG-markiertes Protein wurde anschließend mit 5 ml Puffer C + 100 µg/ml FLAG-Peptid eluiert, wobei Fraktionen zu 1 ml gesammelt wurden.

Puffer C	50	mM	Tris-HCl pH 7,4
	150	mM	NaCl
	2	mM	ATP

5	mM	MgCl <sub>2</sub>
1	mM	DTT

#### 3.4.4. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte routinemäßig nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Bio-Rad Protein-Assays. Als Eichstandard diente bei jeder Messung Rinderserumalbumin (BSA).

#### 3.4.5. Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Denaturierende SDS-PAGE (Lämmli, 1970)

Proteinlösungen wurden mit konzentriertem Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert.

Die Auftrennung erfolgte zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard in diskontinuierlichen Glycin-SDS-Polyacrylamid-Trenngelen (12,5%) mit 3%igen Sammelgelen bei konstanten 20 mA für 4 – 5h (Gelgröße: 12 x 10 x 0,05 cm)

Trenngel	12,5	%	Acrylamid (37,5:1)
	0,375	M	Tris-HCl pH 8.8
	0,1	%	SDS
	polymerisiert mit 0,05% APS und TEMED		

Sammelgel	3	%	Acrylamid (37,5:1)
	0,125	M	Tris-HCl pH 6.8
	0,1	%	SDS
	polymerisiert mit 0,05% APS und TEMED		

Laufpuffer	25	mM	Tris-base
	0,192	M	Glycin pH 8.3
	0,1	%	SDS

2 x Auftragspuffer	0,1	M	Tris-HCl pH 6.8
	20	%	Glyzerin
	4	%	SDS
	0,03	%	Bromphenolblau
	40	mM	DTT

## Native PAGE

Proteasomen wurden mittels einer nichtdenaturierenden Gelelektrophorese nach Hough et al. (1987) in ihrem nativen Zustand untersucht. Die Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt und ohne Erhitzen in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen aufgetrennt (50V, 16 h, 4°C).

Trenngel	4,6	%	Acrylamid (37,5:1)
	2,3	%	Saccharose
	90	mM	Tris-base
	80	mM	Borat
	0,08	mM	EDTA pH 8.3
	polymerisiert mit 0,05% APS und TEMED		
Sammelgel	3,1	%	Acrylamid (4:1)
	2,5	%	Saccharose
	90	mM	Tris-base
	80	mM	Borat
	0,08	mM	EDTA pH 8.3
	polymerisiert mit 0,05% APS und TEMED		
Laufpuffer	90	mM	Tris-base
	80	mM	Borat
	0,08	mM	EDTA pH 8.3
4 x Auftragspuffer	0,2	M	Tris-HCl pH 6.8
	20	%	Glyzerin
	0,03	%	Bromphenolblau

## Zweidimensionale (2D)-PAGE

Für 2D Gele wurden 50 µg gereinigter 20S oder 26S Proteasomen mit Nanosep™-Konzentratoren einkonzentriert und in 100 µl Auftragspuffer resuspendiert. Für die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung, wurden 18- oder 13-cm Immobiline® Dry Strips mit einem linearen pH Gradienten von 3 – 10 verwendet. Dazu mussten die getrockneten Streifen über Nacht in einer Gelkassette mit 20 ml Rehydratisierungslösung rekonstituiert werden. Zur Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension wurden die rehydratisierten Streifen in einer Multiphor II Elektrophoreseapparatur (Pharmacia) mit der basischen Spitze zur Kathode hin ausgerichtet und die Probe auf die anodische Seite der Streifen aufgetragen. Die isoelektrische Fokussierung begann für den Probeneintritt mit 500V für 5 Stunden, wurde dann linear in 5 Stunden auf 35000 Volt erhöht bis das Ende nach einer Gesamtlaufzeit von 66,5 kWh erreicht war. Nach der Fokussierung wurden die Gelstreifen 2 x 15 min mit Equilibrierungslösung gewaschen und danach auf das Sammelgel eines 12,5%igen SDS Gels

transferiert. Die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte wie für SDS Gele beschrieben.

Auftragspuffer	8	M	Harnstoff
	4	%	CHAPS
	40	mM	Tris-base
	0,03	%	Bromphenolblau
Rehydratisierungslösung	8	M	Harnstoff
	2	%	CHAPS
	10	mM	DTT
	2	%(v/v)	Resolyte <sup>®</sup> pH 3-10 (Merck)
	0,03	%	Bromphenolblau
Equilibrierungslösung	6	M	Harnstoff
	2	%	SDS
	1	%	DTT
	50	mM	Tris-HCl pH 6.8
	30	%	Glyzerin
	0,03	%	Bromphenolblau

### 3.4.6. Proteinfärbung

Kolloidale Coomassiefärbung (Neuhoff et al., 1988)

Die Nachweisgrenze dieser Methode, die routinemäßig zur Färbung von Polyacrylamidgelen angewendet wurde, liegt bei etwa 1 ng Protein/mm<sup>2</sup> Gel. Die Gele wurden 15 – 20 min in 12% TCA fixiert und anschließend über Nacht gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit deionisiertem H<sub>2</sub>O ausgewaschen, und die entfärbten Gele wurden zur Dokumentation getrocknet.

Färbelösung	80	ml	10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /2% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	20	ml	Methanol
	1	ml	5% Coomassie Blue G in H <sub>2</sub> O

### 3.4.7. Bestimmung enzymatischer Aktivität

Bestimmung der proteolytischen Aktivität mit fluorogenem Substrat

Zur Lokalisierung der Proteasomen während der Aufreinigungen wurden alle Fraktionen auf ihre proteolytische Aktivität getestet. Dazu wurden Aliquots zwischen 1 und 20 µl (abhängig



0,1	mg/ml	BSA
1	mM	DTT

### 3.4.8 Aminosäuresequenzanalyse

Die Aminosäuresequenzanalyse wurde von Dr. Josef Kellermann (Abteilung Proteinchemie, MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

Proteine wurden dazu über eindimensionale oder zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und zur N-terminalen Sequenzierung mittels Semi-Dry-Blot auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran transferiert. Proteine, deren N-terminus blockiert ist, mussten aus dem mit Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten werden, bevor sie zur Sequenzierung mit Endoproteinase Lys C (Boehringer) verdaut werden konnten.

## 3.5. IMMUNOLOGISCHE METHODEN

### 3.5.1 Proteintransfer auf Nitrozellulose

Auf denaturierenden oder nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine wurden mittels Tank-Blot oder Semi-Dry-Blot (Bio-Rad) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte beim Tank-Blot über Nacht mit einer Spannung von 17 V; beim Semi-Dry-Blot bei 15 V für 15 min. In beiden Fällen wurde derselbe Transferpuffer verwendet.

Transferpuffer	39	mM	Glycin
	48	mM	Tris-base
	0,037	%	SDS
	20	%	Methanol

Zur Verfolgung von Protein während einer Aufreinigung wurden als Schnelltest Immunodot-Blots durchgeführt. Dazu wurden die Proteinlösungen direkt auf die Membranen mit Hilfe einer Dot-Blot Vakuumapparatur aufgebracht.

### 3.5.2 Detektion mit alkalischer Phosphatase

Nach dem Elektro-Proteintransfer bzw. dem Immunodot Blot wurden die Membranen mit TBS-Puffer gewaschen und unspezifische Bindungsstellen 2 h mit Blocklösung abgesättigt.

Nach Spülen mit Waschpuffer (2 x 5 min) wurde mit dem 1. Antikörper in geeigneter Verdünnung in Blocklösung für 1 h inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen entfernt (4 x 5 min), bevor der 2. Antikörper (entweder Anti-Kaninchen-IgG oder Anti-Maus-IgG gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, 1:5000 in Blocklösung verdünnt) eine weitere Stunde inkubiert wurde. Die Membran wurde anschließend mit Substratlösung gespült (4 x 5 min) und Antikörper bindende Proteine durch die Zugabe von 60 µl NTB-Lösung und 33 µl BCIP-Lösung in 10 ml Substratlösung sichtbar gemacht. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von Stopplösung beendet.

TBS-Puffer	25	mM	Tris-HCl, pH 7,7
	150	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
Blocklösung	7	%	Milchpulver
	0,05	%	Triton-X 100
	0,05	%	NaN <sub>3</sub> in TBS-Puffer
Waschpuffer	0,05	%	Triton-X 100 in TBS-Puffer
Substratlösung	100	mM	Tris-HCl, pH 7,7
	100	mM	NaCl
	5	mM	MgCl <sub>2</sub>
NTB-Lösung	50	mg	4-Nitrotetrazolium-Chloridblau
	1	ml	70% Dimethylformamid
BCIP-Lösung	50	mg	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
	1	ml	100% Dimethylformamid
Stopplösung	137	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	10	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4
	1,8	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	20	mM	EDTA

## **3.6. CHEMISCHE METHODEN**

### **3.6.1 Herstellung des Ubiquitinaldehyd-kolloidalen Gold Konjugates**

An Gold gekoppeltes Ubiquitinaldehyd (Ub-Al) wurde von Ohad Medalia (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) synthetisiert. Kolloidale Goldpartikel (3,5 nm) wurden nach der Methode von Slot und Geuze (1985) mit kleinen Veränderungen hergestellt. 80 ml 0,012% NaAuCl<sub>4</sub> in Wasser und 20 ml 0,25%iges Tannin, 0,2% Natriumcitrat und 1 mM Kaliumcarbonat wurden auf 60°C erhitzt und rasch vermischt. Goldkolloide bildeten sich in Sekunden, und weitere Reinigungsschritte waren nicht nötig.

Thiolgruppen wurden durch Modifikation von Lysin Resten in Ub-Al eingeführt. 1,3 µg Ub-Al und 3 µg 2-Iminothiolan wurden in 20 µl 50 mM Triethanolamin, pH 7,3 für 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. 15 µl dieses so thiolierten Ub-Al wurden mit 100 µl kolloidaler Goldlösung vermischt, für 12 h bei 4°C inkubiert und 10 min bei 80000 g zentrifugiert (Airfuge; Beckman Coulter). Das weiche Pellet wurde in 15 µl Wasser resuspendiert.

## **3.7. ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND BILDVERARBEITUNG**

### **3.7.1 Rastertransmissions-Elektronenmikroskopie (STEM)**

STEM-Untersuchungen zur Ermittlung der molaren Masse von 26S und seinen Subkomplexen wurden wie von Engel et al. (1982) beschrieben von Dr. Shirley A. Müller (Maurice E. Müller Institut, Biozentrum, Universität Basel, Schweiz) durchgeführt. Dazu wurden gereinigte 26S Proteasomen (~150 µg/ml) 2 – 8 mal mit Puffer ohne Saccharose verdünnt bevor, entweder direkt oder nach Vernetzung mit 0,05% Glutaraldehyd, die Adsorption auf Kupfergrids erfolgte.

### **3.7.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)**

Die elektronenmikroskopischen Experimente wurden von Ute Sartarius und Günter Pfeifer (beide Abt. Baumeister, MPI für Biochemie, Martinsried) an einem Philips EM420 bei einer

Spannung von 80 kV mit 49000-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Proben wurden mit 1,5% Uranylacetat negativ kontrastiert.

Die Experimente mit goldgekoppelten Ub-A1 wurden von Dr. Barbara Kapelari (Abt. Baumeister, MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Dazu wurden 2 µl gereinigte 26S Proteasomen (0,2 mg/ml) mit 1 µl Gold-Ub-A1 und 2 µl 20 mM Tris-HCl, pH 7,2, für 7 min inkubiert und anschließend auf 100 x 400 Maschen Kupergrids aufgetragen, welche vorher mit einem Kohlefilm überzogen und in einem Plasmacleaner glimmentladen worden waren. Die Proteasomen wurden mit 2%igem Uranylacetat negativ kontrastiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden digital (Photometix slow scan CCD; 1024 x 1024 pixels) bei einer Vergrößerung von 45700 unter Verwendung eines CM12 Transmissionselektronenmikroskop (Philips) mit einer Spannung von 145 kV aufgenommen. Die Bilder wurden auf eine SGI-Workstation übertragen und mit dem „EM software package“ (Hegerl, 1996) analysiert.

### **3.8. COMPUTERANALYSEN**

Analysen der Nukleinsäure- und Proteinsequenzen erfolgten mit GENETYX-MAC 8.0 (Software Development Co., LTD; Thompson et al., 1997). Mit den Peptidsequenzen aus der Aminosäuresequenzanalyse wurden in den Datenbanken des Berkeley *Drosophila* Genom Projektes (<http://www.fruitfly.org>) mittels Blastp (Altschul et al., 1990) nach homologen Proteinen bzw. EST cDNA Klonen gesucht. Nach Veröffentlichung der vollständigen Sequenz des *Drosophila* Genoms (Adams et al., 2000) wurden alle relevanten Gene in der FlyBase Datenbank (<http://flybase.bio.indiana.edu>) gefunden. Die Suche nach homologen Sequenzen in anderen Organismen erfolgte mittels Ψ-BLAST (Altschul et al. 1997) am NCBI (National Center for Bioinformatics; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Proteindomänen wurden mit Hilfe der „Pfam protein families“ Datenbank (Bateman et al., 2000; <http://www.sanger.ac.uk/Pfam>) bestimmt. Multiple Alignierungen wurden unter Verwendung des Programmes ClustalX (Thompson et al., 1997) erstellt. Coiled-coils wurden mit dem Programm MacStripe 2.01b (<http://www.york.ac.uk/depts/biol/units/coils/coilcoil.html>), welches auf dem Algorithmus von Lupas et al. (1991) basiert, vorausgesagt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON 26S PROTEASOMEN AUS

#### *D. MELANOGASTER* EMBRYONEN

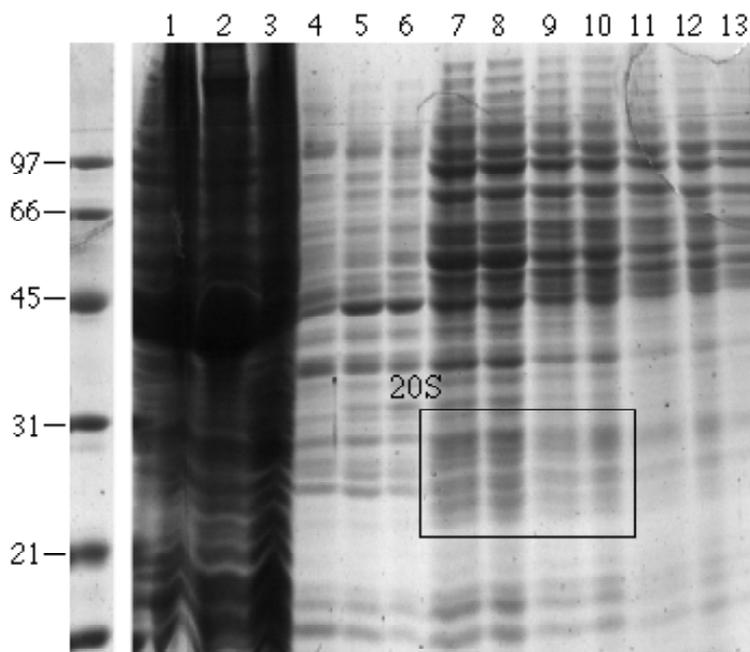
Schon in den Arbeiten von Udvardy (1993) und Walz et al. (1998) wurden *Drosophila* Embryonen zur Isolierung von 26S Proteasomen verwendet. Trotz der relativ aufwendigen Anzucht einer ausreichenden Menge an Embryonen, wurde ein ähnliches Protokoll auch in dieser Arbeit angewandt. Aufgrund ihres hohen Gehaltes an Proteasomen sind Embryonen den anderen Stadien der *Drosophila* Entwicklung (Larven, Puppen, Fliegen) vorzuziehen. Ein Versuch, Proteasomen aus Larven zu isolieren, wurde wegen geringer Ausbeute abgebrochen, ebenso erwies sich die Proteasomenkonzentration in *Drosophila* S2 Zellen als zu niedrig. Aus einem Käfig mit ca. 50000 – 100000 Fliegen konnten bis zu 100 g Embryonen geerntet werden, deren Extrakt nach Aufschluss in Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Für eine Reinigung von 26S Proteasomen wurden zwischen 10 und 20 g Embryonen verwendet. Nach Ultrazentrifugation und DNA-Fällung mit Streptomycinsulfat wurden die Proteasomen mittels einer Hydroxyapatitchromatographie in einem ersten Reinigungsschritt angereichert. Normalerweise wurde diese Chromatographie im Batch-Verfahren durchgeführt, und das Hydroxyapatit wurde nach 2 Waschrissen bis zu 4 mal eluiert, um sicherzustellen, dass keine Proteasomen gebunden blieben. Zusätzlich zu SDS-PAGE (Abb. 7) wurde die Anreicherung an Proteasomen auch über die Bestimmung der Peptidaseaktivität des 20S Proteasoms verfolgt (Tab. 2).

Die aktiven Elutionen wurden vereinigt, und nach Dialyse wurden die Proteasomen mittels Ionenaustauscherchromatographie (DEAE-Zellulose) weiter angereichert. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem kontinuierlichen NaCl-Gradienten (80 – 400 mM NaCl), wobei Proteasomen ungefähr zwischen einer Salzkonzentration von 150 – 200 mM Salz eluieren (Abb. 9). Auch hier wurden die 20S enthaltenden Fraktionen über die Peptidaseaktivität bestimmt (Abb. 8) und mittels Immunodot-Blots gezeigt, dass die Untereinheiten des RC in den gleichen Fraktionen wie das 20S Proteasom eluieren (Abb. 10).

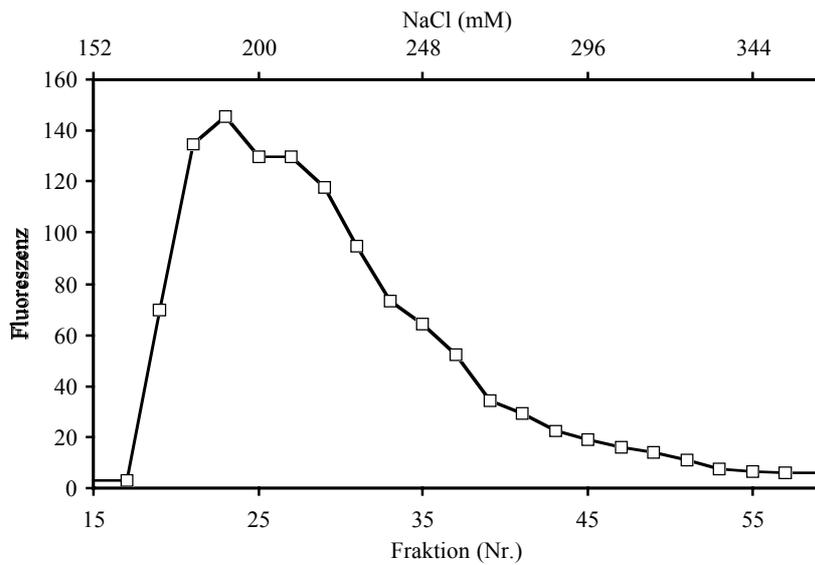
**Tab. 2: Peptidaseaktivität der Hydroxyapatitfraktionen**

Fraktion	Aktivität*	Fraktion	Aktivität*
Lysat nach Homogenisierung	185,3	Waschschrift 1	1,9
Lysat nach Ultrazentrifugation	136,6	Waschschrift 2	1,9
Lysat nach DNA-Fällung	132,5	Elution 1	40,6
Hydroxyapatit-Überstand	3,1	Elution 2	128,9
		Elution 3	102,3
		Elution 4	5,8

\*Die Werte beziehen sich auf die gemessene Fluoreszenz (Substrat: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC). Auf die Berechnung einer spezifischen Aktivität wurde verzichtet, da die Messungen nur zur Bewertung der Reinigungsschritte dienen.

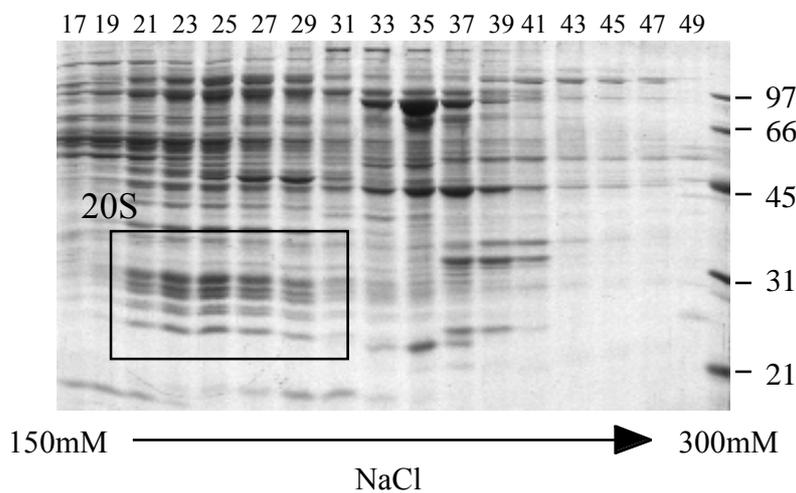
**Abb. 7: SDS-PAGE der Hydroxyapatit-Fractionen**

Jeweils 20 µl der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12,5% SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und mit Coomassie blue gefärbt. (1) Lysat nach Ultrazentrifugation. (2) Lysat nach DNA-Fällung mit Streptomycinsulfat. (3) Pellet nach Ultrazentrifugation. (4) Hydroxyapatit-Überstand. (5) Waschschrift 1. (6) Waschschrift 2. (7) Elution 1. (8) Elution 1 nach Dialyse gegen Puffer A. (9) Elution 2. (10) Elution 2 nach Dialyse gegen Puffer A. (11) Elution 3. (12) Elution 3 nach Dialyse gegen Puffer A. (13) Elution 4. In den Elutionen 1 und 2 ist das typische 20S Bandenmuster erkennbar.



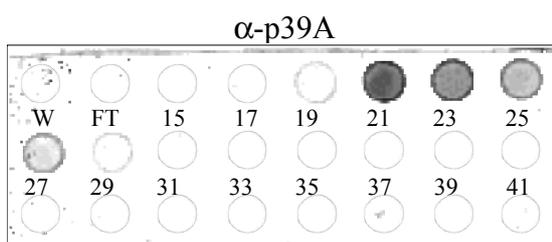
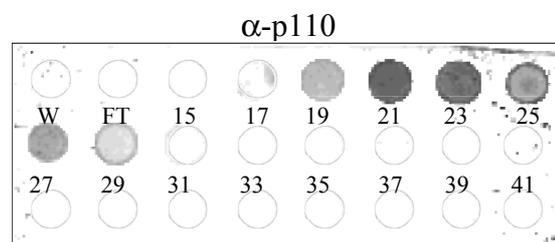
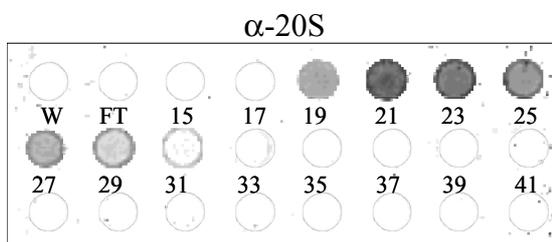
**Abb. 8: Peptidaseaktivität der DEAE-Fractionen**

Jeweils 5  $\mu$ l der Fractionen wurden für 30 min bei 37°C mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (100  $\mu$ M) inkubiert und anschließend die Fluoreszenz gemessen ( $\lambda_{ex}$  = 360 nm,  $\lambda_{em}$  = 460 nm).



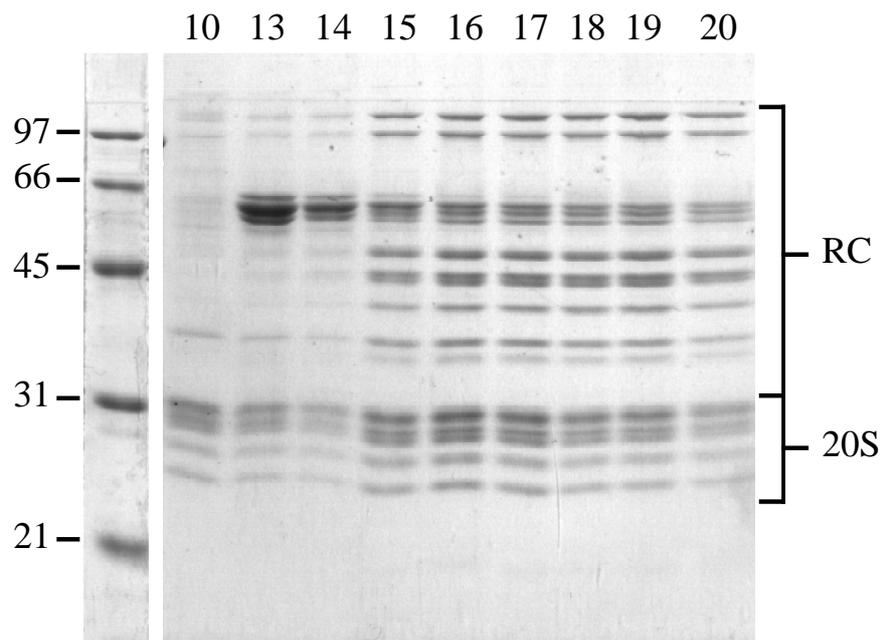
**Abb. 9: SDS-PAGE der DEAE-Fractionen**

Jede zweite DEAE-Fraktion wurde mittels eines 12,5% SDS-Polyacrylamid Gels analysiert. Nur solche Fractionen sind gezeigt, die auch proteolytische Aktivität besitzen (siehe Abb. 8).



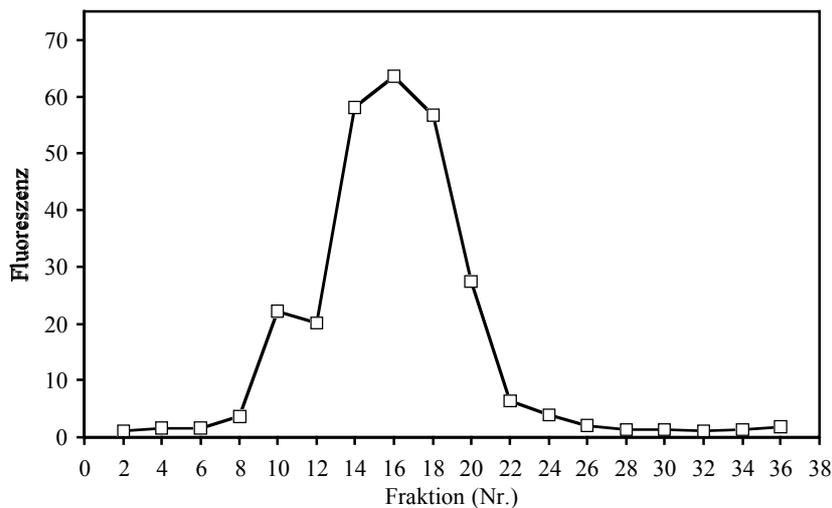
**Abb. 10: Immunodot-Blot der DEAE-Fractionen**  
Jeweils 20  $\mu$ l der DEAE-Fractionen bzw. des Durchflusses (FT) und des Waschschrittes (W) wurden in Immunodot Blots auf Ihren Gehalt an Untereinheiten des RC ( $\alpha$ -p39A und  $\alpha$ -p110) und 20S Proteasoms ( $\alpha$ -20S) getestet.

Der letzte Schritt der Proteasomen Reinigung, die Saccharosedichtegradientenzentrifugation, ergab 2 Maxima der Peptidaseaktivität (Abb. 11). Die aktiven Fraktionen wurden mit SDS-PAGE (Abb. 12) und nativer PAGE weiter untersucht (Abb. 14). Fraktion 10, mit einem Gehalt von ~22% Saccharose, war die Hauptfraktion der ersten Aktivitätsspitze und enthielt gereinigte 20S Proteasomen. Die zweite, viel breitere Aktivitätsspitze begann mit Fraktion 13 und reichte bis Fraktion 20. Diese Fraktionen zeigten in SDS Gelen das für 26S charakteristische Bandenmuster, wobei die frühen Fraktionen (13 – 15) mit einem hochmolekularen Proteinkomplex verunreinigt waren, welcher in elektronenmikroskopischen Aufnahmen an GroEL erinnert. Die Fraktionen 16 – 20, entsprechend einem Gehalt an Saccharose von ~26 – 28%, enthielten 26S Proteasomen, deren Reinheit und Homogenität durch Elektronenmikroskopie bestätigt werden konnte (Abb. 13).



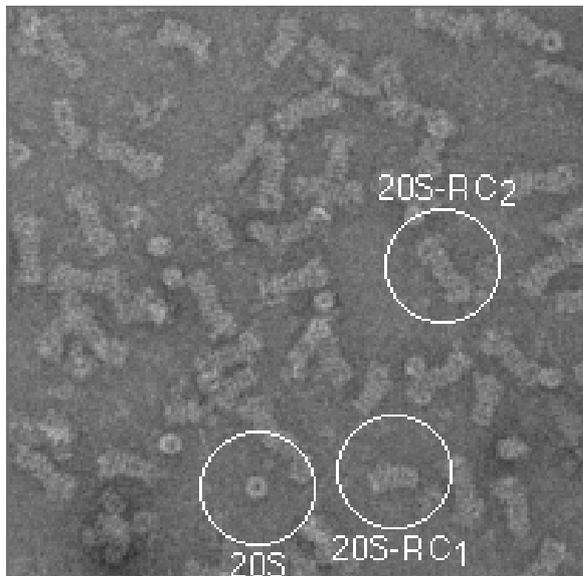
**Abb. 12: SDS-PAGE von gereinigten 26S Proteasomen**

Fraktionen 10 und 13 – 20 des Saccharosedichtegradienten wurden in einem 12,5% SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie blue gefärbt. Fraktion 10 enthielt reine 20S Proteasomen. Fraktionen 13 – 15 waren mit einem anderen Proteinkomplex verunreinigt, während die Fraktionen 16 – 20 das für 26S Proteasomen typische Bandenmuster zeigen.



**Abb. 11: Peptidaseaktivität der Fraktionen des Saccharosedichtgradienten**

Jeweils 2  $\mu$ l der Fraktionen wurden für 30 min bei 37°C mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (100  $\mu$ M) inkubiert und anschließend die Fluoreszenz gemessen ( $\lambda_{ex}$  = 360 nm,  $\lambda_{em}$  = 460 nm).



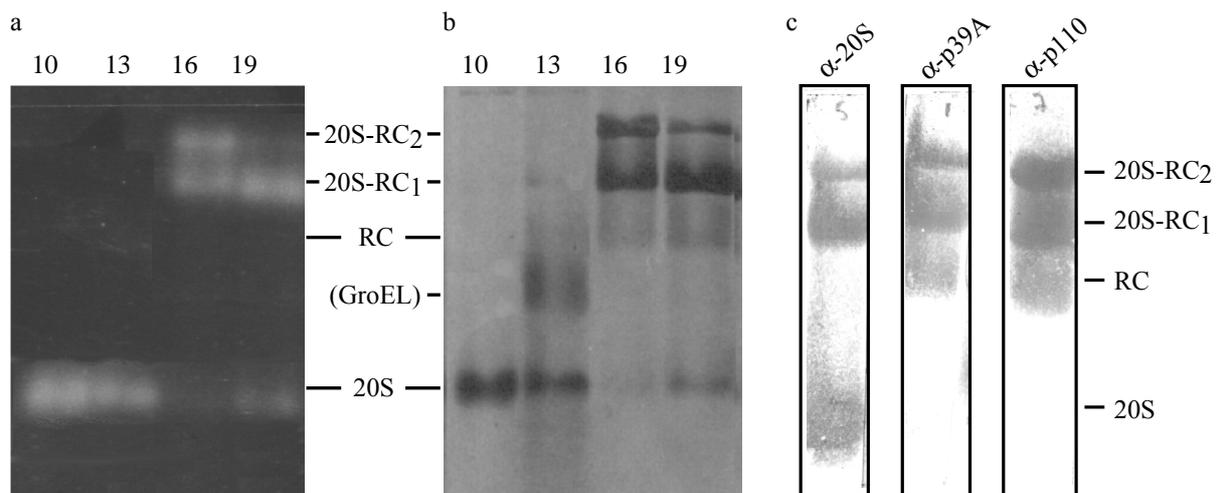
**Abb. 13: 26S Proteasomen aus *Drosophila***

Elektronenmikroskopische Aufnahme von gereinigten 26S Proteasomen aus *Drosophila melanogaster* nach negativ Kontrastierung mit Uranylacetat (2% w/v). Zu erkennen sind die beiden Formen der 26S Proteasomen, 20S-RC<sub>2</sub> und 20S-RC<sub>1</sub>, sowie ringförmige 20S Proteasomen in Aufsicht.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von 26S Proteasomen ergab 3 Partikelarten: 26S Proteasomen mit 2 RC (20S-RC<sub>2</sub>), 26S Proteasomen mit 1 RC (20S-RC<sub>1</sub>) und 20S Proteasomen; freie RC wurden nicht gefunden (Abb. 13). Die Koexistenz von 2 verschiedenen 26S Arten ist aus anderen elektronenmikroskopischen Untersuchungen von 26S Präparationen bekannt (Peters et al., 1993; Fujinami et al., 1994; Walz et al., 1998). Es ist bis jetzt noch nicht geklärt, ob 20S-RC<sub>2</sub> und 20S-RC<sub>1</sub> in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegen, oder ob erst beim Fixieren für das EM der 20S-RC<sub>2</sub> Komplex zerfällt. Dasselbe Resultat ergab die native PAGE: Auch hier wurden

mehrere hochmolekulare Komplexe identifiziert. 26S Proteasomen trennen sich bei einer nichtdenaturierenden Gelelektrophorese in 4 Banden auf (Abb. 14), diese Auftrennung glich jener, die auch bei Säugetier und Bäckerhefe Proteasomen beobachtet wurde (Hoffman et al., 1992; Glickman et al., 1998a). Eine Inkubation des nativen Gels mit dem fluorogenen Peptidsubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC zeigte, neben dem 20S Proteasom, 2 weitere aktive Banden (Abb. 14), die bei Hefe-Proteasomen als 20S-RC<sub>2</sub> und 20S-RC<sub>1</sub> identifiziert

wurden (Glickman et al., 1998a). Die Proteinkomplexe in Fraktion 19 wurden vom nativen Gel auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit mehreren monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche Untereinheiten des RC und 20S Proteasoms inkubiert. Abbildung 14 zeigt als Beispiel den Nachweis mit 2 anti-RC Antikörpern ( $\alpha$ -p39A und  $\alpha$ -p110) und einen anti-20S Antikörper ( $\alpha$ -20S). Diese Resultate führten zur Identifizierung der 4 aufgetrennten Komplexe von oben nach unten als: 20S-RC<sub>2</sub>, 20S-RC<sub>1</sub>, RC und 20S Proteasom.



**Abb. 14: native PAGE von 26S Proteasomen**

Die Fraktionen 10, 13, 16 und 19 des Saccharosedichtegradienten wurden für 800 Vh in 4,5% nativen Polyacrylamid Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden (a) mit fluorogenem Peptidsubstrat inkubiert und anschließend (b) mit Coomassie blue gefärbt. Um die Banden weiter zu charakterisieren, wurden mit Aliquots der Fraktion 19 Western Blots mit mAb gegen Untereinheiten des 26S Proteasoms durchgeführt. Dadurch war es möglich die Banden eindeutig als 20S Proteasomen, RC, 26S Proteasomen mit nur einem RC (20S-RC<sub>1</sub>) und 26S Proteasomen mit 2 RC (20S-RC<sub>2</sub>) zu identifizieren.

Es konnte gezeigt werden, dass *Drosophila* Embryonen als Quelle für 26S Proteasomen anderen Organismen überlegen sind; die Präparationen überzeugten vor allem durch strukturelle Homogenität, Stabilität und Ausbeute (Tab. 3). Um intakte 26S Proteasomen zu reinigen, ist es notwendig, in allen Reinigungsschritten ATP (2 mM) zuzugeben. Ohne ATP zerfallen 26S Proteasomen in 20S Proteasomen und wahrscheinlich in RC oder die beiden RC Subkomplexe „lid“ und „base“. Dies wurde auch zur Isolierung von RC ausgenutzt. Aber, anders als von Udvardy (1993) beschrieben, war es nicht möglich Regulatorische Komplexe in derselben Qualität wie 26S Proteasomen zu präparieren. Nach dem verwendeten Protokoll waren RC Präparationen noch deutlich verunreinigt und erwiesen sich aufgrund ihrer strukturellen Inhomogenität für elektronenmikroskopische Untersuchungen als nahezu unbrauchbar. Ebenso war es nicht möglich, isolierte 26S Proteasomen durch Dialyse gegen

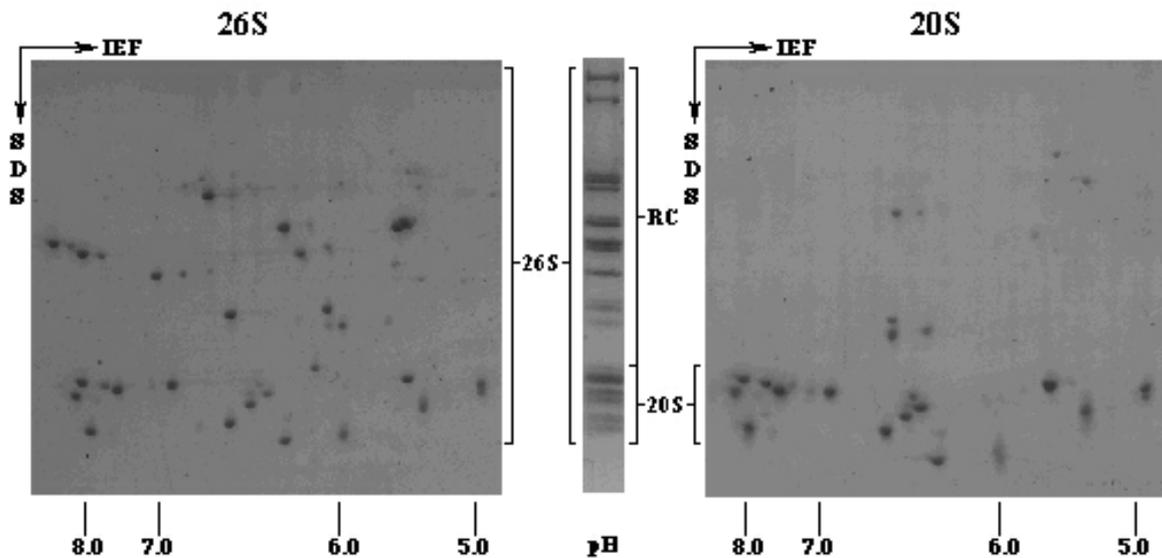
Puffer ohne ATP bzw. gegen Hochsalzpuffer in Subkomplexe zu zerlegen, wie es für das Bäckerhefe Proteasom gezeigt werden konnte (Glickman et al., 1998b).

**Tab. 3: 26S Proteasomen Reinigung aus *Drosophila* Embryonen**

Fraktion	Volumen	Proteinkonzentration	Gesamtprotein
	<i>ml</i>	<i>mg/ml</i>	<i>mg</i>
Lysat	35	7	246
Hydroxyapatit	64	0,5	32
DEAE-Zellulose	36	0,5	18
Zentrifugation	10	0,4	3,8

#### 4.2. IDENTIFIZIERUNG DER UNTEREINHEITEN DES REGULATORISCHEN KOMPLEXES

Wie aus Abbildung 12 ersichtlich, trennen sich *Drosophila* 26S Proteasomen zusätzlich zu den Banden, die vom 20S Proteasom stammen, auf eindimensionalen SDS Gelen in 12 definierte Banden. Diese 12 Banden wurden nach ihren aus der Laufstrecke ermittelten Massen p110 bis p37B benannt (Haracska und Udvardy, 1996). Zur vollständigen Auftrennung der Proteine wurden 2D Gele angefertigt. Abbildung 15 zeigt typische 2D Elektrophorese Muster von 26S und 20S Proteasomen, welche bei der Verwendung eines nichtlinearen pH Gradienten (18-cm Immobiline<sup>®</sup> Dry Strips, pH Gradient von 3 – 10) zustande kamen. Bis auf einen zusätzlichen Spot konnten alle Proteine des 26S Proteasoms, die im Größenbereich von 20 – 30 kD fokussierten, eindeutig durch Vergleich mit dem 20S 2D Gel als 20S Untereinheiten bestimmt werden. Zur Identifizierung der RC Untereinheiten mittels Aminosäuresequenzierung wurden daher nur Spots, die in einem Größenbereich über 30 kD fokussierten, herangezogen. Für die Sequenzierung mussten mehrere Gele verwendet werden, und dabei erwiesen sich die nichtlinearen pH Gradienten der Strips als nur beschränkt brauchbar, da sie nur sehr schwer exakt reproduzierbar waren. Aus diesem Grund wurden zur Sequenzierung 13-cm Immobiline<sup>®</sup> Dry Strips mit einem linearen pH Gradienten von 3 – 10 verwendet, bei denen die Reproduzierbarkeit kein so großes Problem darstellte (Abb. 16).

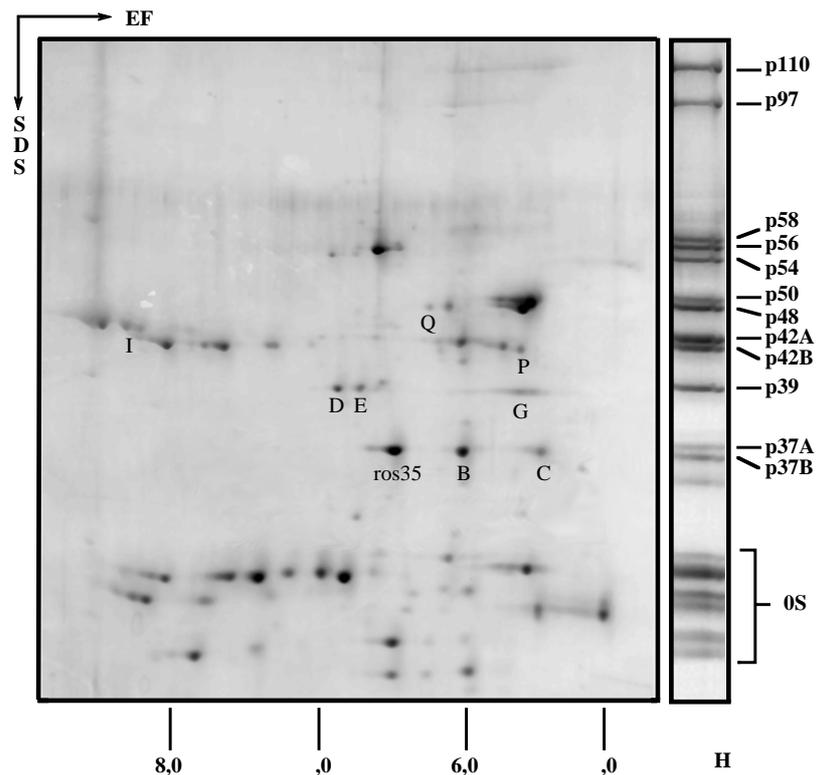


**Abb. 15: 2 D Gelelektrophorese von *Drosophila* 26S und 20S Proteasomen**

Gereinigte 26S bzw. 20S Proteasomen wurden in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung (IEF) mit einem nichtlinearen pH Gradienten von 3 – 10 aufgetrennt. Für die zweite Dimension wurden 12,5%ige SDS Gele verwendet. Die Proteine wurden mit Coomassie blue gefärbt.

Die Untereinheiten des RC ergaben mehr als 20 deutlich erkennbare Spots mit pIs zwischen 4,5 und 8,5. Da für die 3 größten Untereinheiten, p110, p97 und p58, keine eindeutigen Spots detektiert werden konnten, wurden diese Proteine aus eindimensionalen SDS Gelen sequenziert und konnten damit eindeutig identifiziert werden. p97 und p58 konnten N-terminal sequenziert werden, hingegen war der Aminoterminus von p110 blockiert und musste vor der Sequenzierung im Gel mit Endoproteinase Lys C verdaut werden. Von den Proteinspots des 2D Gels waren nur die Aminotermini der Spots D, E, und F für eine Sequenzierung zugänglich, alle übrigen Spots waren aufgrund von posttranslationalen Modifikationen blockiert. Spot U wurde nicht durch Sequenzierung, sondern mittels Western-Blot mit einem monoklonalen Antikörper eindeutig als p54 identifiziert.

Mit den erhaltenen Peptidsequenzen wurde eine Blastp Suche im *Drosophila* Genom (Berkeley *Drosophila* genome project) durchgeführt, wobei für jede Sequenzen eine vollkommen übereinstimmende DNA-Sequenz gefunden werden konnte (Tab. 4). Dabei stellte sich heraus, dass nur ein Spot im Molekulargewichtsbereich über 30000 keine RC Untereinheit war. Dieses Protein wurde als Pros35, eine  $\alpha$  Untereinheit des 20S Proteasoms, identifiziert.



**Abb. 16: 2D Gelelektrophorese von 26S Proteasomen mit einem linearen pH Gradienten**

Für die Aminosäuresequenzierung wurden 2D Gele mit einem linearen pH Gradienten von 3 – 10 angefertigt. 26S Proteasomen, die mit SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, dienten als Molekulargewichtsstandard. Alle mit einem Großbuchstaben markierten Spots wurden durch Sequenzierung identifiziert, ausgenommen Spot L, dessen Sequenzierung kein Ergebnis lieferte, und Spot U, der durch Western-Blot identifiziert wurde. Pros35 war das einzige zu 20S gehörende Protein, das sequenziert wurde.

Da die beiden Spots O und P, die im 42 kD Größenbereich auftraten, nicht auf allen 2D Gelen detektiert werden konnten und daher eine Sequenzierung nicht möglich war, wurden die beiden 42 kD großen Banden auf eindimensionalen SDS Gelen ebenfalls einem Verdau und einer Sequenzierung unterworfen. Zuzüglich zu den bereits auf 2D Gelen gefundenen 3 42 kD Proteinen wurde eine weitere Peptidsequenz (YLIEEG) erhalten, die ebenfalls einem *Drosophila* Protein, einem Homologen der Hefe RC Untereinheit Rpn7, zugeordnet werden konnte. Es kann daher angenommen werden, dass einer oder beide Spots p42A entsprechen. Weiters war es auch unmöglich, Sequenzinformation für Spot L zu erhalten, der eine sehr geringe Farbintensität auf den Coomassie blue gefärbten Gelen aufwies. Für mehrere Untereinheiten wurde ein Duplet (z.B. V und W) oder Triplet (z.B. D, E und F) an Spots gefunden. Diese Unterschiede im Laufverhalten bei der isoelektrischen Fokussierung stammen vermutlich von posttranslationalen Modifikationen, wie etwa Phosphorylierungen. Daher kann angenommen werden, dass Spot L zum selben Protein wie J und K gehört.

Aufgrund dieser teilweise nicht eindeutigen Ergebnisse wurde in Kollaboration mit Mate Sümegi und Andor Udvardy (Institut für Biochemie, Ungarische Akademie der

Wissenschaften, Szeged, Ungarn) ein weiteres Gelsystem verwendet. Bei der 16-BAC/SDS-PAGE 2D Gelelektrophorese (Hartinger et al., 1996) konnten alle Spots im 42 kD Bereich sequenziert werden, wobei keine zusätzlichen Proteine gefunden wurden. Ein zusätzlicher Spot im Größenbereich von 55 kD konnte durch Sequenzierung als *Drosophila* Homolog von Rpn5 identifiziert werden.

Insgesamt wurden 18 verschiedene RC Untereinheiten gefunden (Tab. 4). 5 Proteine waren bereits früher beschrieben worden, mit den Peptidsequenzen der restlichen Untereinheiten wurde jeweils zumindest ein zugehöriger EST cDNA Klon (Rubin et al., 2000) gefunden. In den Fällen, in denen mehrere Klone gefunden wurden, wurde jener mit der längsten cDNA Sequenz ausgewählt. Die EST cDNA Klone wurden in beiden Richtungen vollständig sequenziert und die so erhaltenen DNA- bzw. Proteinsequenzen wurden bei Genbank/EMBL/DDBJ eingereicht (Tab. 5). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es neben diesen 18 Proteinen noch weitere RC Untereinheiten gibt, die entweder in den verwendeten 2D Gelsystemen nicht fokussieren oder im Größenbereich unter 30 kD liegen und daher übersehen wurden. Aus dem Vergleich der Untereinheiten mit denen aus anderen Organismen bzw. den STEM Massenbestimmungen kann aber doch angenommen werden, dass die *Drosophila* RC Untereinheiten vollständig detektiert wurden.

Tab. 4: Identifizierung der *Drosophila* RC Untereinheiten

Spot*	Peptidsequenz ‡	EST cDNA Klon ID §	GenBank §	Protein
—	VATAVLSIAARQK	LD11427		p110
—	TGETKLEKKPLL	LD05942		p97
—	TNATDIGANDVE	}	M63010	p58 (Dox-A2)
W	APQETYADIGGLD			
V	GVILYGPPGTGK		U39303	p56 (S4)
—	TGLTPVDSAA	LD07018		p55
U ¶			S79502	p54 (S5a)
T	SEVIRITHEIQAQNEK	LD22987		p50
S	EFIEVQEEYIK	}	GM02119	p48A
R	FVVELADSVAP			
Q	QVNETGI	LD17074		p48B
O**	YLIEEGG	}	GH10329	p42A
P**				
N	EQGILQQGELQK	}	LD20236	p42B
M	XXVNREEQD			
H	VPDSTYEMYGGLDK	}	U97538	p42C (DUG)
I	IEELQLVVAEK			
J	SLQSVGQIVGEVL			
K	HGEIDYEAIVK	LD04678		p42D
G	AIERISF	LD17530		p39A
D	PSQEVSVNK	}	M64643	p39B (mov34)
E				
F				
C	FCQC FDPYNK	LD02040		p37A
B	MTPEQCAIK	CK01641		p37B
A	IFQAK	LD13866		p30

\* Die Proteine wurden mit 2D Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abb. 16). Die drei größten Untereinheiten (p110, p97 und p58) wurden in einem eindimensionalen SDS-Polyacrylamid Gel identifiziert; p55 wurde aus einem 16-BAC/SDS Gel sequenziert.

‡ Die Peptidsequenzen wurden entweder durch aminoternale oder interne Aminosäuresequenzierung bestimmt. X steht für Reste, deren Identifizierung nicht möglich war. Bei allen Peptiden wurde für die identifizierbaren Reste eine vollständige Übereinstimmung mit den homologen Sequenzen des *Drosophila* Genoms gefunden.

§ Die Homologien wurden über eine Blastp Suche im *Drosophila* Genom (Berkeley *Drosophila* genome project) ermittelt.

|| Proteine wurden nach ihrer in eindimensionalen SDS Gelen ermittelten Masse benannt (Haracska und Udvardy, 1996). Fünf Gene, die RC Untereinheiten kodieren, wurden bereits früher beschrieben, ihre ursprünglichen Namen sind in Klammern angeführt

¶ Spot U wurde nicht durch Sequenzierung sondern durch Western Blot identifiziert.

\*\* Die Spots O und P konnten nicht auf allen 2D Gelen detektiert werden, und es war nicht möglich eine Peptidsequenz zu bestimmen. Ein Verdau der Proteinbanden in eindimensionalen SDS Gelen im Größenbereich von 42 kD ergab eine zusätzliche Peptidsequenz, die einem *Drosophila* EST cDNA Klon zugeordnet werden konnte. Es wird angenommen, dass ein oder beide Spots p42A entsprechen.

### 4.3. DIE UNTEREINHEITEN DES REGULATORISCHEN KOMPLEXES

Mit den *Drosophila* RC Untereinheiten wurde eine  $\Psi$ -Blast Suche ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-psi\\_blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-psi_blast)) nach homologen Proteinen durchgeführt. Aufgrund der hohen Anzahl an gefundenen Homologen, beschränkt sich Tabelle 5 auf eine Auflistung der RC Untereinheiten aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens*. Bis auf die erstmals beschriebene Untereinheit p37A haben alle *Drosophila* Untereinheiten Homologe sowohl in Hefe als auch im Menschen. Diese Untereinheiten wurden in allen bis jetzt untersuchten Eukaryonten bzw. vollständig bekannten eukaryontischen Genomen gefunden.

**Tab. 5: Die Untereinheiten des *Drosophila* RC**

<i>D. melanogaster</i> RC Untereinheiten					Homologe			
Name	Genbank *	AA	MW <sup>‡</sup>	pI <sup>‡</sup>	Hefe <sup>§</sup>	Identität <sup>  </sup> (%)	Mensch <sup>¶</sup>	Identität <sup>  </sup> (%)
p110	AF145303	1020	113.2	4.93	Rpn2	38 (1-858)	S1	64 (3-859)
p97	AF145304	919	102.3	5.48	Rpn1	36 (65-615)	S2	58 (65-917)
p58	M63010	494	56.0	9.04	Rpn3	32 (12-458)	S3	58 (8-494)
p56	U39303	439	49.3	6.17	Rpt2	72 (24-439)	S4	88 (1-439)
p55	AF145315	502	57.7	5.49	Rpn5	38 (8-442)	p55	47 (11-455)
p54	S79502	396	42.6	4.70	Rpn10	41 (1-225)	S5a	52 (1-381)
p50	AF145305	428	47.8	5.20	Rpt5	68 (14-428)	S6'	84 (9-428)
p48A	AF145306	412	46.9	5.22	Rpt3	69 (34-413)	S6	84 (12-413)
p48B	AF145307	433	48.5	5.75	Rpt1	64 (5-433)	S7	85 (1-433)
p42A	AF145308	389	45.4	6.06	Rpn7	37 (15-389)	S10	70 (1-389)
p42B	AF145309	422	47.3	5.66	Rpn6	42 (1-421)	S9	64 (2-422)
p42C	U97538	405	45.8	8.51	Rpt6	71 (18-405)	S8	86 (6-405)
p42D	AF145310	390	44.2	8.44	Rpt4	70 (8-388)	S10b	86 (6-390)
P39A	AF145311	382	43.8	5.18	Rpn9	30 (8-379)	S11	42 (15-381)
p39B	M64643	338	38.5	8.90	Rpn8	44 (10-290)	S12	71 (5-290)
p37A	AF145312	324	37.7	5.12			UCH37	59 (1-324)
p37B	AF145313	308	34.4	5.74	Rpn11	64 (1-308)	S13	88 (1-308)
p30	AF145314	264	30.2	5.80	Rpn12	25 (25-264)	S14	45 (7-264)

\* Genbank Identifikationsnummer.

‡ Die Molekularmasse (kD) und der pI wurden unter Verwendung von GENETYX-MAC 8.0 berechnet

§ Vereinheitlichte Nomenklatur für die Hefe Untereinheiten (Finley et al., 1998).

|| Identitäten wurden mittels  $\Psi$ -Blast ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-psi\\_blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-psi_blast)) unter Verwendung von Standardparametern ermittelt. Der erste und der letzte Aminosäurerest der alignierbaren Abschnitte ist in Klammern angeführt.

¶ Ausgenommen p55 und UCH37, wurden die *H. sapiens* RC Untereinheiten nach der von Dubiel et al. (1995) vorgeschlagenen Nomenklatur benannt.

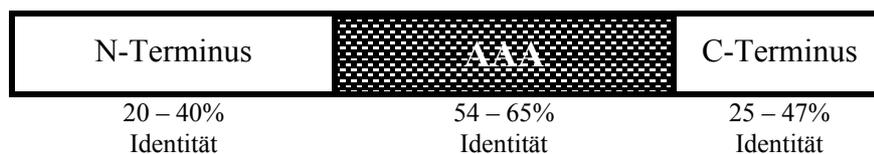
### 4.3.1. Die Untereinheiten des „base“-Komplexes

p110 und p97

Die beiden größten Untereinheiten des RC zeigen auch in *Drosophila* signifikante Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz, und mit einer  $\Psi$ -Blast Suche (StandardEinstellungen) im *Drosophila* Genom wird als einziges Homolog die jeweils andere Untereinheit gefunden. Abgesehen von der homologen Region, die jeweils in der Mitte des Proteins liegt, weisen die beiden Proteine noch eine weitere Gemeinsamkeit auf. Sie enthalten KEKE Motive (Domänen, die reich an alternierenden Lysin (K) und Glutamat (E) Resten (Realini, 1994) sind) in ihren C-terminalen Regionen.

Die ATPasen

Die 6 ATPasen der AAA Familie (Confalonieri und Duguet, 1995, Beyer, 1997) des *Drosophila* RC weisen, ähnlich ihren Hefehomologen (Glickman et al. 1998a), eine sehr hohe Identität ihrer Sequenzen zueinander auf (Abb. 17). Die AAA Domänen, die mittels der „Pfam protein families“ Datenbank (Bateman et al., 2000; <http://www.sanger.ac.uk/Pfam>) bestimmt wurden, sind die am höchsten konservierten Domänen der RC Untereinheiten. Diese ~200 Aminosäuren langen Nukleotid-bindenden Regionen enthalten die für AAA ATPasen charakteristischen Walker A und B Motive und die sogenannte „second region of homology“, deren Funktion nicht bekannt ist (Abb. 18). Die N-terminalen Regionen mit geringeren Sequenzidentitäten enthalten Abschnitte mit möglichen coiled-coils (Abb. 19), eine Gemeinsamkeit aller bis jetzt identifizierten RC ATPasen (Rechsteiner et al., 1993; Russel et al., 1996). Noch bemerkenswerter ist der Grad der Identität der ATPasen zu ihren Homologen in anderen Organismen (Tab. 5). Die Sequenzidentität zwischen *Drosophila* und Hefe liegt zwischen 64 und 72%, die für *Drosophila* und Mensch zwischen 84 und 88%.



**Abb. 17: Identitäten der *Drosophila* RC ATPasen**

Mit den 3 Regionen (N-Terminus, AAA-Domäne und C-Terminus) der einzelnen ATPasen wurde jeweils eine  $\Psi$ -Blast Suche im *Drosophila* Genom durchgeführt. Es ist die Spannbreite der dabei bestimmten Sequenzidentitäten angegeben.

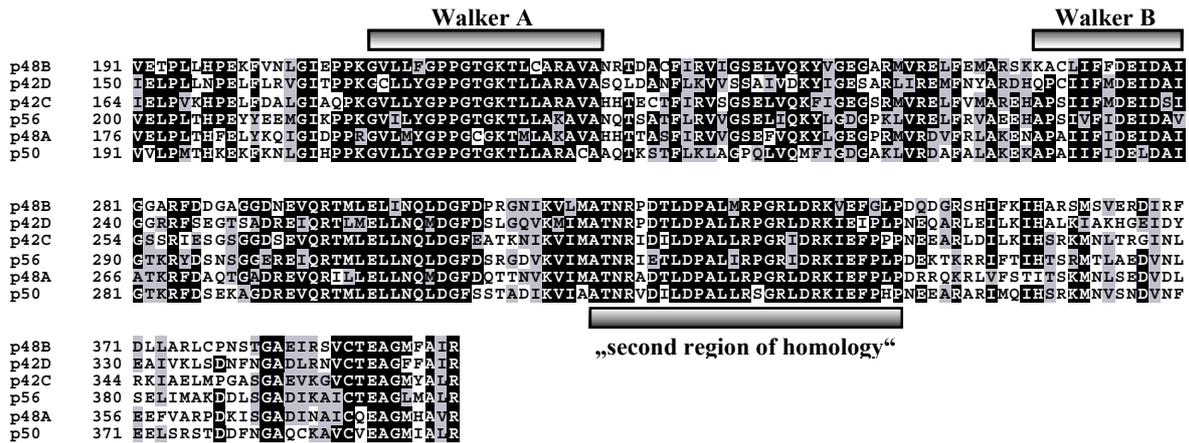


Abb. 18: Alignierung der AAA Domänen der *Drosophila* RC ATPasen

Die AAA Domänen wurden unter Verwendung von Clustal X (Thompson et al., 1997; Standardeinstellungen) aligniert. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche grau. Die Walker A und B Motive, sowie die „second region of homology“ wurden durch Vergleich mit anderen AAA ATPasen bestimmt (Neuwald et al., 1999).

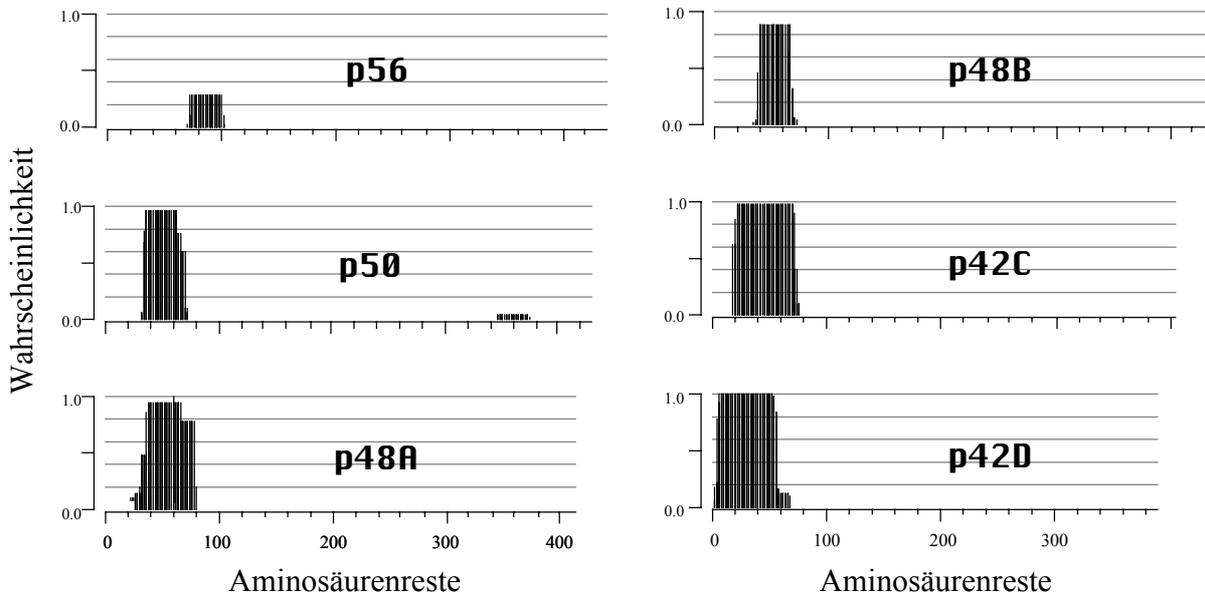


Abb. 19: coiled-coil Wahrscheinlichkeiten der *Drosophila* RC ATPasen

Die coiled-coil Wahrscheinlichkeiten für jede proteasomale AAA ATPase wurden mit dem Algorithmus von Lupas et al., (1991) unter Verwendung des Computerprogrammes MacStripe 2.01b (Einstellungen: MTIDK Matrix, Fenster von 28 Aminosäuren) berechnet.

p54

das *Drosophila* Homolog der RC Untereinheit Rpn10/S5a wurde ausführlich von Haracska und Udvardy (1995) charakterisiert.

### 4.3.2. Die Untereinheiten des „lid“-Komplexes

Die „lid“ Proteine des *Drosophila* RC weisen etwas niedrigere Ähnlichkeiten zu ihren Homologen in Hefe und Mensch auf als die ATPasen. Eine Ausnahme bildet hier p37B, das über seine gesamte Sequenz eine Identität von 64% zu Rpn11 und 88% zu S13 hat (Tab. 5). Wie in anderen Organismen enthalten 5 der Untereinheiten, p58, p55, p42A, p42B und p39A, PCI Domänen und 2 der Untereinheiten, p39B und p37B, Mov34/MPN Domänen (Aravind und Ponting, 1998, Hofmann und Buchner, 1998; Abb. 20), wobei die PCI Domänen zueinander eine viel geringere Ähnlichkeit aufweisen als die beiden MPN Domänen. Mittels einer  $\Psi$ -Blast Suche im *Drosophila* Genom können für die Untereinheiten des „lid“-Komplexes, abgesehen von Proteinen, die ebenfalls PCI/MPN Domänen enthalten, keine weiteren Homologen gefunden werden. Für die kleinste RC Untereinheit, p30, existiert in *Drosophila* ein homologes Protein (Genbank #AAF49682) von gleicher Größe, das über die gesamte Länge zu 49% identisch ist, über dessen Funktion jedoch nichts bekannt ist. (Auf p37A und seine Homologen wird in Kapitel 4.5. eingegangen.) Für 4 der 9 *Drosophila* RC Untereinheiten lassen sich coiled-coils vorhersagen (Abb. 21).

**a**

```

PCI      1 DTLTLIVRDRQNVIKTAIKQISLAVSRIRYIKDIKAKKLYITNETETEVIVAKATADGAIDAVITSDVDRGPRYMQSSETADTYRTSE
p58     351 HTFTLIIRDRHNVIKTAIRSIGLSVSRISPODIKAKRLMIDSAEDAIFIVSKAIRDGVIEATLDP...AQNFMRSKESSTDIYSTRE
p55     395 .....LKDRLEIHNIRIITAMYVSRHLHARMSELLNPTSRCCEVYLSKLANTD.TIRVKIDRPAG.IIYFTQKKSASDILNNW.
p42A    291 ....HYRYVREMRILGYTQLLESVRSLTLOYMAESFGVTVVEYIDQELARFIAAGRLHAKVDRVGG.IVETNRPDNKNWQYQA..
p42B    322 ....HLGTIDYDMLBQNLCRITIEPYSRVQVAHVABSIQTP.MPOVEKKLQSMIDDKKFSGLDQEGEGLVIVVEETPVDKTYERVL.
p39A    274 ....RQKISLLCLMEMTFKRSATER.AISFTDIAQETKIP.AKEVSELLIMKALALDLVRGEIDQ.....VAG.VVNM..

```

**b**

```

Mov34/MPN 1 PEFHALSQSSLLKTKLKQSSSTDIPSYTHVILSKISCEKITHY...AVRCGNIEHMGILMG.FTLKDNIVVMDCFNLPVVGTETRVNAQ
p39B      7 .....SVNKRVIHPLVLLSVVDHFNRMKIKGNQKRVVGVLLGCWRSKGVLDVSNITFAVPFDVDD...K.
p37B     24 .....DTAEQVYISLALRLMKH...CRAGVPMPEVMGLMLGSEVDDYTVQVIDVFAVMPQTCG.....

Mov34/MPN 86 LESYEYMYQYIDEMYNHNDGCDGRDYKGAALNVVGVFHSHPGVDCWLSNIDIQTDINQRFDQPPYVAHVVDPLKSLLEDKILLRMGAFFRTIE
p39B     66 .D...KSVWFIDHDY.LENMYGMFRKVNARERVVGVYHTGFL...KIHQNDIAINEIVRRMCPTPCWSSSIPSPRIWACPO.RRTYRWR.
p37B     79 .....VSVBEAVDPVF.QAKMLDMLKQTERPEVMVGVYHSHPGFGCWLSGVDINTQOSFEALSERAVAVVVDPIQSVKCKVV.IDAFRLI.

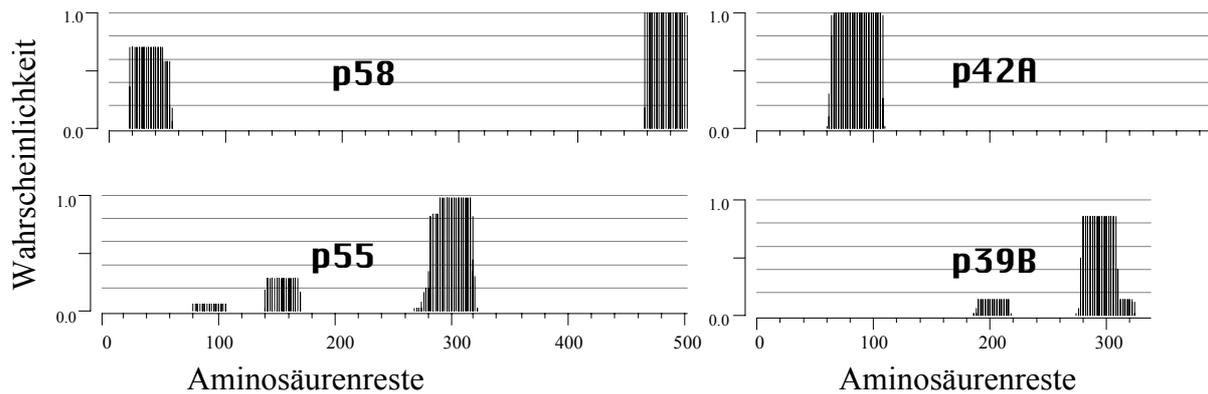
Mov34/MPN 176 SKSDDNSATSYYELETIIFDSELNRLAFETKLNLCVIEDDESQTSLNRLIDEMKQYSYVMDSKNVRTRIKLATTSERVSNENKKNIDY
p39B    145 .....K.VHDDGSPSTKTFEHPV.P.SEIGPE.EABEVCEHLLRDIKDTTVGSLQKITNOHMGKGLNAQLRDIQOYLQR
p37B    161 .....N.....PNMLVLCQEPKQFTSNLGL..LQKESVQALIHGLNRHYYSIS...INRYKBLEQKMLNLHKKSWKDLGLTSLDY

Mov34/MPN 266 QNRSTRSQFGLNTRGDDSTETSSFGSMFSGDNTSDVDMEDRNLTEDSDTDSLCEINGEPSIHVNRVERSSRSTDNFHNK
p39B    218 VGDSE...KMPINHO.....IVYQLODIFNLLPDITNDQ...ETGTMVYKTNQMLVYVYLASMVRSIIALHNLINNK
p37B    232 .N.....EHCISINE.D.....TVAEMLDIAARNYKSLDEE.....

```

**Abb. 20: Die PCI und MPN Domänen der *Drosophila* „lid“ Untereinheiten**

Die Proteine wurden unter Verwendung von Clustal X (Thompson et al., 1997; Standardeinstellungen) aligniert. Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, ähnliche grau. Die Konsensussequenz für die PCI bzw. Mov34/MPN Domäne stammt aus der „Pfam protein families“ Datenbank (Bateman et al., 2000; <http://www.sanger.ac.uk/Pfam>).



**Abb. 21: coiled-coil Wahrscheinlichkeiten der *Drosophila* „lid“ Untereinheiten**

Es sind nur jene Proteine dargestellt, für die coiled-coil Domänen berechnet werden konnten. (MacStripe 2.01b; Einstellungen: MTIDK Matrix, Fenster von 28 Aminosäuren).

#### 4.4. STEM MASSENBESTIMMUNGEN

Da durch 2D Gelelektrophorese und anschließende Aminosäuresequenzierung nicht unbedingt alle Untereinheiten eines sehr großen Proteinkomplexes erfasst werden können, ist es sinnvoll, die Masse des Komplexes auch experimentell zu bestimmen. Durch Vergleich dieser Masse mit den theoretisch berechneten und summierten Massen der Untereinheiten kann die Vollständigkeit des Untereinheiten-Katalogs abgeschätzt werden. Solche experimentellen Massenbestimmungen von Makromolekülen können mittels Rastertransmissions-Elektronenmikroskopie (STEM) mit einer bemerkenswerten Genauigkeit durchgeführt werden (Engel et al., 1982).

EM Aufnahmen für die Massenbestimmungen von nicht-kontrastierten 26S Proteasomen zeigten die übliche Heterogenität von 26S Präparationen, und diese Heterogenität wurde auch durch die Fixierung mit Glutaraldehyd nicht reduziert. Eindeutig konnten auf den Bildern die knochenförmigen Projektionen der symmetrischen 26S Komplexe von den keilförmigen Projektionen der asymmetrischen 26S Komplexe (20S-RC<sub>1</sub>) unterschieden werden. Neben einer großen Anzahl von kontrastreichen, ringförmigen Strukturen einheitlicher Größe, wie sie charakteristisch für 20S Proteasomen sind, waren auch noch weniger dichte, kleinere Massen zu sehen.

Die 20S Komplexe dienten, da ihre hohe Streuung eine eindeutige visuelle Identifizierung erlaubte, als geeigneter Massenstandard. Die Masse wurde als 721 kD festgelegt, der Durchschnitt der berechneten Massen des Hefe und Menschen 20S Proteasoms. Dadurch konnte den geringen Massenunterschieden, die auf die Probenvorbereitung zurückzuführen

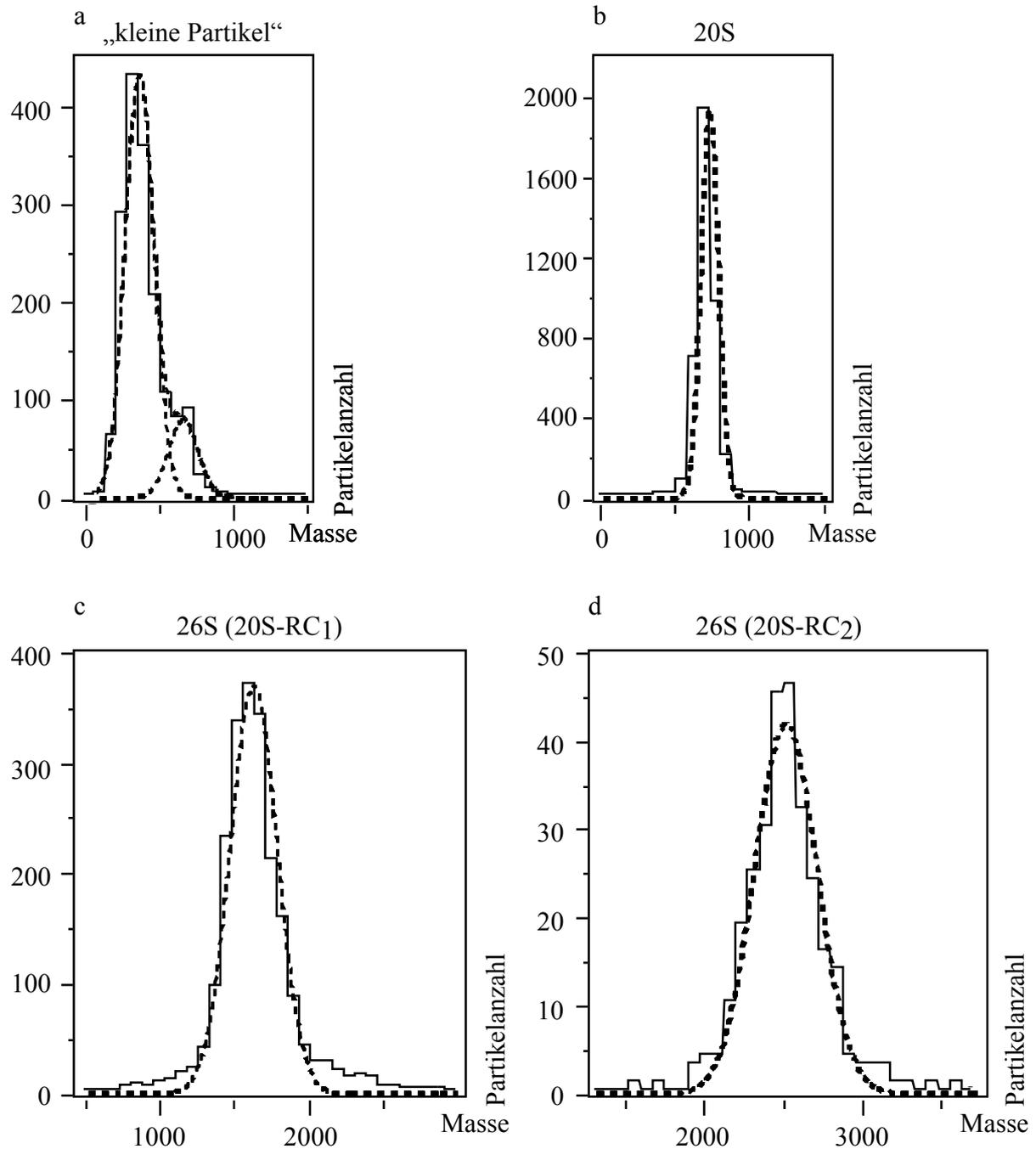
sind, sowie den inhärenten strahleninduzierten Massenverlusten genau Rechnung getragen werden.

Die vereinigten Datensätze der 4 Experimente (jeweils 2 Glutaraldehyd und 2 Ammoniumacetat behandelte Präparationen) wurden in Histogrammen dargestellt und Gauß Verteilungen angenommen (Abb. 22). Durch den Vergleich des Maximums des Histogramms der 20S Proteasomen mit 721 kD wurde ein globaler Skalierungsfaktor erhalten, welcher auch bei den anderen Datensätzen verwendet wurde. Die Anzahl der Komplexe ( $n$ ) wurde abgeschätzt und die dazugehörigen Standardfehler (SE) aus den Standardabweichungen (SD) berechnet ( $SE = SD/\sqrt{n}$ ).

Die geringe Standardabweichung von  $\pm 55$  kD der 20S Proteasomen ( $n = 3853$ ;  $SE = \pm 0,9$ ; Abb. 22) entspricht fast genau dem aufgrund der Hintergrundschwankungen erwarteten Wert ( $\sim 50$  kD) und bestätigt damit die hohe Qualität der Kalibrierung. Die Masse der asymmetrischen 26S Proteasomen (20S-RC<sub>1</sub>) wurde als  $1623 \pm 155$  kD ( $n = 2003$ ), die der symmetrischen 26S Proteasomen (20S-RC<sub>2</sub>) als  $2508 \pm 196$  kD ( $n = 286$ ) bestimmt. Das Maximum für die kleinen Partikel lag bei einer Masse von  $358 \pm 96$  kD ( $n = 1394$ ). Diese experimentell bestimmten Ergebnisse erlaubten die Berechnung der Masse des RC auf 3 Arten:

$$\begin{array}{rcl}
 20S-RC_2 - 20S-RC_1 & = & 885 \pm 250 \text{ kD (SE = } \pm 12 \text{ kD)} \\
 20S-RC_1 - 20S & = & 902 \pm 164 \text{ kD (SE = } \pm 4 \text{ kD)} \\
 \frac{20S-RC_2 - 20S}{2} & = & 894 \pm 144 \text{ kD (SE = } \pm 8 \text{ kD)} \\
 \text{Gesamtdurchschnitt:} & & \underline{\underline{894 \pm 196 \text{ kD (SE = } \pm 9 \text{ kD)}}}
 \end{array}$$

Obwohl auch experimentell einige Partikel in diesem Bereich gefunden wurden, was auf freie RC hindeutet, konnte aufgrund der geringen Anzahl die Masse des RC nicht direkt bestimmt werden. Die hier indirekt ermittelte Masse von  $894 \pm 196$  kD entspricht aber sehr genau der aus den Massen der 18 Untereinheiten berechneten Masse von 932 kD. Daraus konnte geschlossen werden, dass vermutlich alle RC Untereinheiten des gereinigten 26S Proteasoms durch die 2D Gelelektrophorese gefunden und identifiziert werden konnten.



**Abb. 22: STEM Massenbestimmungen**

Die Daten der 4 Experimente wurden jeweils auf die Masse des 20S Proteasoms (721 kD) skaliert und anschließend vereinigt, woraus sich die gezeigten Histogramme ergaben. Die Maxima liegen bei (a)  $358 \pm 96$  kD ( $n = 1394$ ) für die kleinen Partikel, (b) bei  $721 \pm 55$  kD ( $n = 3853$ ) für das 20S Proteasom, (c) bei  $1623 \pm 155$  kD ( $n = 2003$ ) für 20S-RC<sub>1</sub> und (d) bei  $2508 \pm 196$  kD ( $n = 286$ ) für 20S-RC<sub>2</sub>.

## 4.5. CHARAKTERISIERUNG VON p37A

### 4.5.1. Sequenzanalyse von p37A

Die vollständige Sequenzierung eines zu der Peptidsequenz von p37A korrespondierenden EST cDNA Klonen, LD02040, ergab einen offenen Leserahmen über 972 Basenpaare, der ein bis dahin unbekanntes Protein von 324 Aminosäuren kodierte. Die mittels GENETYX-MAC 8.0 berechnete Molekularmasse von 37,67 kD stimmt mit der aus der Laufstrecke in SDS-PAGE Gelen ermittelten Masse gut überein, der berechnete pI von 5,12 ist etwas saurer als der auf den 2D Gelen beobachtete.

Die Suche nach verwandten Proteinen in den Datenbanken zeigte, dass p37A zur Familie der Ubiquitin COOH-terminale Hydrolasen (UCH) gehört. Proteine dieser Familie sind charakterisiert durch eine 210 Aminosäuren lange Domäne mit 4 hochkonservierten Sequenzblöcken, die die katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat, enthalten (Wilkinson, 1997). p37A ist mit seiner Masse von 37 kD größer als die Mehrheit der bis jetzt bekannten UCH, die um ungefähr 100 Aminosäuren an ihrem C-Terminus kürzer sind. Insgesamt wurden 11 Proteine gefunden, die zuzüglich zur UCH Domäne, auch in ihrer C-terminalen Region Sequenzidentitäten mit p37A aufweisen (Abb. 23). Eine Ausnahme bildet hierbei BAP1 (Jensen et al., 1998), das mit einer Länge von 729 Aminosäuren mehr als doppelt so lang wie p37A ist, dessen C-Terminus aber ebenfalls, nach einer Lücke von ~400 Aminosäuren, wieder homolog zu p37A ist.

Von diesen 11 Proteinen wurden bisher 2, nämlich UCH2 aus *S. pombe* (Li et al., 2000) und UCH37 aus *H. sapiens* (Xu, W., und R.E. Cohen, persönliche Kommunikation), ebenfalls als RC Untereinheiten identifiziert. Aufgrund der hohen Sequenzidentität kann davon ausgegangen werden, dass auch UCH37 aus *M. musculus* und *B. taurus* sowie das homologe Protein aus *C. elegans* (GenBank # CAA86665) Proteine des „lid“-Komplexes sind. Im Genom von *C. elegans* existiert neben diesem Protein nur mehr eine UCH (GenBank # AAD14718) mit einer Länge von 216 Aminosäuren, im mittlerweile vollständig bekannten *Drosophila* Genom (Adams et al., 2000) hingegen gibt es insgesamt 4 UCH, die mittels einer Blast Suche gefunden wurden (Tab. 6).



**b**

```

Dm p37A      243 NAMDTEEDR. ....O AETSSLRTYI EYEQKRRY KVENVRRKHN YLFFIVELIK IICBNGCMP IYBKAKORAL
Dm CG1950    259 .SOLSFDR. ....O AETANLRSHW RHBEKRRY RKENVRRKHN YLFFIVELIK QICFTGOTMA ICTKAKORSY
Hs UCH37     244 EEHEMDTCC . .NSMISAIO SEVAKNQML EBEVQKRRY KVENVRRKHN YLFFIVELIK TTAHQOTIP IVEKAKEK...
Et UCH37     244 .EEHEMDTCC . .SNMISAIO SEVAKNQML EBEVQKRRY KVENVRRKHN YLFFIVELIK TTAHQOTIP IVEKAKEK...
Mn UCH37     244 .EEHEMDTCC . .STVISAIO SEVAKNQML EBEVQKRRY KVENVRRKHN YLFFIVELIK TTAHQOTIP IVEKAKEK...
Ce CAA86665  238 LIQANNE. ....LE FQTDLNKA I AEDYKMEMY RKENVRRKHN YLFFIVELIK IIAKEGKLVG IYDNYQAAK
At AAB60914  260 YAKSSYEAL ..DEPSEWN IGHEIVSQK I VMBEKSNNW RKENVRRKHN YLFFIVELIK IIAKKTTP IIAKHP
At AAF23845  278 CVKSAEAV ..NALTAEVG SGTAAADKI VMBEKSNNW RKENVRRKHN YLFFIVELIK IIAKKTTP IIAKAKQ...
Dm CG8445    326 LLHPSAFAR DLQSLKNIID TETAINECHL AEDNRRVVF KVDASRRTHN MKRFTCTHS MIAHGVIGE IYSOHLLPSK
Hs Bap1      634 .....ELKQVE AETANYEAC I KBEVEKRRYF KUDDOFRTHN YDEFTCTHS MIACEGMAN IVEQNTSVRR
Sp Uch2      229 ..KASLIR. ....ED LIDEEKAAS I AVDEKRRRW RKENVRRKHN FVGLFVPSK IIVKDRIDKN IWNSTLETAK
Nc CAC18190  237 .....RIR AREFADEEL I ATEERKREAW RFENALRRHN EVCFAGEILK GVVSAKLAAG GSAYDDVWQ

Dm p37A      313 E. ....REQ AQRKDTD
Dm CG1950    328 L. ....CKP SADRDOOQ
Hs UCH37     320 .....QN AKTAQEK
Et UCH37     319 .....QN AKTAQEK
Mn UCH37     319 .....QN AKTAQEK
Ce CAA86665  309 .....EK SINTDITKL ELKRKQ
At AAB60914  318 .....KT ESST
At AAF23845  406 KVSCQAANR ISKOSTIASA GGSTAAGTAS TPKIQ
Dm CG8445    701 RQGVSTGRILH KQRKDRKR SRPYKAKRQ
Hs Bap1      298 AKYAS...Q. .KRP
Sp Uch2      300 G. ....KKM EKRAAQRAR HGGEDEVEM QG
Nc CAC18190

```

CG1950 und CG8445 wurden nur aufgrund ihrer Sequenzen als UCH klassifiziert, über ihre Funktion ist nichts bekannt. CG1950 ist über einen Bereich von 307 Aminosäuren zu 63% mit p37A identisch, während CG8445 eine geringere Ähnlichkeit aufweist und über Verlängerungen in seinen N- und C-Termini verfügt. *A. thaliana* besitzt 2 UCH (GenBank # AAB60914 und # AAF58046), die über ihre gesamte Länge homolog zu p37A sind, wobei die C-Termini, ebenso wie bei BAP1 aus *H. sapiens*, UCH2 aus *S. pombe* und dem homologen aus *N. crassa* (Genbank # CAC18190), weniger konserviert als die UCH Domänen sind. Da für den C-Terminus von BAP1 eine coiled-coil Domäne postuliert worden war (Jensen et al., 1998), wurden auch die übrigen Proteine auf ihre Wahrscheinlichkeit an coiled-coils untersucht. Während für UCH37 aus Säugetieren coiled-coil Domänen vorhergesagt werden können, ist dies für p37A und UCH2 nicht möglich.

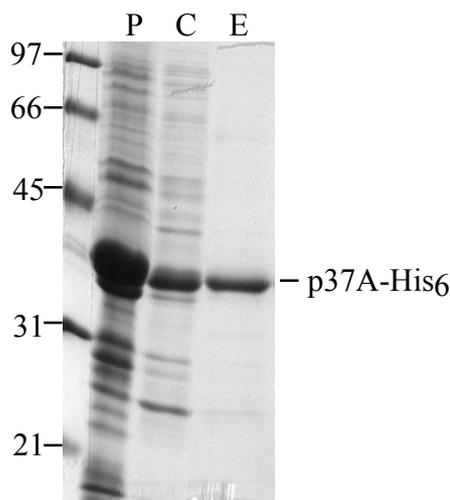
**Tab. 6: UCH in *Drosophila***

Name	Synonyme*	GenBank #	AA	Referenz
UCH	CG4265 UCH-D UBL	CAA49358	227	Zhang et al., 1993
p37A	UCH-L3 CG3431 l(3)j2B8	AAF08393	324	Hölzl et al., 2000
CG1950		AAF48139	341	
CG8445		AAF58046	440	

\*Alternative Namen, unter denen die Proteine in der FlyBase Datenbank gefunden werden.

#### 4.5.2. Klonierung, Expression und Reinigung von p37A

Die für p37A kodierende cDNA wurde in den Expressionsvektor pET22b subkloniert, wodurch ein His<sub>6</sub>-tag an den C-Terminus des rekombinanten Proteins angefügt wurde, um die Proteinreinigung mittels Ni-Chelat-Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Das resultierende Plasmid wurde in BL21(DE3)RIL *E. coli* Zellen transformiert, und zur Überprüfung der Expression wurden Vorreinigungen im kleinen Maßstab unternommen. p37A wurde unter Standardbedingungen (Induktion mit 1 mM IPTG, Wachstumstemperatur von 37°C) mit einer sehr hohen Rate exprimiert, wobei der Hauptteil des Proteins in löslicher Form vorlag. Allerdings zeigte sich, dass bei der anschließenden Reinigung mit Ni-NTA große Mengen an kontaminierenden Proteinen mitgereinigt wurden. Um diese Verunreinigungen zu minimieren, wurden einige Änderungen im Protokoll vorgenommen:



**Abb. 24: Reinigung von p37A-His<sub>6</sub>**

SDS-PAGE von rekombinanten p37A nach der Reinigung über Ni-NTA, gefärbt mit Coomassie blue. P: unlösliche Bestandteile nach Aufschluss der IPTG-induzierten BL21(DE3) *E. coli* Zellen, C: Zellysate, E: Elution der Ni-NTA Säule

Dem LB-Medium sowie den Puffern für die Ni-NTA Reinigung wurde  $\beta$ -Mercaptoethanol in einer Konzentration von 14 mM zugesetzt, die Temperatur wurde auf 20°C herabgesetzt und die Konzentration des IPTG auf 0,2 mM reduziert.  $\beta$ -Mercaptoethanol verhindert einerseits die Ausbildung von S-S Brücken zwischen p37A und endogenen *E. coli* Proteinen, andererseits reduziert es die Affinität zu Ni-NTA und damit die unspezifische Bindung von Proteinen. Die Herabsetzung der Temperatur sowie die geringere Konzentration an IPTG verlangsamt die Expression des

rekombinanten Proteins. Rekombinante Proteine mit einer hohen Expressionsrate aggregieren leicht, bzw. sind nicht vollständig gefaltet, obwohl sie löslich sind, was ebenfalls unspezifische Bindungen mit endogenen Proteinen begünstigt.

Durch diese Modifikationen war es möglich, sehr reines p37A nativ mittels einer Ni-NTA Säule ohne einen weiteren Reinigungsschritt zu erhalten (Abb. 24). Aus 2,2 L Kultur konnten ungefähr 7 g Zellen geerntet werden, aus denen 70 mg rekombinantes Protein präpariert wurde.

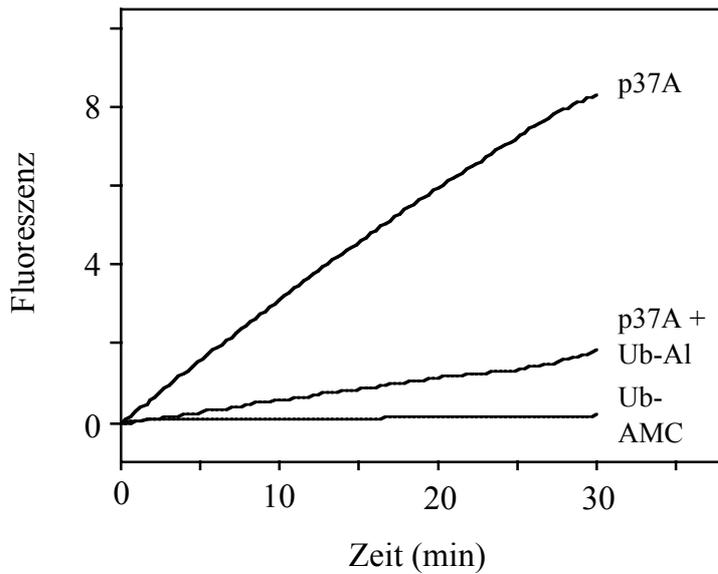
#### 4.5.3. Nachweis der deubiquitinierenden Aktivität von p37A und 26S Proteasomen

Die aus den Sequenzhomologien abgeleitete Zugehörigkeit von p37A zur Familie der Ubiquitin COOH-terminalen Hydrolasen wurde auch durch biochemische Experimente bestätigt. Da alle deubiquitinierenden Enzyme trotz der Unterschiede in ihrer Größe und physiologischen Rolle ihre Substrate mit demselben Reaktionsschema hydrolysieren, war es möglich, diesen gemeinsamen Mechanismus für die Konstruktion von Modellsubstraten auszunutzen. Während das bekanntere Modellsubstrat Ubiquitin-Ethylester (Wilkinson et al. 1986; Mayer und Wilkinson, 1989) den Nachteil von zu geringer Empfindlichkeit und Genauigkeit sowie den einer aufwendigen Versuchsdurchführung hat, kann die Hydrolyse des fluorogenen Substrates Ub-AMC kontinuierlich ohne großen Aufwand mit hoher Sensitivität verfolgt werden (Dang et al., 1997).

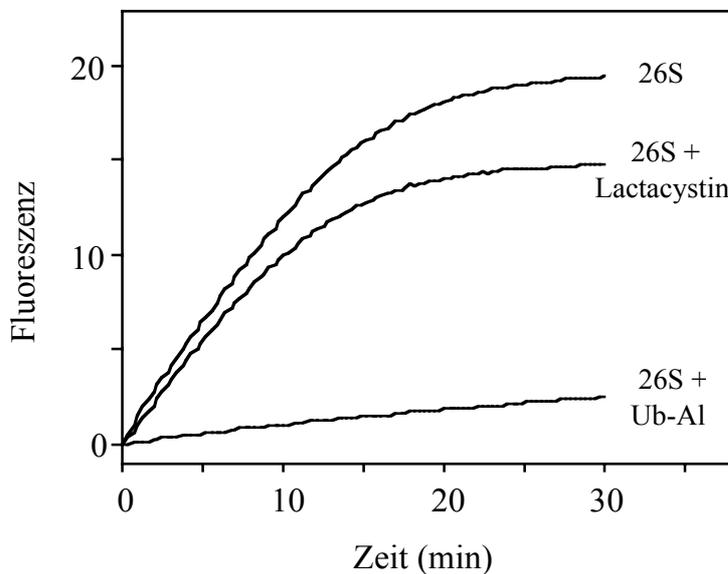
Nachdem mit humanem UCH-L3 als Kontrollenzym die idealen Bedingungen für den Assay gefunden waren, wurde gereinigtes rekombinantes p37A auf seine enzymatische Aktivität hin getestet. p37A hydrolysiert Ub-AMC, und diese Aktivität kann vollkommen mit Ub-Al inhibiert werden, wenn es in mindestens equimolaren Mengen eingesetzt wird (Abb. 25).

Gereinigte 26S Proteasomen wurden in gleicher Weise getestet, und es konnte gezeigt werden, dass auch sie Ubiquitin COOH-terminale Hydrolase Aktivität besitzen (Abb. 26), die durch Ub-Al vollkommen blockiert werden kann. Um auszuschließen, dass die proteolytische Aktivität des 20S Kerns für diese Hydrolyse verantwortlich ist, wurde dem Assay der 20S Proteasomen Inhibitor Lactacystin (Fenteany et al., 1995) im Überschuss zugesetzt und dessen Wirkung durch Bestimmung der Peptidaseaktivität mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC überprüft. Wie aus Abbildung 26 ersichtlich hat eine Blockierung der 20S Aktivität des *Drosophila* 26S Proteasoms keinen Einfluss auf seine deubiquitinierende Aktivität.

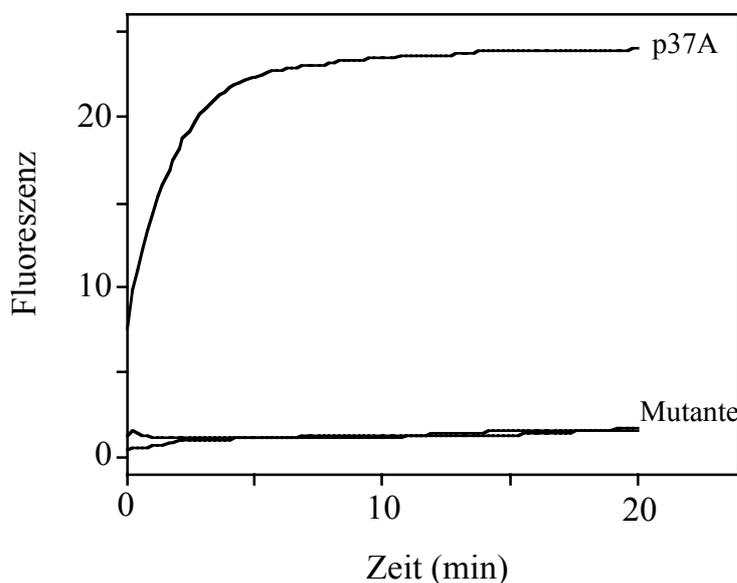
Durch den Vergleich mit anderen UCH wurden die 3 Aminosäurereste, die das aktive Zentrum bilden, gefunden (Abb. 23): Cystein 86, Histidin 162 und Aspartat 177. Ausgehend von der cDNA Sequenz für p37A wurde unter Verwendung des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) anstatt des Cysteins in Position 86 ein Serin eingeführt. Die Mutation konnte anschließend durch DNA-Sequenzierung bestätigt, und eventuell zusätzlich entstandene Mutationen konnten ausgeschlossen werden. Für diese Punktmutation diente das Plasmid pET22b als Matrize. Das mutierte Protein wurde daher als Histidininfusionsprotein gereinigt und konnte in gleicher Weise wie das nicht mutierte exprimiert und unter Verwendung von Ni-NTA gereinigt werden.

**Abb. 25: p37A besitzt****deubiquitinerende Aktivität**

Die Intensität der Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ), die proportional zur Menge an freigesetztem AMC ist, wurde in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Reaktionen wurden bei  $25^\circ\text{C}$  in UCH-Puffer bei einer Ub-AMC Endkonzentration von  $5 \mu\text{M}$  durchgeführt. Die Aktivität von p37A ( $\sim 2 \text{ nM}$ ) wurde sowohl mit als auch ohne Vorinkubation mit Ub-Al ( $\sim 2 \text{ nM}$ ) gemessen. In einem Kontrollansatz ohne Enzym wurde die Selbsthydrolyse von Ub-AMC gemessen.

**Abb. 26: *Drosophila* 26S****Proteasomen besitzen****deubiquitinerende Aktivität**

Gereinigte 26S Proteasomen ( $\sim 20 \mu\text{g/ml}$ ) wurden mit oder ohne Ub-Al ( $10 \text{ nM}$ ), oder mit Lactacystin ( $20 \mu\text{M}$ ) inkubiert bevor Ub-AMC zugegeben wurde. Der Unterschied in der Fluoreszenz zwischen nicht inhibierten und Lactacystin-inhibierten Proteasomen liegt innerhalb des Bereichs der beobachteten Abweichungen und ist nicht signifikant.

**Abb. 27: Mutiertes p37A besitzt****keine deubiquitinerende Aktivität**

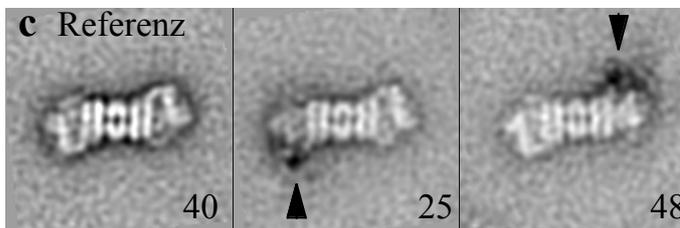
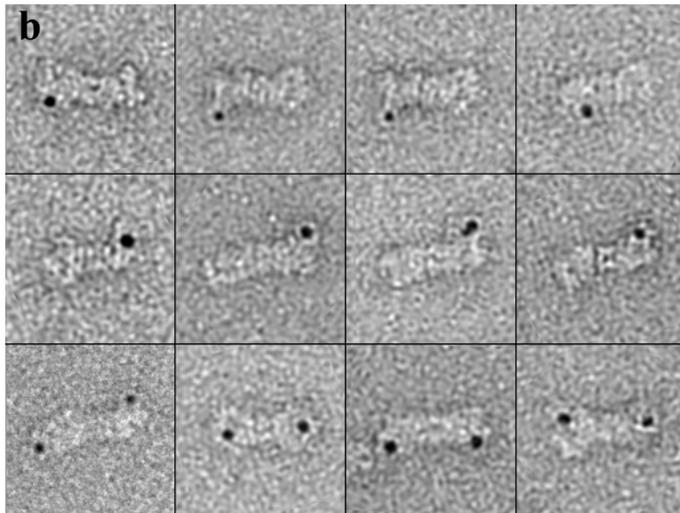
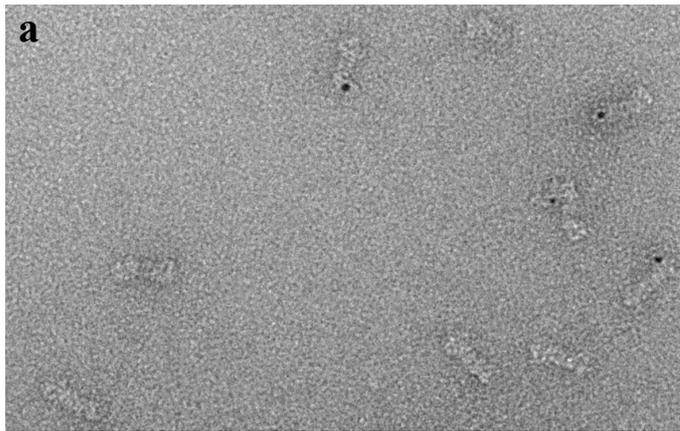
Während das rekombinante p37A mit einer Konzentration von  $2 \text{ nM}$  innerhalb weniger Minuten Ub-AMC ( $5 \mu\text{M}$ ) vollständig hydrolysierte, war mutiertes p37A vollständig inaktiv.

Durch den Austausch des Cysteinrestes wurde die enzymatische Aktivität von p37A komplett ausgeschaltet und Ub-AMC nicht mehr hydrolysiert. Fasst man all diese Ergebnisse zusammen, so konnte eindeutig gezeigt werden, dass p37A ein neues Mitglied der großen Enzymfamilie der Ubiquitin COOH-terminalen Hydrolasen ist.

#### 4.5.4. Lokalisierung von p37A im RC

Für die elektronenmikroskopische Lokalisierung von p37A innerhalb des 26S Proteasoms wurde die spezifische Bindung des Inhibitors Ub-AI ausgenutzt. Ub-AI wurde an kolloidale Goldpartikel mit einem Durchmesser von 3,5 nm gebunden. Die Elektronendichte von Goldpartikeln ist groß genug, um sie selbst in negativ kontrastierten Präparationen eindeutig zu sehen. Um definierte und stabile Konjugate zu erhalten, wurden die primären Aminogruppen des Ub-AI mittels 2 Iminothiolan in eine Thiolgruppe überführt, welche dann mit den frisch präparierten kolloidalen Goldpartikeln eine stabile und kovalente Gold-Schwefel-Bindung eingehen.

Abbildung 28a zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten 26S Proteasomen, die mit an kolloidalen Goldpartikeln konjugiertem Ub-AI markiert sind. Ungefähr 50% der 26S Komplexe hatten zumindest ein Goldpartikel gebunden, während ungebundene Goldpartikel kaum anzutreffen waren. In Abbildung 28b ist eine Galerie von alignierten 26S Proteasomen dargestellt, die Goldpartikel entweder an nur einem RC oder an beiden RC gebunden haben. Mittels Einzelpartikelanalyse (Rotations- und Translations-Alignierung, MSA/Klassifizierung; Hegerl, 1996) konnte gezeigt werden, dass p37A im Übergangsbereich zwischen der proximalen und der distalen Masse des RC, das heißt mit anderen Worten, zwischen den 2 RC Subkomplexen, dem „base“- und dem „lid“- Komplex, lokalisiert ist.

**Abb. 28: Lokalisierung von p37A**

(a) Elektronenmikroskopische Aufnahme von 26S Proteasomen Präparationen, die mit Gold-gekoppelten Ub-A1 inkubiert worden waren. (b) Galerie von Gold-gekoppelten Ub-A1 gebunden an Proteasomen nach Rotations- und Translations-Alignierung. (c) Hauptklassen von Gold-gekoppelten Proteasomen nach MSA/Klassifizierung. Nicht markiertes Proteasom diente als Referenz.

#### 4.6. EPITOP-MARKIERUNG EINZELNER RC UNTEREINHEITEN

Neben p37A wurde auch versucht, die Lage anderer Untereinheiten im RC zu bestimmen. Antikörper gegen einige dieser Untereinheiten standen zur Verfügung, und mittels Immunoelektronenmikroskopie wurde versucht, Untereinheiten im Komplex zu lokalisieren. Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen war jedoch entweder keine Antikörper-Bindung zu sehen, oder eine vorhandene Bindung schien die Konformation des RC zu verändern. Die Aufnahmen konnten somit nicht gemittelt werden.

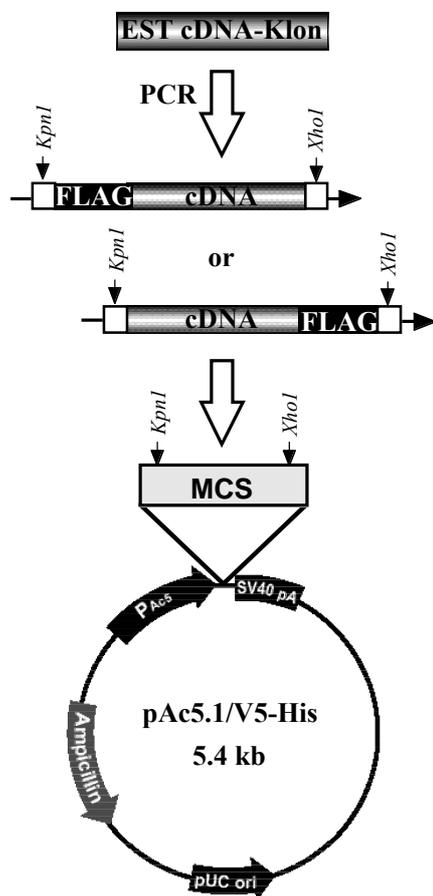
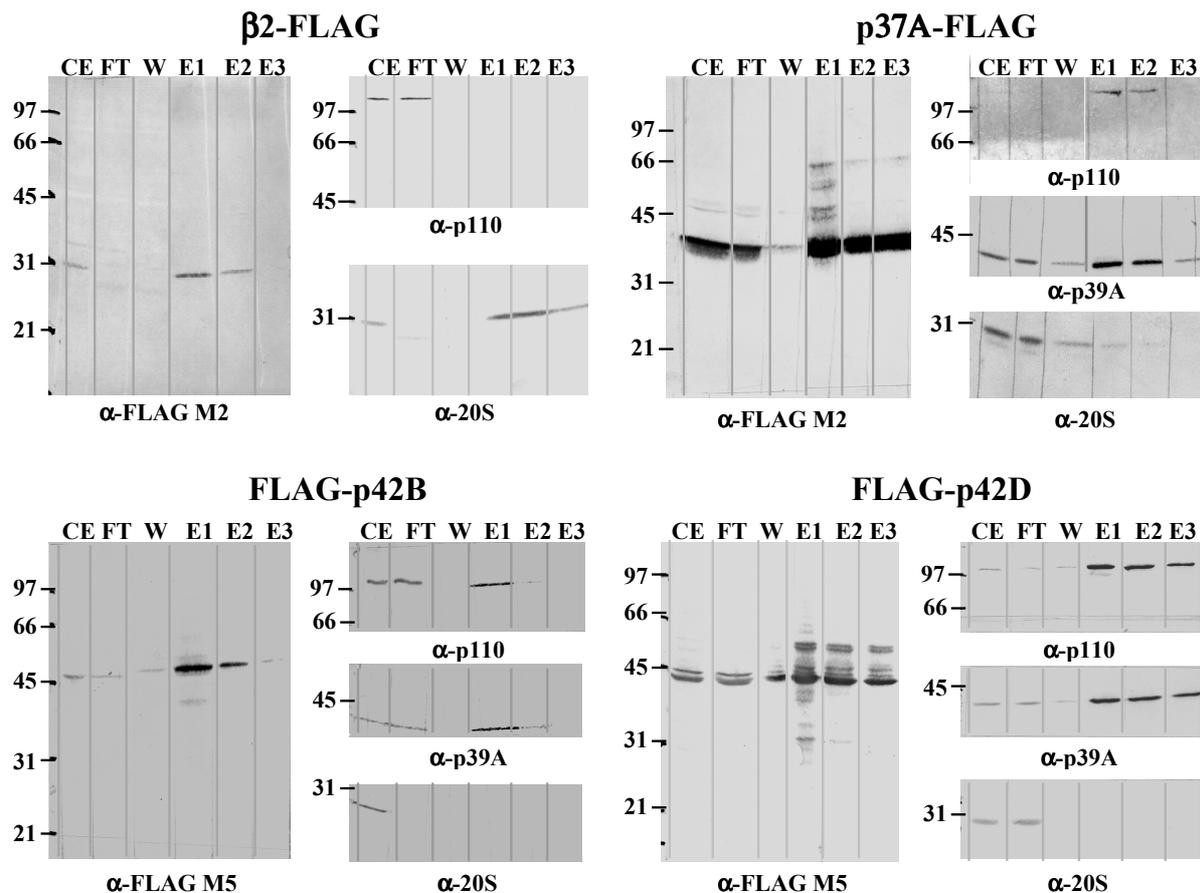


Abb. 29: Schematische Darstellung des Plasmidkonstruktes zur Überexpression von RC Untereinheiten in *D. melanogaster* S2 Zellen

Eine andere Methode, die Anordnung der Untereinheiten zu ermitteln, ist eine direkte Epitopmarkierung einzelner Proteine. Als Epitop wurde der so genannte FLAG-tag (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) verwendet. Ausgehend vom jeweiligen EST cDNA Klon wurde die cDNA mittels PCR amplifiziert und eine N-terminale *KpnI*, eine C-terminale *XhoI* Restriktionsschnittstelle sowie eine für die 8 Aminosäuren des FLAG-Epitops kodierende Region, entweder am N- oder C-Terminus, eingeführt (Abb. 29). Die PCR Produkte wurden in den *Drosophila* Expressionsvektor pAc5.1/V5-His kloniert und nach Transformation und Selektion positiver Klone in *E. coli* X11-Blue Zellen die Plasmide in *Drosophila* S2 Zellen stabil transfiziert. Zur Überprüfung von Transfektion und Expression wurden Reinigungen der FLAG-Fusionsproteine im kleinem Maßstab durchgeführt.

Transfizierte S2 Zellen aus 10 – 50 ml Kultur ( $\sim 1 \times 10^7$  Zellen/ml) wurden geerntet, und nach Aufschluss mit NP-40 wurden aus dem Zelllysate im Batch Verfahren mit  $\alpha$ -FLAG<sup>®</sup> M2

Affinitätsgel die Fusionsproteine isoliert. Die Ausbeuten dieser Reinigung waren sehr gering, und auf einem Coomassie blue gefärbten SDS-PAGE Gel konnten kaum Proteinbanden erkannt werden. Durch Western Blots war es aber möglich, die Proteine sichtbar zu machen, und für alle getesteten Proteine ergab sich ein ähnliches Bild (Abb. 30). Wie aus den Blots mit dem  $\alpha$ -FLAG M2 (bzw. M5) Antikörper erkenntlich, wurden die Proteine exprimiert und über die Affinitätssäule gereinigt, wobei die unterschiedliche Intensität der Banden eher auf die unterschiedliche Ausgangsmenge an Zellen als auf unterschiedliche Expressionsraten zurückzuführen sein dürfte. Um den Einbau von Epitop-markiertem, überexprimiertem Protein in 26S Proteasomen oder seine Subkomplexe zu überprüfen, wurden die einzelnen Fraktionen der Reinigungen mit mAbs gegen eine 20S Untereinheit, gegen die „lid“ Untereinheit p39A und gegen die „base“ Untereinheit p110 geblottet. Wie aus Abbildung 30 ersichtlich, konnten mit den beiden „lid“ Untereinheiten, p37A (mit einem FLAG-Epitop am C-Terminus) und p42A (mit einem FLAG-Epitop am N-Terminus), sowie mit der „base“



**Abb. 30: Western-Blots der  $\alpha$ -FLAG Reinigungen**

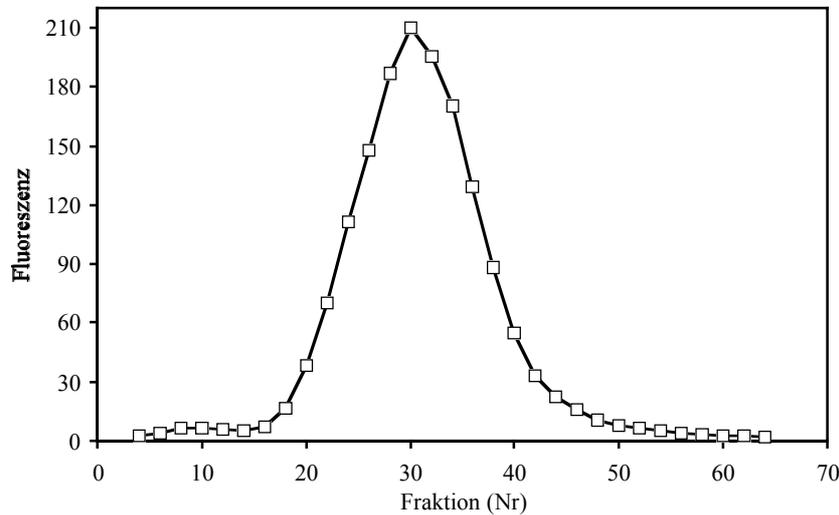
FLAG-markierte 26S Untereinheiten wurden in S2 Zellen exprimiert und mittels  $\alpha$ -FLAG M2 Affinitätsgel gereinigt. Die einzelnen Fraktionen der Reinigungen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose Membranen geblottet und anschließend mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. CE: Zellysate, FT: Durchfluss der FLAG Säule, W: Waschschrift, E1 – 3: Elutionen.

Untereinheit, p42D (mit einem FLAG-Epitop am N-Terminus), jeweils die beiden anderen RC Untereinheiten, jedoch kein 20S, mitgereinigt werden. Umgekehrt war die Situation bei der 20S Untereinheit  $\beta$ 2 (mit einem FLAG-Epitop am C-Terminus), wo keine RC Untereinheiten, dafür aber 20S mitgereinigt wurden. Mit dieser Methode ist es also anscheinend nicht möglich, intakte 26S Proteasomen zu reinigen, obwohl alle Ansätze mit ATP (2 mM) bzw. teilweise mit ATP-Regeneration mit Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase (Verma et al., 1997) durchgeführt wurden.

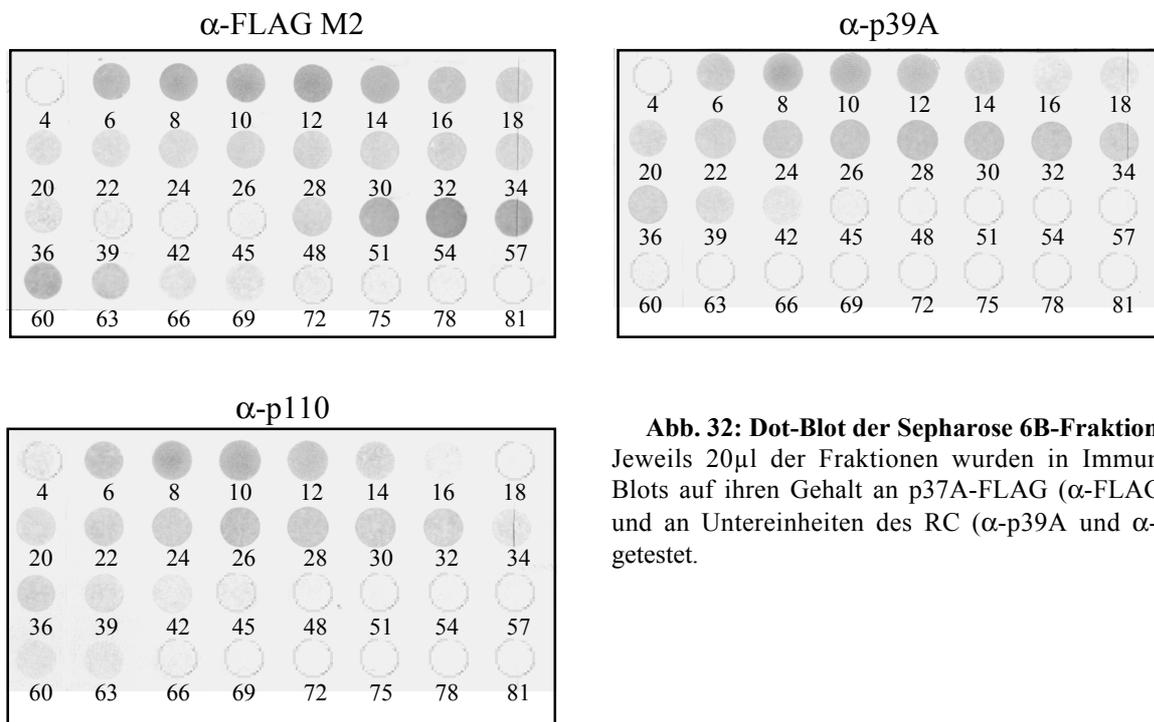
Da die Ausbeute an Protein bei diesen Reinigungen zu gering für weitere Experimente war, wurde mit p37A-FLAG eine Präparation in größerem Maßstab durchgeführt. Transfizierte S2 Zellen aus 1,2 L Medium wurden geerntet und mittels Sonifizierung aufgeschlossen. Nach Abtrennung der Membranen durch Zentrifugation und anschließender ATP Regeneration wurde das Lysat über eine Gelfiltration (Sepharose 6B CL, Säulenvolumen: 600 ml) vorgereinigt, um vor der FLAG-Affinitätssäule freies p37A-FLAG von in RC eingebautem zu trennen. Nach Durchlaufen von 200 ml wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt; nach 220 ml trübte sich das Eluat ein, woraus das Ausschlussvolumen erkannt wurde. Die Fraktionen des Ausschlussvolumens, Fraktionen 6 – 16, reagierten stark positiv in allen durchgeführten Immunodot-Blots (Abb. 32). Da diese Fraktionen aber keine Peptidaseaktivität für Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC aufwiesen (Abb. 31), also keine 20S Proteasomen enthielten, wurde angenommen, dass die Färbung in den Dot-Blots eine unspezifische Kreuzreaktion darstellt. Auf dem mit  $\alpha$ -FLAG M2 inkubierten Blot trat neben dem positiven Signal zwischen den Fraktionen 22 – 36 (Elutionsvolumen: 310 – 380 ml) noch ein weiteres, stärkeres Signal in den Fraktionen 48 – 63 (Elutionsvolumen: 440 – 515 ml) auf. Das erste Signal wurde auch auf den Blots mit  $\alpha$ -p110 bzw.  $\alpha$ -p39A erhalten, und das Maximum der Peptidaseaktivität lag ebenfalls in diesem Bereich. Daraus wurde geschlossen, dass mit einem FLAG-Epitop versehene 26S Proteasomen oder RC in diesen Fraktionen angereichert worden waren. Das zweite Signal sollte überexprimiertem, freiem p37A-FLAG entsprechen. Die Fraktionen beider Signale wurden jeweils vereinigt und über das  $\alpha$ -FLAG M2 Affinitätsgel weitergereinigt.

Nach Inkubation für 16 h mit dem Affinitätsgel wurden gebundene Proteine mit dem FLAG-Peptid isoliert. Durch diese schonende Elution (kein Pufferwechsel, kein Detergenz etc.) sollten gebundene Komplexe nicht zerstört werden. Damit war es möglich, RC zu isolieren (Abb. 33), wobei die Ausbeute an Protein ungefähr 150  $\mu$ g/L betrug. In den Elutionen war kaum Peptidaseaktivität vorhanden, und auf negativ kontrastierten EM Aufnahmen konnten nur vereinzelt 26S Proteasomen gefunden werden. Wie schon bei den Reinigungen im kleinen

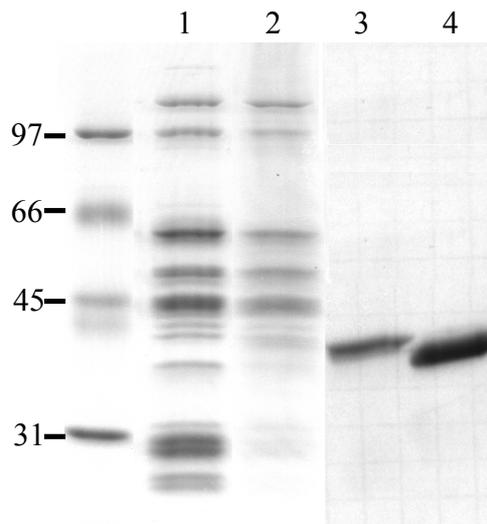
Maßstab war es nicht möglich, intakte 26S zu isolieren. Auf SDS Gelen schienen die Präparationen der RC relativ rein, waren aber für Untersuchungen mit dem EM ungeeignet, da keine einheitlichen Komplexe zu erkennen waren.



**Abb. 31: Peptidaseaktivität der Sepharose 6B Fraktionen**  
Jeweils 20 µl der Fraktionen wurden für 30 min bei 37°C mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (100 µM) inkubiert und die Fluoreszenz gemessen ( $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ ).



**Abb. 32: Dot-Blot der Sepharose 6B-Fraktionen**  
Jeweils 20µl der Fraktionen wurden in Immunodot-Blots auf ihren Gehalt an p37A-FLAG (α-FLAG M2) und an Untereinheiten des RC (α-p39A und α-p110) getestet.



**Abb. 33: Vergleich verschiedener Reinigungen** SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie blue von (1) 26S Proteasomen, gereinigt aus *Drosophila* Embryonen, (2) RC, über p37A-F aus transfizierten S2 Zellen gereinigt, (3) nicht in den RC eingebautes p37A-F aus S2 Zellen und (4) in *E. coli* rekombinant exprimiertes p37a-His<sub>6</sub>

Die Reinigung des Regulatorischen Komplexes über FLAG-markiertes p37A ist eine weitere Bestätigung dafür, dass p37A eine echte Untereinheit des RC ist. Das nicht in den Komplex eingebaute freie p37A-FLAG konnte ebenfalls gut gereinigt werden, wobei die Ausbeute an Protein 200 µg/L betrug. Aufgrund der geringen Ausbeute und des großen Aufwands im Vergleich zur Expression in *E. coli* ist Letztere aber vorzuziehen.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. DAS *DROSOPHILA* 26S PROTEASOM

Während Struktur und enzymatischer Mechanismus des 20S Proteasoms weitgehend aufgeklärt sind (Übersichtsartikel: Baumeister et al., 1998; Bochtler et al., 1999; Voges et al. 1999), ist immer noch wenig über die Struktur des 26S Proteasoms bekannt. Die Instabilität dieses Komplexes aus 20S Proteasomen und Regulatorischen Komplexen (RC) erschwert strukturelle und biochemische Untersuchungen, und selbst die Identifizierung der Untereinheiten des 26S Proteasoms, eine Voraussetzung für eine Aufklärung der Topographie und für eine funktionelle Charakterisierung, erwies sich als schwierig. In den letzten Jahren wurden 26S Komplexe aus einer Reihe von Organismen untersucht und teilweise die primären Strukturen ihrer RC Untereinheiten bestimmt. Systematische Arbeiten zur Erstellung eines Untereinheiten-Kataloges wurden aber nur in *Bos taurus* (De Martino et al., 1994), in *Homo sapiens* (Dubiel et al., 1995, Tanaka und Tsurumi, 1997) und *Saccharomyces cerevisiae* (Glickman et al., 1998a) durchgeführt. Leider ist es schwierig, aus diesen Organismen ausreichend stabile und homogene 26S Komplexe für elektronenmikroskopische Untersuchungen zu isolieren. Da gezeigt worden war, dass Präparationen aus *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* in dieser Hinsicht denen aus anderen Eukaryonten überlegen sind (Peters et al., 1993; Walz et al., 1998), wählten wir *Drosophila* Embryonen als Ausgangsmaterial. Erstes Ziel dieser Arbeit war, alle *Drosophila* RC Untereinheiten zu identifizieren, um damit eine Topographie des *Drosophila* RC zu erstellen.

#### 5.1.1. Identifizierung der *Drosophila* RC Untereinheiten

Erstmals isolierte Udvardy (1993) 26S Proteasomen aus *Drosophila melanogaster* und zeigte, dass der Gehalt an Proteasomen in Embryonen besonders hoch ist. Diese hohe Konzentration erklärt sich daraus, dass die gesamte Energie, welche während der Embryogenese benötigt wird, aus dem Abbau des Dotterproteins gewonnen werden muß. Die hohe Ausbeute an Proteasomen, die dadurch bei einer Reinigung erzielt werden kann, war für uns ein weiterer Grund dafür, Untersuchungen am *Drosophila* 26S Proteasom durchzuführen. Die

Auftrennung von isolierten RC aus *Drosophila* auf SDS Gelen führte zu 12 distinkten Proteinbanden, entsprechend ihrer apparenten Masse als p110 bis p37 bezeichnet (Haracska und Udvardy, 1996). Nur 2 dieser Proteine, die Polyubiquitin-bindende Untereinheit p54 (Haracska und Udvardy, 1996) und die ATPase DUG (p42C) (Cheng et al., 1998; Mounkes und Fuller, 1998) waren über Sequenzierung bzw. Western-Blots bereits charakterisiert. Darüber hinaus waren die primären Strukturen für 3 weitere Proteine bekannt, die aufgrund ihrer Homologie zu den entsprechenden Säugetier-Sequenzen als RC Untereinheiten identifiziert worden waren: DoxA-2 (p58) (Pentz und Wright, 1991), S4 (p56) (Hoyle und Fisher, 1996) und mov34 (p39B) (Gridley et al., 1990). Zur Bestimmung der restlichen Untereinheiten wurde gereinigtes 26S Proteasom mittels 2D Gelelektrophorese aufgetrennt und die dabei gefundenen Proteine des RC durch Aminosäuresequenzierung identifiziert. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit das *Drosophila* Genom noch nicht vollständig bekannt war, wurden die den erhaltenen Peptidsequenzen entsprechenden EST cDNA Klone (Rubin et al., 2000) vollständig in beide Richtungen sequenziert. Proteine mit einer Molekularmasse unter 30 kD konnten durch Vergleich mit 2D Gelen von *Drosophila* 20S Proteasomen als 20S Untereinheiten bestimmt werden und wurden keiner Aminosäuresequenzierung unterworfen. Im Molekulargewichtsbereich von 30000 – 110000 wurden insgesamt 22 Spots gefunden, deren Sequenzierung und anschließende Datenbankrecherche ergab, dass einige Proteine in 2 oder 3 Spots fokussiert waren. Das Auftreten von Duplets oder Triplets bei einer 2D Gelelektrophorese deutet auf posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen, hin. Die 3 größten Untereinheiten, p110, p97 und p58, fokussierten in dem verwendeten 2D Gelsystem kaum, konnten aber durch Sequenzierung der Proteinbanden in eindimensionalen Gelen identifiziert werden. In Kollaboration mit A. Udvardy wurde ein weiteres 2D Gelsystem, die 16-BAC/SDS-PAGE 2D Gelelektrophorese (Hartinger et al., 1996), angewandt. In diesem System erfolgt die Auftrennung der Proteine auch in der ersten Dimension anstatt durch einen pH Gradienten über die Molekularmasse, wobei das kationische Detergenz Benzyldimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC) allerdings ein anderes Laufverhalten als SDS bedingt. Die Auswertung dieser Gele ergab bis auf ein weiteres Protein, p55, das in den herkömmlichen 2D Gelen nicht gefunden wurde, keine zusätzlichen RC Untereinheiten.

Insgesamt wurden 18 Proteine als *Drosophila* RC Untereinheiten identifiziert (Tab. 5). 17 dieser Proteine haben Homologe in den bekannten RC Untereinheiten von *H. sapiens* und *S. cerevisiae*, nur die erstmals beschriebene Untereinheit p37A hat kein Homolog in Hefe, wohl aber in 26S Proteasomen aus Säugetieren (Xu W. und Cohen R.E., persönliche

Kommunikation) und *S. pombe* (Li et al., 2000). Damit kann davon ausgegangen werden, dass alle 18 Proteine integrale Bestandteile des *Drosophila* RC sind. Die Übereinstimmung zwischen der Gesamtmasse dieser 18 Proteine von 932 kD und der mittels STEM experimentell ermittelten Masse des RC von 894 kD legt den Schluss nahe, dass es gelungen war, mittels 2D Gelelektrophorese alle *Drosophila* RC Proteine zu erfassen.

Die Vollständigkeit eines großen Komplexes zu beweisen, ist grundsätzlich schwierig, da Proteine im Laufe des Reinigungsprozesses abdissoziieren oder in 2D Gelen nicht detektierbar sein können. Die geringen Unterschiede in der Zusammensetzung der RC verschiedener Organismen könnten daher ihre Ursache in den unterschiedlichen Protokollen zur Isolierung von Proteasomen haben. Im Falle der nur in Säugetieren gefundenen Untereinheiten S5b (Deveraux et al., 1995) und p28 (Hori et al., 1998), sowie der nur in Bäckerhefe gefundenen Untereinheiten Rpn4 (Fujimuro et al., 1998) und Rpn13 (Verma et al., 2000) kann das allerdings nicht zutreffen, da auch entsprechende DNA-Sequenzen im *Drosophila* Genom fehlen. Die Variationen in den RC unterschiedlicher Organismen könnten auch bedeuten, dass zwar die Mehrheit der Proteine essentiell für die Funktion des Proteasoms sind, dass es aber darüber hinaus Untereinheiten gibt, die nur in bestimmten Organismen oder Geweben exprimiert werden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass diese „fakultativen“ Untereinheiten nur in bestimmten Entwicklungsstufen, wie zum Beispiel während der Embryogenese, in die RC eingebaut werden. Weiters könnten Unterschiede in der Zusammensetzung des RC auch auf eine Anpassung an bestimmte zelluläre Bedingungen zurückzuführen sein. Schließlich könnten Proteine auch transient an das Proteasom binden, und daher der Zeitpunkt der Isolierung darüber entscheiden, ob sie detektiert werden oder nicht. Transiente Assoziation von Proteinen mit dem Proteasom wurde neben dem so genannten 11S Modulator (DeMartino et al., 1996) auch für die beiden deubiquitinierenden Proteine Doa4 (Papa et al., 1999) aus *S. cerevisiae* und Ap-uch (Hegde et al., 1997) aus *Aplysia californica*, einer Molluske, berichtet.

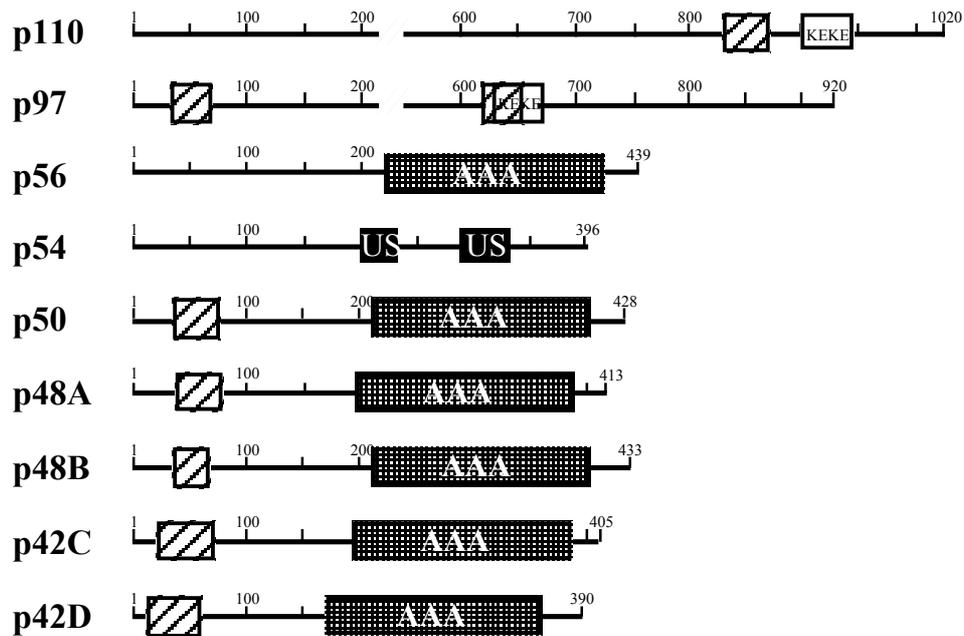
Die dynamische Struktur des RC zeigt sich auch darin, dass *Drosophila* p54 und das Hefehomolog Rpn10, zwei der am besten charakterisierten Untereinheiten, auch in freier Form in der Zelle auftreten (Haracska und Udvardy, 1996; van Nocker et al., 1996), und wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen freiem und Komplex-gebundenen Protein besteht. Wenn es aufgrund dieser Dynamik auch nicht möglich sein wird, eine definitive Zahl von RC Untereinheiten anzugeben, dürften die 17 Proteine, die bis jetzt in jedem untersuchten Organismus gefunden wurden, den Satz an Proteinen darstellen, der für ein funktionsfähiges 26S Proteasom notwendig ist. Diese essentiellen Untereinheiten sind die 6 AAA ATPasen

und die 3 Proteine, p110, p97 und p54, die den „base“-Subkomplex des RC bilden sowie die 8 Proteine des „lid“-Subkomplexes.

### 5.1.2. Charakterisierung der *Drosophila* RC Untereinheiten

In allen *Drosophila* RC Proteinen wurden dieselben Struktur- und Funktionselemente wie in ihren Homologen aus anderen Organismen gefunden. Abgesehen von diesen Motiven ist überhaupt die hohe Übereinstimmung der *Drosophila* Untereinheiten mit denen aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens* über die gesamte Länge der Sequenzen bemerkenswert. Am ausgeprägtesten sind die Identitäten innerhalb der ATPase-Untereinheiten, die für *D. melanogaster* und *S. cerevisiae* über 64% und für *D. melanogaster* und *Homo sapiens* sogar über 84% betragen. Die *Drosophila* ATPasen zueinander sind hingegen nur im Bereich der ATPase Motive hochkonserviert, während die N-Termini weit geringere Übereinstimmungen aufweisen. Ähnlich den 14 eukaryontischen 20S Untereinheiten, die von 2 gemeinsamen Vorläuferproteinen abgeleitet werden können (Bochtler et al., 1999), dürften die 6 AAA ATPasen gemeinsamen Ursprungs sein. Trotzdem sind die ATPasen nicht redundant, und für das Hefe Proteasom konnte durch Epitop-Markierung mit Hexahistidin gezeigt werden, dass jeder RC alle 6 ATPasen enthält (Glickman et al., 1998a). In einer Reihe von Untersuchungen an Mutanten in Bäcker- und Spalthefe (Übersichtsartikel: Coux et al., 1996; Voges et al., 1999) konnte weiters gezeigt werden, dass die Deletion auch nur einer ATPase letal ist. Die Tatsache, dass jede der ATPasen essentiell ist, bedeutet, dass jeder eine bestimmte Aufgabe im RC zukommt, wofür die unterschiedlichen N-Termini verantwortlich sein könnten. Die Sequenzen der N-Termini weisen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine coiled-coil Sekundärstruktur auf (Lupas et al., 1991), die einerseits für die Bindung unterschiedlicher Substrate (Wang et al., 1996) oder andererseits für die Interaktion der einzelnen ATPasen untereinander verantwortlich sein könnten (Richmond et al., 1997).

Die restlichen beiden Proteine des „base“-Subkomplexes, p110 und p97, sind zueinander homolog und dürften daher von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen (Tsurumi et al., 1996). Außer den KEKE-Motiven (Realini et al., 1994) und kurzen coiled-coil Abschnitten enthalten sie keine weiteren Domänen, die Rückschlüsse auf ihre Struktur oder Funktion zuließen.



**Abb. 34: Sequenzmotive der *Drosophila* „base“-Untereinheiten**

Die AAA Domänen (Confalonieri und Duguet, 1995) wurden mit Hilfe der „Pfam protein families“ Datenbank (Bateman et al., 2000) gefunden. KEKE Motive (Realini et al., 1994) sowie die beiden US Polyubiquitinbindenden Regionen (Haracska und Udvardy, 1997; Fu et al., 1998 und Young et al., 1998) wurden durch Alignierungen mit den homologen Proteinen aus anderen Organismen bestimmt. coiled-coil Domänen wurden nach dem Algorithmus von Lupas et al. (1991) berechnet.

Wie bei *H. sapiens* und *S. cerevisiae* konnte auch in *Drosophila* für die Untereinheiten des „lid“-Komplexes aus der Aminosäuresequenz (ausgenommen p37A, siehe Kap.) keine Verwandtschaft zu bekannten Enzymfamilien abgeleitet werden. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Untereinheiten enzymatisch aktiv sind und bisher unbekannte Mechanismen zum Einsatz kommen. Bestimmte Untereinheiten könnten aber auch für die Lokalisierung des 26S Proteasoms innerhalb der Zelle, andere für die Assemblierung des RC oder die Substratauswahl verantwortlich sein. Für die beiden letzten Funktionen spricht, dass auch einige der „lid“-Untereinheiten mit hoher Wahrscheinlichkeit coiled-coil Domänen besitzen und damit prädestiniert für eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen sind.

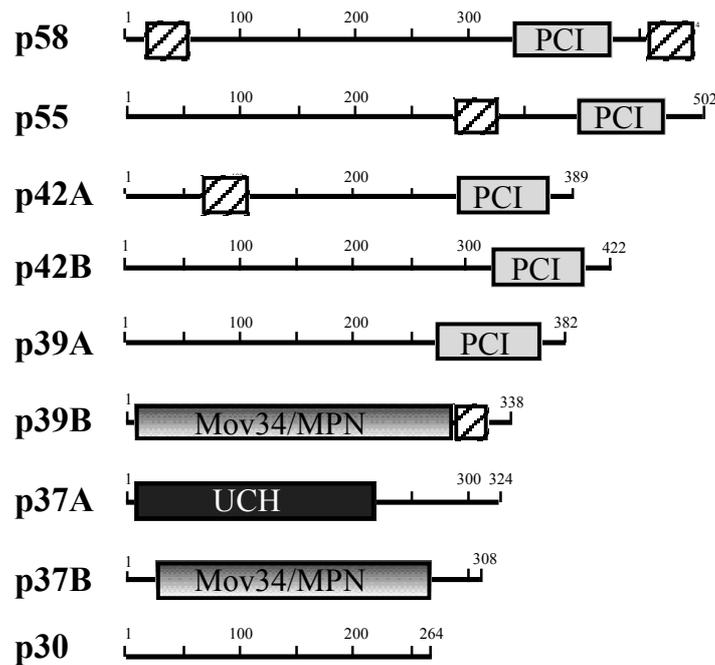


Abb. 35: Sequenzmotive der *Drosophila* „lid“ Untereinheiten

PCI und Mov34/MPN Motive (Hofmann und Bucher, 1998, Aravind und Ponting, 1998), sowie die UCH Domäne (Johnston et al., 1997) wurden mittels der „Pfam protein families“ Datenbank bestimmt. coiled-coil Domänen wurden nach dem Algorithmus von Lupas et al. (1991) berechnet.

5 Proteine des *Drosophila* „lid“, p58, p55, p42A, p42B und p39A, enthalten PCI Motive und 2 Proteine, p39B und p37B, MPN Motive; ansonsten besitzen die Untereinheiten keine Homologien zueinander. Die beiden strukturellen Domänen, PCI und MPN, wurden bis jetzt nur im „lid“-Komplex, im COP9/Signalosom und im eukaryontischen Translations-Initiations-Faktor eIF3 gefunden (Aravind und Ponting, 1998; Hofmann und Bucher, 1998), wobei 5 der „lid“ Untereinheiten, sowie 6 der COP9/Signalosom, aber nur 3 der 10 eIF3-Untereinheiten über PCI Motive verfügen. Alle 3 Komplexe enthalten jeweils 2 Proteine mit MPN Motiven, und sowohl in COP9 als auch in eIF3 weisen diese beiden Proteine darüber hinaus spezifische Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz zu p39B bzw. p37B auf. Wie in *S. cerevisiae* ist *Drosophila* p37B nicht nur die „lid“ Untereinheit mit der größten Ähnlichkeit zu einer COP9/Signalosom Untereinheit, sondern auch jene, deren Sequenz in den „lid“-Komplexen verschiedener Organismen am höchsten konserviert ist (Glickman et al., 1998a; Tab. 5). In keiner der „base“ Untereinheiten wurde eines der beiden Motive gefunden, auch existieren überhaupt keine signifikanten Homologien zwischen „base“ und „lid“ Proteinen; dies deutet darauf hin, dass die beiden Subkomplexe in der Evolution unabhängig voneinander entstanden sind. Der Vergleich mit den prokaryontischen ATP-abhängigen Proteasen der Clp-Familie (Übersichtsartikel: Schmidt et al., 1999) legt den Schluss nahe,

dass auch das eukaryontische Proteasom ursprünglich nur aus dem 20S Kern und den ATPasen aufgebaut war. Erst durch Rekrutierung von p54 und Untereinheiten des „lid“-Komplexes erlangte das 26S Proteasom die Fähigkeit, polyubiquitinierte Substratproteine zu erkennen und vielfältige Möglichkeiten den Proteinabbau zu regulieren.

### 5.1.3. Die Masse des *Drosophila* 26S Proteasoms und seiner Subkomplexe

Die exakte Molekularmasse des 26S Proteasoms war bis jetzt nicht bekannt, ein ungefährender Wert wurde über Gelfiltrationen bzw. Dichtegradientenzentrifugationen ermittelt. Durch Rastertransmissions-Elektronenmikroskopie (STEM) im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmals die Masse von Einzelpartikeln bestimmt. Die Bestimmung ist zugleich eine Überprüfung der Vollständigkeit der Identifizierung der einzelnen Untereinheiten durch 2D Gelelektrophorese. Die theoretisch errechnete Gesamtmasse der einzelnen Proteine des RC von 932 kD korreliert dabei sehr gut mit der durch STEM ermittelten Masse des RC von  $894 \pm 50$  kD. Auch wenn aufgrund der Fehlerabweichung zusätzlich ein bis zwei kleine Untereinheiten existieren könnten, ist dies ein guter Hinweis darauf, dass vermutlich alle Untereinheiten des RC über Gelelektrophorese gefunden wurden.

Vergleicht man die Standardabweichungen der STEM Messung für das 20S Proteasom mit denjenigen für das asymmetrische und symmetrische 26S Proteasom, so fällt auf, dass diese nur im Falle des stabilen, stöchiometrisch definierten 20S Proteasoms dem theoretisch erwarteten Wert entspricht. Für 20S-RC<sub>1</sub> und 20S-RC<sub>2</sub> Partikel hingegen ist die Abweichung deutlich größer als die statistischen Hintergrundschwankungen erwarten lassen. Dies deutet auf ein gewisses Maß an Heterogenität des RC hin, welche ihre Ursache in der strukturellen Labilität des Komplexes haben kann, aber auch seine dynamische Struktur widerspiegeln könnte.

Ähnlich wie bei negativ kontrastierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden bei den STEM Messungen keine freien RC gefunden, allerdings eine beträchtliche Anzahl kleinerer Partikel, die eine sehr breite, asymmetrische Massenverteilung ergaben. Es handelt sich bei diesen Partikeln wahrscheinlich um einen oder beide Subkomplexe („base“ und „lid“) des RC, wobei das Massenmaximum bei 358 kD vielleicht dem „lid“-Komplex entsprechen könnte, da dessen berechnete Masse 391 kD beträgt.

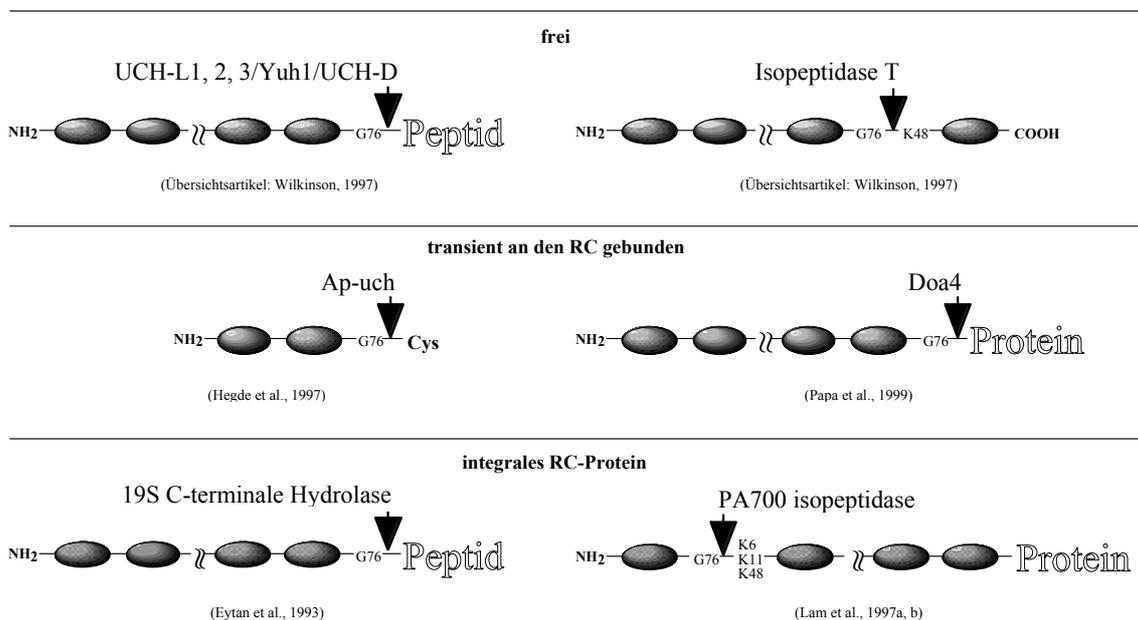
## 5.2. p37A, EIN NEUE RC UNTEREINHEIT

### 5.2.1. Deubiquitinierung, eine Aktivität des RC?

Nach Binden der ubiquitinierten Substratproteine an das 26S Proteasom wird Ubiquitin wieder freigesetzt und kann weitere Proteine für den Abbau markieren. Dieses Recycling von Ubiquitin legt die Annahme nahe, dass der RC deubiquitinierende Enzyme enthält oder rekrutieren kann. Bis jetzt ist aber noch nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt des Abbauweges Ubiquitin vom Substrat entfernt wird. Ein Mechanismus, bei dem Ubiquitin erst nach vollkommener Zerlegung des Substrates in Peptide freigesetzt wird, hätte den Vorteil, dass unvollständig verdautes Protein nicht vorzeitig vom Proteasom abdissoziieren könnte. Diese Abspaltung eines kleinen Peptids, das über eine Lysin-Seitenkette an das Glycin 76 des letzten Ubiquitin der Polyubiquitinkette gebunden ist, ist eine Aktivität, wie sie für eine Vielzahl von Ubiquitin COOH-terminalen Hydrolasen (UCH) beschrieben wurde (Wilkinson, 1997). Für keines dieser Enzyme, außer für Ap-uch, konnte bis jetzt eine Assoziation mit dem 26S Proteasom gefunden werden. Ap-uch, ein 29 kD großes Mitglied der UCH Familie aus *Aplysia californica*, ist Neuronen spezifisch und wird in anderen Geweben nicht exprimiert. Es bindet transient an den RC und ist für den Erwerb und die Aufrechterhaltung des Langzeitgedächtnisses essentiell (Hegde et al., 1997). In *S. cerevisiae* wurde ebenfalls ein deubiquitinierendes Protein, Doa4 (Papa und Hochstrasser, 1993; Papa et al., 1999), charakterisiert, das vorübergehend mit dem 26S Proteasom assoziiert, aber kein integraler Bestandteil des RC zu sein scheint (Glickman et al., 1998a). Doa4 gehört zur zweiten Familie deubiquitinierender Enzyme, den Ubiquitin-spezifisch prozessierenden Proteasen (UBP) und kann sowohl Peptide als auch Proteine von Ubiquitin abspalten, also auch zwischen 2 Ubiquitinen einer Kette schneiden. Es wird vermutet, dass nach Abspalten des Proteinrestes durch Doa4, die freigewordene Polyubiquitinkette durch Ubp14 (dem Hefehomolog der Isopeptidase T aus Säugetieren) in monomere Ubiquitine zerlegt wird (Hochstrasser, 1997).

Als integrale Komponenten des 26S Proteasoms wurden bis jetzt 2 deubiquitinierende Aktivitäten beschrieben, für die aber keine Sequenzinformationen vorhanden sind und die daher auch keiner der beiden Enzymfamilien zugeordnet werden können. In 19S RC aus Kaninchen Reticulocyten wurde eine 30 kD große C-terminale Hydrolase gefunden, die die Isopeptidbindung zwischen Ubiquitin und Lysin-Resten des Substratproteins spaltet (Eytan et al., 1993). Die Spezifität dieser Aktivität ähnelt jener der UCH, allerdings kann die Hydrolyse

anders als bei den UCH nicht durch Ub-A1 inhibiert werden. Lam et al. (1997a, b) charakterisierten eine 37 kD große Isopeptidase-Aktivität in den RC von Rindern, die die Polyubiquitinkette von Substratproteinen beginnend am N-Terminus verkürzt, indem ein Ubiquitin nach dem anderen abgespalten wird. Durch diesen schrittweisen Abbau des Degradationssignals ergibt sich eine weitere Möglichkeit zur Regulation: Beginnt die Verkürzung der Ubiquitinkette sobald das Substratprotein an das 26S gebunden hat, könnte diese bei Proteinen, die über eine zu kurze Kette verfügen, vollständig abgebaut sein bevor das Protein entfaltet ist und dessen Abbau beginnen kann. Diese Isopeptidase-Aktivität bietet daher die Möglichkeit, irrtümliche Markierungen zu korrigieren und Proteine vor dem Abbau zu bewahren.



**Abb. 36: Recycling von Ubiquitin**

Schematische Darstellung der verschiedenen Spezifitäten von deubiquitinierenden Proteinen, die bis jetzt im Zusammenhang mit Ubiquitin-abhängigem Proteinabbau beschrieben wurden.

### 5.2.2. Identifizierung und Charakterisierung von p37A

Im Zuge der Aminosäuresequenzierung der *Drosophila* RC Untereinheiten wurde mit p37A ein Protein gefunden, das aufgrund seiner Sequenz der UCH Familie zugeordnet werden konnte. Mittlerweile wurden sowohl in 26S Proteasomen aus *S. pombe* mit UCH2 (Li et al., 2000) als auch in *H. sapiens* mit UCH37 (Xu W. und Cohen R.E., persönliche Kommunikation) homologe Proteine beschrieben. Zur weiteren Charakterisierung wurde p37A in *E. coli* exprimiert, und wie andere rekombinante UCH hydrolysiert es das

Modellsubstrat Ub-AMC. Die Mutation des Cystein in Position 86 zu Serin führte erwartungsgemäß zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Wie die meisten anderen UCH konnte rekombinantes p37A durch die Zugabe von Ub-A1 *in vitro* vollkommen inhibiert werden, weshalb es sich bei p37A nicht um die von Eytan et al. (1993) beschriebene 30 kD C-terminale Hydrolase handeln kann. Bis jetzt ist noch nichts über die natürlichen Substrate von p37A bekannt, aber der Vergleich mit den Substratspezifitäten anderer UCH legt nahe, dass es Ubiquitin von Peptiden oder kleinen Proteinresten abspaltet (Wilkinson, 1997). Wie jedoch für eine andere UCH aus *Drosophila*, UCH-D, gezeigt werden konnte (Roff et al., 1996), muß die Aktivität nicht unbedingt auf die Hydrolyse kleiner Gruppen beschränkt sein. Bis jetzt wurden noch keine UCH als Komponenten größerer Proteinkomplexe beschrieben, aber es ist durchaus vorstellbar, dass der Einbau in einen Komplex die Substratspezifität von UCH ändert. Erste Resultate von Xu W. und Cohen R.E. (persönliche Kommunikation) zeigen, dass rekombinantes, freies UCH37 die Bindung zwischen einer Ubiquitinkette und einem Peptid hydrolysiert, während UCH37, in den RC eingebaut, für die oben erwähnte schrittweise Verkürzung der Ubiquitinkette vom N-Terminus her verantwortlich ist. Obwohl experimentelle Daten fehlen, kann aufgrund der Homologie davon ausgegangen werden, dass p37A ähnliche Eigenschaften besitzt.

Neben UCH2 aus *S. pombe* und UCH37 aus *H. sapiens* wurden über eine  $\Psi$ -Blast Suche noch weitere homologe Proteine gefunden, die über ihre UCH Domäne hinaus Sequenzähnlichkeiten in ihrem C-terminalen Bereich zu p37A besitzen. Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei UCH37 aus *M. musculus* und *B. taurus* sowie dem Homolog aus *C. elegans* (GenBank # CAA8665) ebenfalls um Untereinheiten des Proteasoms handelt. Auch 2 UCH aus *A. thaliana* weisen über ihre gesamte Länge Homologien zu p37A auf; über die Funktion dieser Proteine in *Arabidopsis* ist bis jetzt noch nichts bekannt. Im *Drosophila* Genom gibt es neben p37A und UCH-D (Zhang et al., 1993) noch zwei weitere UCH, nämlich CG1950 und CG8445. Da auch diese beiden Proteine über C-terminale Bereiche verfügen, die denen als RC Untereinheiten identifizierten UCH ähneln, liegt die Annahme nahe, dass sie ebenfalls integrale Bestandteile des *Drosophila* 26S Proteasoms sein könnten. p37A wurde in 26S Proteasomen gefunden, die aus *Drosophila* Embryonen stammen. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass p37A spezifisch in dieser frühen Phase der *Drosophila* Entwicklung in den RC eingebaut wird, in späteren Entwicklungsstufen möglicherweise eine der beiden anderen UCH. Eine derartige Abhängigkeit der Expression von der Entwicklungsstufe wurde zum Beispiel für UCH-D

beschrieben, das in den ersten 4 Stunden der Embryogenese stark, später mit viel schwächerer Rate exprimiert wird (Zhang et al., 1993).

*S. cerevisiae* besitzt außer Yuh1, mit einer Länge von 236 Aminosäuren, keine weitere UCH, ein Indiz dafür, dass p37A kein essentielles Protein ist; in der Tat besteht für *S. pombe* kein Unterschied in der Lebensfähigkeit von Wildtyp und einer *uch2* Nullmutante (Li et al., 2000). Neben der Funktion, fälschlicherweise ubiquitinierte Proteine vor dem Verdau durch das Proteasom zu bewahren, könnten p37A und seine Homologe auch direkt an der Erkennung der ubiquitinierten Substrate beteiligt sein. Die Deletion von Rpn10 in *S. cerevisiae* ergab keinen ausgeprägten Phänotyp (van Nocker et al., 1996), was darauf hindeutet, dass das Binden von Polyubiquitinketten nicht auf ein einziges Protein im RC beschränkt ist. Mit seiner Fähigkeit über die UCH Domäne Ubiquitin zu binden, ist p37A ein möglicher Kandidat für eine solche Funktion, allerdings nicht der einzige, da p37A ja kein Homolog in Hefe besitzt.

BAP1 aus *H. sapiens* ist ein 81 kD großes Protein, das in seiner N-terminalen Region ebenfalls über eine UCH Domäne verfügt, und für rekombinantes BAP1 konnte deubiquitinierende Aktivität nachgewiesen werden (Jensen et al., 1998). Abgesehen von der UCH Domäne sind die letzten 80 Aminosäuren des C-Terminus, nach einer Lücke von ~400 Aminosäuren, ebenfalls homolog zum C-Terminus von p37A. Diese Region von BAP1, für die eine coiled-coil Domäne vorhergesagt werden kann, bindet an die RING Finger Domäne des „breast/ovarian cancer susceptibility gene product“, BRCA1 (Jensen et al., 1998). Mit einer C-terminalen Deletionsmutante von UCH2 konnte in *S. pombe* gezeigt werden, dass sie im Unterschied zum Wildtyp nicht mehr mit Mts4 (dem *S. pombe* Homolog von p110) koimmunopräzipitiert (Li et al., 2000). Übertragen auf *Drosophila* p37A wäre dies ein Hinweis, dass der C-Terminus für die Assoziation mit dem RC verantwortlich ist. Untersucht man die Sequenzen von p37A und seiner Homologen mittels MacStripe 2.0b1, der Macintosh Version des Computerprogrammes COILS Lupas et al. (1991), auf ihre Wahrscheinlichkeiten an coiled-coils, ergeben sich große Unterschiede. Während sich für UCH37 eindeutig eine C-terminale coiled-coil Region ergibt, ist dies für p37A und UCH2 unter Verwendung einer Fensterweite von 28 Aminosäuren und der MTIDK Matrix nicht möglich. Um diese Frage eindeutig zu klären, ist eine Röntgenstrukturanalyse von p37A erforderlich; erste Kristallisationsversuche wurden bereits unternommen.

Die Kenntnis der Struktur würde auch Rückschlüsse auf mögliche Substrate bzw. Bindungspartner von p37A im Proteasom erlauben. Um darüber Information zu erhalten

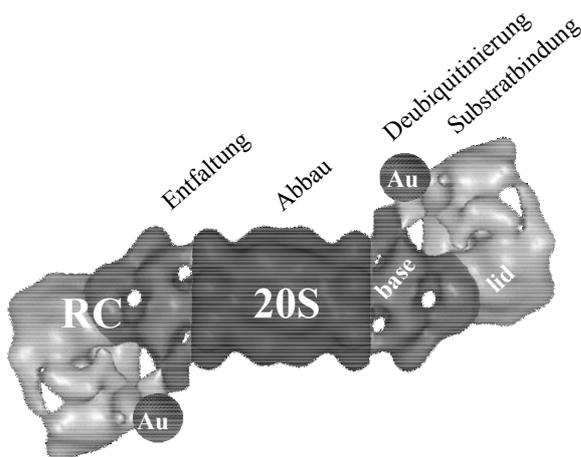
wurde von Li et al. (2001) ein anderer Ansatz gewählt: Durch die Verwendung eines „yeast two hybrid screens“ mit einer cDNA Bibliothek aus HeLa Zellen konnten 2 Proteine, UIP1 und S14, identifiziert werden, die mit UCH37 interagieren, und es konnte gezeigt werden, dass sowohl die UCH Domäne als auch der C-Terminus für diese Interaktion benötigt werden. UIP1 ist ein neues Protein mit keiner signifikanten Homologie zu einem bekannten Gen. Die Wechselwirkung mit der RC Untereinheit S14 hingegen, dem *H. sapiens* Homolog *Drosophila* p30, stellt einen weiteren Schritt zur Klärung der Anordnung der RC Untereinheiten dar.

Ebenso wie für rekombinantes p37A konnte auch für gereinigte *Drosophila* 26S Proteasomen *in vitro* Hydrolyse des Modellsubstrates Ub-AMC gezeigt werden, und es darf davon ausgegangen werden, dass p37A für diese deubiquitinierende Aktivität verantwortlich ist. Ob p37A allerdings das einzige deubiquitinierende Enzym im RC ist, muß noch durch weitere Experimente bestätigt werden. Die Tatsache, dass weder p37A noch seine Homologen essentielle Untereinheiten des RC sind, lässt vermuten, dass auch noch andere Untereinheiten enzymatische Aktivität besitzen. Glickman et al. (1998a) schlagen vor, dass Rpn11, das Hefehomolog von p37B, zur Familie der deubiquitinierenden Enzyme gehört, da es gewisse Ähnlichkeit in seiner Sequenz zu UBP zeigt; für das homologe Enzym in *S. pombe*, Pad1, konnte jedoch keine Aktivität nachgewiesen werden (Penney et al., 1998). Auch konnte in Hefe Proteasomen selbst, nur eine sehr geringe deubiquitinierende Aktivität gemessen werden (Glickman et al., 1998a), was dafür spricht, dass neben p37A keine weiteren deubiquitinierenden Proteine als integrale Bestandteile im RC existieren.

### 5.2.3. Lokalisierung von p37A

Nach der Identifizierung von p37A als eine neue RC Untereinheit konnte seine Lage im RC mittels EM bestimmt werden. p37A ist damit die erste Untereinheit, deren Position direkt ermittelt werden konnte, während alle anderen bis jetzt nur einem der beiden Subkomplexe zugeordnet werden konnten. Für die Lokalisierung von p37A wurde seine deubiquitinierende Aktivität ausgenutzt; mit Ub-A1 steht ein Inhibitor zur Verfügung, der spezifisch und kovalent an das reaktive Zentrum bindet (Johnston et al., 1999). Durch Kopplung von kolloidalen Goldpartikeln an Ub-A1 wurde ein starkes Signal erzeugt, welches sogar ohne Bildverarbeitung auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen klar sichtbar war. Die meisten 26S Proteasomen hatten Goldpartikel an einen ihrer RC gebunden, einige auch an beide RC. Durch Mittelung der Aufnahmen zeigte sich eindeutig, dass das Gold-gekoppelte Ub-A1 im

Bereich der Schnittstelle zwischen „base“ und „lid“ an den RC bindet (Abb. 37). Glickman et al. (1998b) hatten an *S. cerevisiae* 26S Proteasomen gezeigt, dass die Interaktion zwischen „base“ und „lid“ durch Deletion der Untereinheit Rpn10 destabilisiert, jedoch nicht vollkommen unterbunden wird. Dies weist darauf hin, dass neben Rpn10 noch andere Untereinheiten an der Kopplung der beiden Subkomplexe beteiligt sind. Demnach wären p54, das *Drosophila* Homolog von Rpn10, und p37A in enger Nachbarschaft, an der Übergangsregion zwischen den beiden Subkomplexen lokalisiert. Diese Hypothese erfährt eine weitere Bestätigung dadurch, dass für beide Proteine eine Assoziation mit p30 wahrscheinlich ist: Einerseits wurde über einen „yeast two hybrid screen“ für UCH37 eine Interaktion mit S14, dem humanen Homolog von p30, gefunden (Li et al., 2001), andererseits lässt die in Hefe beobachtete Suppression einer temperatursensitiven Mutation von Rpn12 (*Drosophila* p30) durch Überexpression von Rpn10 ebenfalls eine physikalische Assoziation der beiden Proteine vermuten (Kominami et al., 1997). Die sich daraus ergebende räumliche Nähe von Bindung der Polyubiquitinketten durch p54 und Deubiquitinierung durch p37A deutet auf eine enge Verknüpfung der beiden Funktionen hin. Der Abbau eines ubiquitinierten Proteins könnte dergestalt ablaufen, dass in einem ersten Schritt das Protein über seine Ubiquitinkette an den „lid“-Komplex gebunden wird. Während es zur „base“ transferiert wird, um dort durch die ATPasen entfaltet und für die Translokation in das 20S Proteasom vorbereitet zu werden, wird es durch p54 daran gehindert, wieder vom RC abzu dissoziieren; gleichzeitig wird gebundenes Ubiquitin durch p37A freigesetzt.



**Abb. 37: 3D Modell des mit Gold markierten 26S Proteasoms**

Zur Veranschaulichung der Lokalisierung von p37A wurde die aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelte Lage der kolloidalen Goldpartikel auf die von Walz et al. (1998) berechnete dreidimensionale Rekonstruktion des *Drosophila* 26S Proteasoms übertragen.

### 5.3. REINIGUNG DES RC MITTELS EPITOP-MARKIERUNG

Während über die Markierung von Untereinheiten mittels Antikörpern bzw. deren Fab-Fragmenten und anschließender Immunoelektronenmikroskopie die Topographie von 20S Proteasomen geklärt werden konnte (Grziwa *et al.*, 1991; Schauer *et al.*, 1993; Kopp *et al.*, 1997), lieferten ähnliche Experimente mit *Drosophila* 26S Proteasomen keine zufriedenstellenden Ergebnisse. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen waren kaum 26S-Antikörper Immunkomplexe zu sehen, und in vielen Fällen war durch die Antikörper-Bindung die Struktur des RC zerstört oder zumindest verändert. Dies war umso erstaunlicher, da in aufwendigen Vorversuchen (Western-Blot, Immunopräzipitation, Immunofluoreszenz) sowohl die Affinität der Antikörper, als auch die Zugänglichkeit der Epitope im nativen Komplex getestet worden waren.

Ein alternativer Plan sah deshalb vor, einzelne Untereinheiten mit einem Epitop zu fusionieren und anschließend durch Elektronenmikroskopie mit einem Epitop-spezifischen Antikörper zu lokalisieren. Die Wahl fiel auf das 8 Aminosäuren lange, hydrophile FLAG-Epitop (Brizzard *et al.*, 1994), da sich dieses auch für eine Reinigung der Proteasomen über Affinitätschromatographie eignet.

RC Untereinheiten, die entweder an ihrem N- oder C-Terminus mit dem FLAG-Epitop fusioniert worden waren, wurden stabil in S2 Zellen transfiziert. Für die Transfektion wurde das „*Drosophila* Expressions System“ (DEST<sup>TM</sup>, Invitrogen) verwendet, das die Eigenschaft von Schneider S2 Zellen, hunderte Kopien des rekombinanten Plasmids in ihr Genom einzubauen, ausnützt. Dadurch entstehen polyklonale Zellen mit einer hohen Expressionsrate des rekombinanten Proteins, was ein Ausschalten des nativen Gens überflüssig macht. Durch diese Überexpression sollte die fusionierte Untereinheit mit höherer Rate in den RC integriert werden als die native, vorausgesetzt, die 8 Aminosäuren des Epitops verhindern den Einbau nicht. Proteasomen, die mit einem solchen „FLAG-tag“ versehen sind, können nun in einem einzigen Schritt, über Bindung an ein  $\alpha$ -FLAG Affinitätsgel aus transfizierten S2 Zellen gewonnen werden.

Mit den bisher mit einem Epitop versehenen 26S Untereinheiten, darunter 20S und RC Untereinheiten, ließen sich jedoch in keinem Fall intakte 26S Proteasomen, sondern nur 20S Proteasomen oder RC isolieren. Dieses Ergebnis ist für die „base“ Untereinheit p42D (mit einem FLAG-Epitop am N-Terminus) dadurch erklärbar, dass das FLAG-Peptid die Bindung zwischen RC und 20S Proteasom verhindert könnte, nicht jedoch für die 20S Untereinheit  $\beta$ 2

(C-terminales FLAG-Epitop) und die beiden „lid“ Untereinheiten p37A (C-terminales FLAG-Epitop) und p42A (N-terminales FLAG-Epitop): Weder hat  $\beta 2$  direkten Kontakt zum RC noch haben p37A und p42A direkten Kontakt zum 20S Proteasom, daher können also die jeweiligen FLAG-Epitop keine Auswirkung auf die Assoziation der beiden Komplexe haben. Eine Interpretation dieser Befunde wird noch dadurch erschwert, dass der Gehalt an 26S Proteasomen in Schneider S2 Zellen sehr niedrig ist; er liegt unter dem von *Drosophila* Embryonen.

Affinitätsgereinigte RC wurden elektronenmikroskopisch untersucht, wobei jedoch keine einheitlichen Komplexe zu erkennen waren. Obwohl auf SDS Gelen klar das Bandenmuster des RC erkennbar ist und für eine zufriedenstellende Reinigung spricht, scheint die Zusammensetzung der isolierten Komplexe sehr inhomogen zu sein. Die bereits aufgrund der STEM Massenbestimmungen vermutete Heterogenität konventionell gereinigter RC bestätigte sich auch für affinitätsgereinigte Komplexe und verhinderte eine weitere Strukturuntersuchung mittels EM. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen biochemischen und strukturellen Befunden wäre, dass die ohnehin instabilen freien RC durch die Kontrastierung mit Uranylacetat zerfallen.

Die Fusionierung von p37A mit einem C-terminalen FLAG-Epitop und die anschließende Reinigung des RC über Affinitätschromatographie zeigte eindeutig, dass p37A ein integraler Bestandteil des *Drosophila* 26S Proteasoms ist. Neben der vollständigen Identifizierung der *Drosophila* RC Untereinheiten und der Massenbestimmung des Gesamtkomplexes ist die Charakterisierung dieses Proteins sicher das interessanteste Ergebnis dieser Arbeit. Außer den ATPasen, ist p37A bisher das einzige Protein des RC, dem eine enzymatische Funktion zugeschrieben und diese experimentell bestätigt werden konnte. Die bisher nur postulierte deubiquitinierende Aktivität des RC konnte damit nicht nur eindeutig nachgewiesen, sondern auch relativ präzise lokalisiert werden.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, M.D., S.E. Celniker, R.A. Holt, C.A. Evans, J.D. Gocayne et. al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287:2185-2195.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, und D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, und D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Americk, A.Y., S. Swaminathan, B.A. Krantz, K.D. Wilkinson, und M. Hochstrasser. 1997. *In vivo* disassembly of free ubiquitin chains by yeast UBP14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J.* 16:4826-4838.
- Aravind, L., und C.P. Ponting. 1998. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci.* 7:1250-1254.
- Asano, K., T.G. Kinzy, W.C. Merrick, und J.W.B. Hershey. 1997. Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor 3. *J. Biol. Chem.* 272:1101-1109.
- Baker, R.T., J.W. Tobias, und A. Varshavsky. 1992. Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family. *J. Biol. Chem.* 267:23364-23375.
- Bateman, A., E. Birney, R. Durbin, S.R. Eddy, K.L. Howe, und E.L. Sonnhammer. 2000. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 28:263-266.
- Baumeister, W., J. Walz, F. Zühl, und E. Seemüller. 1998. The Proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92:3673-3680.
- Benaroudj, N., und A.L. Goldberg. 2000. PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaebacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nature Cell Biol.* 2:833-839.
- Beyer, A. 1997. Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* 6:2043-2058.
- Bochtler, M., L. Ditzel, M. Groll, C. Hartmann, und R. Huber. 1999. The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28:295-317.

- Brannigan, J.A., G. Dodson, H.J. Duggleby, P.C.E. Moody, J.L. Smith, D.R. Tomchick, and A.G. Murzin. 1995. A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378:416-419.
- Braun, B.C., M. Glickman, R. Kraft, B. Dahlmann, P.M. Kloetzel, D. Finley, and M. Schmidt. 1999. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature Cell Biol.* 1:221-226.
- Brizzard, B.L., R.G. Chubet, and D.L. Vizard. 1994. Immunoaffinity Purification of FLAG<sup>®</sup> epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *BioTechniques* 16:730-735.
- Chamovitz, D.A., N. Wei, M.T. Osterlund, A.G. von Arnim, J.M. Staub, M. Matsui, and X.W. Deng. 1996. The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant development switch. *Cell* 86:115-121.
- Chen, Z., J. Hagler, V.J. Palombella, F. Melandri, D. Scherer, D. Ballard, and T. Maniatis. 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I $\kappa$ -B $\alpha$  to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & Development* 9:1586-1597.
- Cheng, L., N. Roemer, K.A. Smyth, J. Belote, J.R. Nambu, and L.M. Schwartz. 1998. Cloning and characterization of Pros45, the *Drosophila* *SUG1* proteasome subunit homolog. *Mol. Gen. Genet.* 259:13-20.
- Chuang, S.E., V. Burland, G. Plunkett, D.L. Daniels, and F.R. Blattner. 1993. Sequence analysis of four new heat shock genes constituting the hslu and hslv operons in *Escherichia coli*. *Gene* 134:1-6.
- Chu-Ping M., J.H. Vu, R.J. Proske, C.A. Slaughter, and G.N. DeMartino. 1994. Identification, purification and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* 269:3539-3547.
- Coffino, P. 1998. Degradation of ornithine decarboxylase. In *Ubiquitin and the Biology of the Cell*. J.M. Peters, J.R. Harris, and D. Finley, Herausgeber. Plenum Press, New York. 411-428.
- Confalonieri, F., and M. Duguet. 1995. A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays* 17:639-650.
- Coux, O., K. Tanaka, and A.L. Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65:801-847.

- Cuervo, A.M., und J.F. Dice. 1998. Lysomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* 76:6-12.
- Dang, L.C., F.D. Melandri, und R.L. Stein. 1998. Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis of ubiquitin C-terminal 7-amido-4-methylcoumarin by deubiquitinating enzymes. *Biochemistry* 37:1868-1879.
- DeMartino, G.N., C.R. Moomaw, O.P. Zagnitko, R.J. Proske, M. Chu-Ping, S.J. Afendis, J.C. Swaffield, und C.A. Slaughter. 1994. PA700, an ATP-dependent activator of the 20S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J. Biol. Chem.* 269:20878-20884.
- DeMartino, G.N., R.J. Proske, C.R. Moomaw, A.A. Strong, X. Song, H. Hisamatsu, K. Tanaka, und C.A. Slaughter. 1996. Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J. Biol. Chem.* 271:3112-3118.
- Deveraux, Q., V. Ustrell, C. Pickart, und M. Rechsteiner. 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* 269:7059-7061.
- Deveraux, Q., C. Jensen, und M. Rechsteiner. 1995. Molecular cloning and expression of a 26S protease subunit enriched in dileucine repeats. *J. Biol. Chem.* 270:23726-23729.
- Dick, T.P., T. Ruppert, M. Groettrup, P.M. Kloetzel, L. Kuehn, U.H. Koszinowski, S. Stevanovic, H. Schild, und H.G. Rammensee. 1996. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86:253-262.
- Dubiel, W., G. Pratt, K. Ferrell, und M. Rechsteiner. 1992. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* 267:22369-22377.
- Dubiel, W., G. Ferrell, und M. Rechsteiner. 1995. Subunits of the regulatory complex of the 26S proteasome. *Mol. Biol. Rep.* 21:27-34.
- Dunn, W.A. 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell. Biol.* 4:139-143.
- Engel, A., W. Baumeister, und W.O. Saxton. 1982. Mass mapping of a protein complex with the scanning-transmission electron-microscope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4050-4054.
- Eytan, E., T. Armon, H. Heller, S. Beck, und A. Hershko. 1993. Ubiquitin C-terminal hydrolase activity associated with the 26S protease complex. *J. Biol. Chem.* 268:4668-4674.

- Fenteany, G., R.F. Standaert, W.S. Lane, S. Choi, E.J. Corey, und S.L. Schreiber. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268:726-731.
- Ferrell, K., C.R.M. Wilkinson, W. Dubiel und C. Gordon. 2000. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem. Sci.* 25:83-88.
- Finley, D., E. Özkaynak, und A. Varshavsky. 1987. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48:1035-1046.
- Finley, D., K. Tanaka, C. Mann, H. Feldmann, M. Hochstrasser, R. Vierstra, S. Johnston, R. Hampton, J. Haber, J. Mccusker, P. Silver, L. Frontali, P. Thorsness, A. Varshavsky, B. Byers, K. Madura, S.I. Reed, D. Wolf, S. Jentsch, T. Sommer, W. Baumeister, A. Goldberg, V. Fried, D.M. Rubin, und A. Toh-e. 1998. Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle. *Trends Biochem. Sci.* 23:244-245.
- Fu, H., S. Sadis, D.M. Rubin, M. Glickman, S. van Nocker, D. Finley, und R.D. Vierstra. 1998. Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J. Biol. Chem.* 273:1970-1981.
- Fujimuro, M., K. Tanaka, H. Yokosawa, und A. Toh-e. 1998. Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 423:149-154.
- Fujinami, K., N. Tanahashi, K. Tanaka, A. Ichihara, Z. Cejka, W. Baumeister, M. Miyawaki, T. Sato, und H. Nakagawa. 1994. Purification and characterization of the 26 S proteasome from spinach leaves. *J. Biol. Chem.* 269:25905-25910.
- Geier, E., G. Pfeifer, M. Wilm, M. Lucchiari-Hartz, W. Baumeister, K. Eichmann, und G. Niedermann. 1999. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283:978-981.
- Glickman, M.H., D.M. Rubin, V.A. Fried, und D. Finley. 1998a. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 18:3149-3162.
- Glickman, M.H., D.M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V.A. Fried, und D. Finley. 1998b. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94:615-623.
- Glickman, M., 2000. Getting in and out of the proteasome. *Cell Develop. Biol.* 11:149-158.

- Godon, C., G. Lagniel, J. Lee, J.M. Buhler, S. Kieffer, M. Perrot, H. Boucherie, M.B. Toledano, und J. Labarre. 1998. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273:22480-22489.
- Goldstein, G., M. Steed., U. Hammerling, E.A. Boyse, D.H. Schlesinger, und H.D. Niall. 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:11-15.
- Gridley, T., D.A. Gray, T. Orr-Weaver, P. Soriano, D.E. Barton, U. Francke, und R. Jaenisch. 1990. Molecular analysis of the Mov 34 mutation: transcript disrupted by proviral integration in mice is conserved in *Drosophila*. *Development* 109:235-242.
- Grimaud, R., M. Kessel, F. Beuron, A.C. Steven, und M.R. Maurizi. 1998. Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J. Biol. Chem.* 273:12476-12481.
- Groettrup, M., A. Soza, M. Eggers, L. Kuehn, T.P. Dick, H. Schild, H.G. Rammensee, U.H. Koszinowski, und P.M. Kloetzel PM. 1996. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381:166-168.
- Groll, M., L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H.D. Bartunik, und R. Huber. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 angstrom resolution. *Nature* 386: 463-471.
- Grziwa, A., W. Baumeister, B. Dahlmann, und F. Kopp. 1991. Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.* 290:186-190.
- Haas, A.L., und P.M. Bright. 1987. The dynamics of ubiquitin pools within cultured human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262:345-351.
- Haracska, L., und A. Udvardy. 1995. Cloning and sequencing a non-ATPase subunit of the regulatory complex of the *Drosophila* 26S protease. *Eur. J. Biochem.* 231:720-725.
- Haracska, L., und A. Udvardy. 1996. Dissection of the regulator complex of the *Drosophila* 26S protease by limited proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:166-170.
- Haracska, L., und A. Udvardy. 1997. Mapping the ubiquitin-binding domains in the p54 regulatory complex subunit of the *Drosophila* 26S protease. *FEBS Lett.* 412:331-336.
- Hartinger, J., K. Stenius, D. Hogemann, und R. Jahn. 1996. 16-BAC/SDS-PAGE: A two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal. Biochem.* 240:126-133.

- Hegerl, R. 1996. The EM program package: a platform for image processing in biological electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 116:30-34.
- Hegde, A.N., K. Inokuchi, W. Pei, A. Casadio, M. Ghirardi, D.G. Chain, K.C. Martin, E.R. Kandel, und J.H. Schwartz. 1997. Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 89:115-126.
- Henke, W., K. Ferrell, D. Bech-Otschir, M. Seeger, R. Schade, P. Jungblut, M. Naumann, und W. Dubiel. 1999. Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome 'lid'. *Mol. Biol. Rep.* 26:29-34.
- Hershko, A., 1996. Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* 21:445-449.
- Hershko, A., und A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-479.
- Hochstrasser, M. 1997. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Gen.* 30:405-439.
- Hochstrasser, M., und D. Kornitzer. 1998. Ubiquitin-dependent degradation of transcription regulators. In *Ubiquitin and the Biology of the Cell*. J.M. Peters, J.R. Harris, und D. Finley, Herausgeber. Plenum Press, New York. 279-302.
- Hözl, H., B. Kapelari, J. Kellermann, E. Seemüller, M. Sümegi, A. Udvardy, O. Medalia, J. Sperling, S.A. Müller, A. Engel, und W. Baumeister. 2000. The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes: subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *J. Cell Biol.* 150:119-129.
- Hoffman, L., G. Pratt, und M. Rechsteiner. 1992. Multiple forms of the 20S multicatalytic and the 26S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 267:22362-22368.
- Hofmann, K., und P. Bucher. 1998. The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends. Biochem. Sci.* 23:204-205.
- Hori, T., S. Kato, M. Saeki, G.N. DeMartino, C.A. Slaughter, J. Takeuchi, A. Toh-e, und K. Tanaka. 1998. cDNA cloning and functional analysis of p28 (Nas6p) and p40.5 (Nas7p), two novel regulatory subunits of the 26S proteasome. *Gene* 216:113-122.
- Hough, R., G. Pratt, und M. Rechsteiner. 1987. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 262:8303-8313.

- Hoyle, J., und E.M. Fisher. 1996. Genomic organization and mapping of the mouse P26s4 ATPase gene: a member of the remarkably conserved AAA gene family. *Genomics* 31:115-118.
- Jensen, D.E., M. Proctor, S.T. Marquis, H.P. Gardner, S.I. Ha, L.A. Chodosh, A.M. Ishov, N. Tommerup, H. Vissing, Y. Sekido, J. Minna, A. Borodovsky, D.C. Schultz, K.D. Wilkinson, G.G. Maul, N. Barlev, S.L. Berger, G.C. Prendergast, und F.J. Rauscher III. 1998. BAP1 - a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 ring finger and enhances BRCA1-mediated cell-growth suppression. *Oncogene* 16:1097-1112.
- Johnston, S.C., C.N. Larsen, W.J. Cook, K.D. Wilkinson, und C.P. Hill. 1997. Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *EMBO J.* 16:3787-3796.
- Johnston, S.C., S.M. Riddle, R.E. Cohen, und C.P. Hill. 1999. Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *EMBO J.* 18:3877-3887.
- Kapelari, B., D. Bech-Otschir, R. Hegerl, R. Schade, R. Dumdey, und W. Dubiel. 2000. Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J.Mol. Biol.* 300:1169-1178.
- Kim, Y.I., R.E. Burton, B.M. Burton, R.T. Sauer, und T.A. Baker. 2000. Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine. *Mol. Cell* 5:639-648.
- King, R.W., R.J. Deshaies, J.M. Peters, und M.W. Kirschner. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274:1652-1659.
- Kirstensen, P., A.H. Johnsen, W. Uerkvitz, K. Tanaka, und K.B. Hendil. 1994. Human proteasome subunits from 2-dimensional gels identified by partial sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205:1785-1789.
- Kisselev, A.F., T.N. Akopian, K.M. Woo, und A.L. Goldberg. 1999. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. *J. Biol. Chem.* 274:3363-3371.
- Knop, M., H.H. Schiffer, S. Rupp, und D.H. Wolf. 1993. Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:990-996.
- Kominami, K., N. Okura, M. Kawamura, G.N. DeMartino, C.A. Slaughter, N. Shimbara, C.H. Chung, M. Fujimoro, H. Yokosawa, Y. Shimizu, N. Tanahashi, K. Tanaka, und A. Toh-e.

1997. Yeast counterparts of subunits S5a and p58 (S3) of the human 26S proteasome are encoded by two multicopy suppressors of *nin1-1*. *Mol. Cell. Biol.* 8:171-187.
- Kopp, F., K.B. Hendil, B. Dahlmann, P. Kristensen, A. Sobek und W. Uerkevitz. 1997. Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2939-2944.
- Kornitzer, D. und A. Ciechanover. 2000. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell. Physiol.* 182:1-11.
- Lam, Y.A., G.N. DeMartino, C.M. Pickart, und R.E. Cohen. 1997a. Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26S proteasomes. *J. Biol. Chem.* 272:28438-28446.
- Lam, Y.A., W. Xu, G.N. DeMartino, und R.E. Cohen. 1997b. Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature* 385:737-740.
- Lämmlli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-683.
- Larsen, C.N., und D. Finley. 1997. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* 91:431-434.
- Lee, D.H., und A.L. Goldberg 1998. Proteasome inhibitors: Valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8:397-403.
- Li, T., N.I. Naqvi, H. Yang, und T.S. Teo. 2000. Identification of a 26S Proteasome-associated UCH in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272:270-275.
- Li, T., W. Duan, H. Yang, M. Lee, F. Bte Mustafa, B. Lee, und T. Teo. 2001. Identification of two proteins, S14 and UIP1, that interact with UCH37. *FEBS Lett.* 488:201-205.
- Liu, C.C., H.I. Miller, W.J. Kohr, und J.I. Silber. 1989. Purification of a ubiquitin protein peptidase from yeast with efficient in vitro assays. *J. Biol. Chem.* 264: 20331-20338.
- Löwe, J., D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, und R. Huber. 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268:533-539.
- Lupas, A., M. Van Dyke, und J. Stock. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252:1162-1164.
- Lupas, A., J.M. Flanagan, T. Tamura, und W. Baumeister. 1997. Self-compartmentalizing proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22:399-404.

- Mayer, A.N., und K.D. Wilkinson. 1989. Detection, resolution and nomenclature of multiple ubiquitin c-terminal esterases from bovine calf thymus. *Biochemistry* 28:166-172.
- Mounkes, L.C., und M.T. Fuller. 1998. The *DUG* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a structural and functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* *SUG1* predicted ATPase associated with the 26S proteasome. *Gene* 206:165-174.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Traube, und W. Erhardt. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background of nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262.
- Neuwald, A.F., L. Aravind, J.L. Spouge, und V. Koonin. 1999. AAA<sup>+</sup>: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9:27-43.
- Osmulski, P.A., und M. Gaczyncka. 1998. A new large proteolytic complex distinct from the proteasome is present in the cytosol of fission yeast. *Curr. Biol.* 8:1023-1026.
- Özkaynak, E., D. Finley, und A. Varshavsky. 1987. The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.* 6:1429-1439.
- Palombella, V.J., O.J. Rando, A.L. Goldberg, und T. Maniatis. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NFκB1 precursor protein and the activation of NFκB. *Cell* 78:773-785.
- Papa, F.R., und M. Hochstrasser. 1993. The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* 313-319.
- Papa, F.R., A.Y. Amerik, und M. Hochstrasser. 1999. Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell* 10:741-756.
- Patel, S., und M. Latterich. 1998. The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell. Biol.* 8:65-71.
- Penney, M., C. Wilkinson, M. Wallace, J.P. Javerzat, K. Ferrell, M. Seeger, W. Dubiel, S. McKay, R. Allshire, und C. Gordon. 1998. The *pad1(+)* gene encodes a subunit of the 26S proteasome in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 273:23938-23945.
- Pentz, E.S., und T.R. Wright. 1991. *Drosophila melanogaster* diphenol oxidase A2: gene structure and homology with the mouse mast-cell tumor transplantation antigen, P91A. *Gene* 103:239-242.

- Perkins, N.D. 1997. Achieving transcriptional specificity with NF- $\kappa$ B. *Inter. J. Biochem. Cell Biol.* 29:1433-1448.
- Peters, J.M., Z. Cejka, J.R. Harris, J.A. Kleinschmidt, und W. Baumeister. 1993. Structural features of the 26S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* 234:932-937.
- Peters, J.M., J.R. Harris, und J.A. Kleinschmidt. 1994. Distinct 19S und 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 269:932-937.
- Pickart, C.M., und I.A. Rose. 1985. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on Ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J. Biol. Chem.* 260: 7903-7910.
- Plempner, R.K., und D.H. Wolf. 1999. Retrograde protein translocation: Eradication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24:266–270.
- Realini, C., S.W. Rogers, und M. Rechsteiner. 1994. KEKE motifs – proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC Class-I Receptors. *FEBS Letters.* 348:109-113.
- Rechsteiner, M., L. Hoffman, und W. Dubiel. 1993. The multicatalytic and 26 S proteases. *J. Biol. Chem.* 268:6065-6068.
- Rechsteiner, M. 1998. The 26S Proteasome. *In Ubiquitin and the Biology of the Cell.* J.M. Peters, J.R. Harris, und D. Finley, Herausgeber. Plenum Press, New York. 147-189.
- Richmond, C., C. Gorbea, und M. Rechsteiner. 1997. Specific interactions between ATPase subunits of the 26 S protease. *J. Biol. Chem.* 272:13403-13411.
- Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, und A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761-771.
- Rock, K.L., und A.L. Goldberg. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immun.* 17:739-779.
- Roff, M., J. Thompson, M.S. Rodriguez, J.M. Jacque, F. Baleux, F. Arenzana-Seisdedos, und R.T. Hay. 1996. Role of I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination in signal-induced activation of NF $\kappa$ B *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 271:7844-7850.
- Rohrwild, M., G. Pfeifer, U. Santarius, S.A. Müller, H.C. Huang, A. Engel, W. Baumeister, und A.L. Goldberg. 1997. The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat. Struct. Biol.* 4:133-139.

- Rubin, D.M., und D. Finley. 1995. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr. Biol.* 5:854-858.
- Rubin, G.M., L. Hong, M. Brokstein, E. Evans-Holm, E. Friese, M. Stapleton, und D.A. Harvey. 2000. A *Drosophila* complementary DNA resource. *Science.* 287:2222-2224.
- Russell, S.J., U.G. Sathyanarayana, und S.A. Johnston. 1996. Isolation and characterization of SUG2. A novel ATPase family component of the yeast 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* 271:32810-32817.
- Russell, S.J., S.H. Reed, W. Huang, E.C. Friedberg, und S.A. Johnston. 1999a. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol. Cell* 3:687-695.
- Russel, S.J., K.A. Steger, und S.A. Johnston. 1999b. Subcellular localization, stoichiometry and protein levels of 26S proteasome subunits in yeast. *J. Biol. Chem.* 274:21943-21952.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, und T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- Schauer, T.M., M. Nesper, M. Kehl, F. Lottspeich, A. Müller-Taubenberger, G. Gerisch, und W. Baumeister. 1993. Proteasomes from *Dictyostelium discoideum*: Characterization of structure and function. *J. Struct. Biol.* 111:135-147.
- Scheffner, M., S. Smith, und S. Jentsch. 1998. The Ubiquitin-Conjugation System. In Ubiquitin and the Biology of the Cell. J.M. Peters, J.R. Harris, und D. Finley, Herausgeber. Plenum Press, New York. 65-98.
- Schmidt, M., A.N. Lupas, und D. Finley. 1999. Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:584-591.
- Schneider, I. 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. exp. Morph.* 27:353-365.
- Seeger, M., R. Kraft, K. Ferrel, D. Bech-Otschir, R. Dumdey, R. Schade, C. Gordon, M. Naumann, und W. Dubiel. 1998. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to the 26S proteasome subunits. *FASEB J.* 12:469-478.
- Seemüller, E., A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber, und W. Baumeister. 1995. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonin protease. *Science* 268:579-582.
- Shang, F., X. Gong, und A. Taylor. 1997. Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272:23086-23093.

- Silva, C.L., F.C. Portaro, V.L. Bonato, A.C. DeCamargo, und E.S. Ferro. 1999. Thimet oligopeptidase (EC 3.4.24.15), a novel protein on the route of MHC class I antigen presentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:591-595
- Singh, S.K., R. Grimaud, J.R. Hoskins, S. Wickner, und M.R. Maurizi. 2000. Unfolding and internalization of proteins by the ATP-dependent proteases ClpXP and ClpAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:8898-8903.
- Slot, J.W., und H.J. Geuze. 1985. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell. Biol.* 38:87-93.
- Strickland, E., K. Hakala, P.J. Thomas, und G.N. DeMartino. 2000. Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* 275:5565-5572.
- Studier, F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, und J.W. Dubendorf. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185:60-89.
- Tamura, N., F. Lottspeich, W. Baumeister, und T. Tamura. 1998. The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation. *Cell* 95:637-648.
- Tamura, T., I. Nagy, A. Lupas, F. Lottspeich, Z. Cejka, G. Schoofs, K. Tanaka, R. DeMot, und W. Baumeister. 1995. The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr. Biol.* 268:2662-2666.
- Tanaka, K., und C. Tsurumi. 1997. The 26S proteasome: subunits and functions. *Mol. Biol. Rep.* 24:3-11.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, und D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acid. Res.* 25:4876-4882.
- Thrower, J.S., L. Hofman, M. Rechsteiner, und C. Pickart. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19:94-102.
- Tsurumi, C., Y. Shimizu, M. Saeki, S. Kato, G.N. Martino, C.A. Slaughter, M. Fujimori, H. Yokosawa, K.B. Hendil, A. Toh-e, N. Tanahashi, und K. Tanaka. 1996. cDNA cloning and functional analysis of the p97 subunit of the 26S proteasome, a polypeptide identical to the type-1-tumor-necrosis-factor-receptor-associated protein-2/55.11. *Eur. J. Biochem.* 239:912-921.

- Udvardy, A. 1993. Purification and characterization of a multiprotein component of the *Drosophila* 26S (1500 kD) proteolytic complex. *J. Biol. Chem.* 268:9055-9062.
- Van Nocker, S., S. Sadis, D.M. Rubin, M. Glickman, H. Fu, O. Coux, I. Wefes, D. Finley, und R.D. Vierstra. 1996. The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol. Cell. Biol.* 16:6020-6028.
- Varshavsky, A. 1997. The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* 22:383-387.
- Verma, R., Y. Chi, und R.J. Deshaies. 1997. Cell – free ubiquitination of cell cycle regulators in budding yeast extracts. *Meth. Enzym.* 283:366-376.
- Verma, R., S. Chen, R. Feldman, D. Schieltz, J. Yates, J. Dohmen, und R.J. Deshaies. 2000. Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* 11:3425-3439.
- Voges, D., P. Zwickl, und W. Baumeister. 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:1015-1068.
- Vu, P.K., und K.M. Sakamoto. 2000. Ubiquitin-mediated proteolysis and human disease. *Molecular Genetics & Metabolism* 71:261-266.
- Walz, J., A. Erdmann, M. Kania, D. Typke, A.J. Koster, und W. Baumeister. 1998. 26S proteasome structure revealed by 3-dimensional electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 121:19-29.
- Wang, W., P.M. Chevray, und D. Nathans. 1996. Mammalian Sug1 and c-Fos in the nuclear 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:8236-8240.
- Weber-Ban, E.U., B.G. Reid, A.D. Miranker, und A.L. Horwich. 1999. Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* 401:90-93.
- Wilkinson, K.D., M.J. Cox, A.N. Mayer, und T. Frey. 1986. Synthesis and characterization of ubiquitin ethyl-ester, a new substrate for ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Biochemistry* 25:6644-6649.
- Wilkinson, K.D., V.L. Tashayev, L.B. O'Connor, C.N. Larsen, E. Kasperek, und C.M. Pickart. 1995. Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry* 34:14535-14546.

- Wilkinson, K.D. 1997. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* 11:1245-1256.
- Wolf, S., I. Nagy, A. Lupas, G. Pfeifer, Z. Cejka, S.A. Müller, A. Engel, R. De Mot, und W. Baumeister. 1998. Characterization of ARC, a divergent member of the AAA ATPase family from *Rhodococcus erythropolis*. *J. Mol. Biol.* 277:13-25.
- Yoshimura, T., K. Kameyama, T. Takagi, A. Ikai, F. Tokunaga, T. Koide, N. Tanahashi, T. Tamura, Z. Cejka, W. Baumeister, K. Tanaka, und A. Ichihara. 1993. Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J. Struct. Biol.* 111:200-211.
- Young, P., Q. Deveraux, R.E. Beal, C.M. Pickart, und M. Rechsteiner. 1998. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J. Biol. Chem.* 273:5461-5467.
- Zhang, N., K.D. Wilkinson, und M. Bownes. 1993. Cloning and analysis of expression of a ubiquitin carboxyl terminal hydrolase expressed during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 157:214-223.
- Zwickl, P., F. Lottspeich, und W. Baumeister. 1992. Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 312:157-160.
- Zwickl, P., D. Nig, K. Min Woo, H.P. Klenk, und A.L. Goldberg. 1999. An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26S proteasome, activates protein breakdown by 20S proteasomes. *J. Biol. Chem.* 274:26008-26014.
- Zwickl, P., W. Baumeister, und A. Steven. 2000. Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:242-250.
- Zwickl, P., A.L. Goldberg, und W. Baumeister. 2000. Proteasomes in prokaryotes. In *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*. W. Hilt und D.H. Wolf, Herausgeber. Eureka.com, Georgetown. 8-20.

## 7. ABKÜRZUNGEN

2D	zweidimensional
AAA	ATPases associated to a variety of cellular activities
Abb.	Abbildung
AMC	7-Amido-4-methyl-coumarin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ARC	AAA ATPase forming ring-shaped complexes
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
camp	Chloramphenicol
cDNA	complimentary DNA
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
DEAE	Diethylaminethylether
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
DUB	deubiquitinierendes Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequence tag
His <sub>6</sub>	Hexahistidin
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kD	Kilodalton
mA	Milliampere
MD	Megadalton
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex

min	Minute
MPI	Max-Planck-Institut
MSA	multivariate statistcal analysis
NBT	Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure
ODC	Ornithindecaboxylase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAN	proteasome activating nucleotidase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
RC	Regulatorischer Komplex
RNase	Ribonuklease
S	Svedberg-Konstante
SE	Standardfehler
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
STEM	Rastertransmissions-Elektronenmikroskopie
Suc-	Succinyl-
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
U	Unit (Enzymeinheit)
Ub-AMC	Ubiquitin COOH-terminales AMC
Ub-Al	Ubiquitin COOH-terminales Aldehyd
UBP	Ubiquitin-spezifisch prozessierende Protease
UCH	UbiquitinCOOH-terminale Hydrolase
UpM	Umdrehungen pro Minute

Aminosäuren wurden gemäß der IUPAC-IUB *Comission on Biochemocal Nomenclature* im Einbuchstabencode angegeben.



## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchten ich all jenen Leuten herzlich danken, die durch ihre freundliche Unterstützung zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Wolfgang Baumeister danke ich für die Möglichkeit dieses Thema unter optimalen Bedingungen in seiner Abteilung zu bearbeiten sowie für die großzügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Meinen Mitarbeitern aus der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie am MPI für Biochemie, Martinsried, gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Erika Seemüller bedanken, die mir während dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Neben der ständigen Diskussionsbereitschaft und der kritischen Durchsicht des Manuskriptes danke ich ihr vor allem für die gute Atmosphäre und viel Spaß im Labor.

Für die Beantwortung von zahlreichen Fragen und für viele gute Anregungen danke ich Herrn Dr. Peter Zwickl und Herrn Dr. Dieter Voges, sowie Frau Dr. Noriko Tamura und Herrn Dr. Tomohiro Tamura.

Meiner langjährigen Zimmernachbarin Frau Martha-Leticia Santos-Martinez danke ich für ihre immer nette Gesellschaft und die sich daraus ergebende Freundschaft.

Frau Dr. Barbara Kapelari, Frau Ute Santarius und Herrn Günter Pfeifer danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die einen wichtigen Teil dieser Arbeit darstellen.

Herrn Marius Boicu danke ich für die DNA Sequenzierungen und Herrn Dr. Josef Kellermann für die Aminosäuresequenzierungen.

Zentrale Ergebnisse dieser Arbeit wurden erst durch die Zusammenarbeit mit folgenden Personen ermöglicht, bei denen ich mich ebenfalls herzlich bedanken möchte:

Herrn Maté Sümegi und Herrn Dr. Andor Udvardy (Institut für Biochemie, Ungarische Akademie der Wissenschaften, Szeged, Ungarn), Frau Dr. Shirley A. Müller (Maurice E. Müller Institut, Biozentrum, Universität Basel, Schweiz) sowie Herrn Dr. Ohad Medalia (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel).

