

**Das Ump1-Protein,  
ein konservierter Reifungsfaktor  
eukaryotischer Proteasomen**

**Inaugural-Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
**Jörg Höckendorff**  
aus Krefeld

Düsseldorf 2000

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Ubiquitin-System .....	2
1.1.1	E1-Enzyme .....	3
1.1.2	E2-Enzyme .....	3
1.1.3	E3-Enzyme .....	4
1.1.4	Deubiquitinierende Enzyme .....	6
1.2	Abbausignale der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse .....	7
1.3	Weitere Funktionen des Ubiquitin-Systems .....	10
1.4	Das Proteasom .....	11
1.4.1	Das 20S-Proteasom .....	11
1.4.2	Das „Immuno-Proteasom“ .....	13
1.4.3	Das 26S-Proteasom .....	14
1.4.4	Die proteolytischen Aktivitäten des 20S-Proteasoms .....	16
1.4.5	Assemblierung und Reifung des 20S-Proteasoms .....	18
1.5	Zielsetzung .....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1	Chemikalien .....	22
2.2	Medien und Stämme .....	23
2.2.1	Hefestämme .....	23
2.2.2	Medien zur Anzucht von Hefestämmen .....	23
2.2.3	Bakterienstämme .....	24
2.2.4	Medien zur Anzucht von Bakterienstämmen .....	24
2.3	Plasmide .....	25
2.3.1	Bakterienplasmide .....	25
2.3.2	Hefepasmide .....	25
2.3.3	Plasmid-cDNA-Banken .....	26
2.4	Synthetische Oligonukleotide .....	27
2.5	Enzyme .....	28
2.6	Antikörper .....	28
2.7	Verschiedenes .....	28
2.8	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	29
2.9	Präparation von genomischer DNA aus Hefe .....	29
2.9.1	Präparation von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	29
2.9.2	Präparation von genomischer DNA aus <i>K. lactis</i> und <i>S. pombe</i> .....	29
2.10	Transformation .....	30
2.10.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	30
2.10.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	30
2.11	DNA-Restriktion .....	30
2.12	Ligation .....	30
2.13	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel .....	30
2.14	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	31
2.15	Enzymatische Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion .....	31
2.15.1	Generierung von Hybridgenen durch „Assembly“-PCR .....	32
2.15.2	Aufreinigung PCR-amplifizierter DNA-Fragmente .....	32
2.16	Klonierung des 5'-Bereiches des zum <i>PRE2</i> homologen Gens aus <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	33
2.17	Amplifikation neu konstruierter Plasmide .....	33
2.18	Sequenzierung von DNA .....	33
2.19	Spezifischer Nachweis von DNA .....	34
2.19.1	Spezifischer Nachweis von DNA mittels „Southern Blotting“ .....	34
2.19.2	Spezifischer Nachweis von DNA mittels „Kolonie-Hybridisierung“ .....	34
2.20	Spezifischer Nachweis von RNA .....	35
2.21	Markierung von DNA .....	35
2.22	Aufreinigung markierter DNA .....	36
2.23	Mutagenese des <i>UMP1</i> -Gens .....	36
2.23.1	Herstellung eines Vektors zur Generierung einzelsträngiger Plasmid-DNA .....	36
2.23.2	Herstellung einzelsträngiger pJH57-Plasmid-DNA .....	36
2.23.3	Oligonukleotid-vermittelte <i>in vitro</i> Mutagenese des <i>UMP1</i> -Gens .....	37
2.24	Herstellung von Zellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> .....	37
2.25	Herstellung von Zellextrakten aus L-Zellen von <i>Mus musculus</i> .....	37
2.26	Proteinbestimmung nach Bradford .....	38
2.27	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen .....	38
2.28	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse .....	38
2.29	Quantitative Bestimmung der spezifischen $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Hefelysaten .....	39
2.30	Untersuchung der Proteininstabilität durch „Pulse-Chase“-Analyse .....	40
2.30.1	Vorübergehende <i>in vivo</i> Markierung von Protein mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin („Pulse“) .....	40
2.30.2	Quantifizierung des radioaktiv markierten Proteins mittels TCA-Präzipitation .....	40
2.30.3	Immunpräzipitation von $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteinen .....	41

2.31	Immunpräzipitation von proteasomalen Komplexen.....	41
2.32	Fraktionierung von Hefezelleextrakten durch Gelfiltration.....	41
2.32.1	Herstellung von Zellextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für Fraktionierung durch Gelfiltration.....	41
2.33	Messung der spezifischen Peptidase-Aktivität der proteasomalen $\beta$ -Untereinheit Pre2p.....	42
2.34	Aufreinigung des heterolog exprimierten <i>HsUmp1</i> -Proteins .....	42
2.34.1	Generierung des Plasmids zur Expression von 6xHis-Epitop-markiertem <i>HsUmp1</i> -Protein .....	42
2.34.2	Expression von 6xHis-Epitop-markiertem <i>HsUmp1</i> -Protein in <i>E. coli</i> .....	43
2.34.3	Aufreinigung des 6xHis-Epitop-markierten <i>HsUmp1</i> -Proteins durch Affinitätschromatographie.....	43
2.34.4	Aufreinigung des 6xHis-Epitop-markierten <i>HsUmp1</i> -Proteins durch Gel-Elektrophorese und Elektro-Elution .....	44
2.35	Affinitätsreinigung des Anti- <i>HsUmp1</i> -Antikörpers aus Antiserum.....	44
2.36	Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen durch Aufreinigung über Säulenmatrix-gebundenes Protein .....	45
2.36.1	Konstruktion der Plasmide für die Expression von GST-Ump1p-Fusionsprotein sowie proteasomaler $\beta$ -Untereinheiten.....	45
2.36.2	Herstellung von Zellextrakten aus GST-und GST-Ump1-Fusionsprotein-exprimierenden <i>E. coli</i> -Zellen.....	46
2.36.3	Aufreinigung von GST und GST-Ump1-Fusionsproteinen durch Bindung an Glutathion-Sepharose-Matrix .....	46
2.36.4	Herstellung von Hefe-Zellextrakten für die Aufreinigung über matrix-gebundenes GST-Ump1-Fusionsprotein.....	47
2.36.5	Aufreinigung der Hefezelleextrakte über matrixgebundenes GST-Ump1-Fusionsprotein .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1	Charakterisierung der <i>ump1<math>\Delta</math></i> -Mutante .....	48
3.2	Klonierung des <i>UMP1</i> -homologen Gens aus der Hefe <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	54
3.2.1	Heterologe Hybridisierung des <i>UMP1</i> -Gens mit genomischer DNA aus <i>K. lactis</i> .....	54
3.2.2	Herstellung einer partiellen Genbank aus <i>K. lactis</i> .....	55
3.2.3	Isolierung des <i>UMP1</i> -Gens aus <i>K. lactis</i> .....	55
3.3	Identifizierung und Isolierung eines <i>UMP1</i> -homologen Gens aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	56
3.4	Das Ump1-Protein ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert .....	58
3.5	Entfernt verwandte Ump1-Proteine sind funktionell nicht austauschbar .....	61
3.6	Nachweis eines chimären <i>Mm/ScUmp1p</i> in proteasomalen Komplexen .....	65
3.7	„Alanin-Scanning“-Mutagenese des Ump1-Proteins von <i>S. cerevisiae</i> .....	66
3.8	Die „Propeptid-Hypothese“ .....	70
3.9	Untersuchungen zur spezifischen Interaktion von Ump1p und ProPre2p .....	72
3.10	Biochemische Analysen zum Nachweis spezifischer Protein-Protein-Interaktionen des Proteasomenreifungsfaktors Ump1p .....	77
3.11	Untersuchung der $\gamma$ -Interferon-abhängigen Regulation des <i>UMP1</i> -Gens in Säugerzellen .....	81
3.11.1	Analyse der Transkription der <i>UMP1</i> -Gene von Maus und Mensch in Abhängigkeit von INF- $\gamma$ -Stimulierung.....	81
3.11.2	Aufreinigung des menschlichen Ump1-Proteins zur Erzeugung polyklonaler Anti- <i>HsUmp1</i> -Antikörper.....	83
3.11.3	Änderung der intrazellulären Konzentration des Ump1-Proteins in Mauszellen nach einer Stimulierung durch INF- $\gamma$ .....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
4.1	Die <i>ump1<math>\Delta</math></i> -Deletionsmutante .....	88
4.2	Die Homologen des Ump1-Proteins aus verschiedenen Spezies .....	89
4.3	Sind Ump1-Proteine verschiedener Spezies funktionell konserviert?.....	91
4.4	Weitere Ansätze zur Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung des Ump1-Proteins aus <i>S. cerevisiae</i> .....	93
4.5	Vermittelt das Ump1-Protein die Reifung eukaryotischer 20S-Proteasomen über Interaktionen mit den Propeptiden der proteolytischen Untereinheiten?.....	96
4.6	Biochemischer Nachweis der Propeptid-abhängigen Interaktion von $\beta$ -Untereinheiten und Ump1p .....	97
4.7	Funktionelle Bereiche des Ump1-Proteins.....	99
4.8	Existieren in Säugern zwei Typen von Proteasomreifungsfaktoren oder vermittelt das Ump1-Protein auch die Reifung von Immuno-Proteasomen?.....	100
4.9	Ausblick.....	103
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>117</b>

## 1 EINLEITUNG

Die Konzentration eines Proteins in einer lebenden Zelle wird durch seine Synthese- und Abbaurate bestimmt. Im Zuge von Differenzierungsvorgängen oder als Anpassung auf veränderte Umweltbedingungen muß die Konzentration vieler intrazellulärer Proteine neu eingestellt werden. Dies geschieht auf der einen Seite durch Änderungen ihrer Syntheseraten. In den letzten Jahren wurde jedoch ersichtlich, daß auf der anderen Seite die selektive Proteolyse ein wesentlicher Mechanismus vieler regulatorischer Systeme zur Anpassung an zelluläre oder physiologische Bedingungen ist. Indem die Lebensdauer bestimmter regulatorischer Proteine durch selektive Proteolyse niedrig gehalten wird, kann die Zelle die Konzentration solcher Regulatoren durch Veränderungen ihrer Syntheseraten rasch neu einstellen. Beispiele für solche kurzlebige regulatorische Proteine sind den Zellzyklus regulierende Proteine wie Zykline und Proteinkinase-Inhibitoren, Transkriptionsfaktoren, Komponenten Signal-vermittelnder Wege, sowie Proteine, die Zellwachstum und -differenzierung steuern (Hershko und Ciechanover, 1998). Im Unterschied zur Regulation der Aktivität von Proteinen durch Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung ist die Proteolyse ein irreversibler Prozeß, der die Möglichkeit der Reaktivierung ausschließt.

Die selektive Proteolyse ist selbst ein streng kontrollierter und regulierter Mechanismus. Es muß gewährleistet sein, daß zur richtigen Zeit und am richtigen Ort nur solche Proteine abgebaut werden, die für die Proteolyse bestimmt sind. Auch eine zu geringe Effizienz des Abbaus bestimmter Proteine kann für die Zelle fatale Folgen haben. So löst z. B. eine nur geringfügige Zunahme der Konzentration verschiedener, kurzlebiger Onkogenprodukte in vielen eukaryotischen Zellen eine Tumorbildung aus (Okazaki *et al.*, 1992). Über ihre Bedeutung als regulatorisches System hinaus hat die selektive Proteolyse wichtige zellerhaltende Funktionen. So müssen defekte und falsch gefaltete Proteine, wie sie infolge von Mutationen, Hitzeeinwirkung oder oxidativen Schäden entstehen, als solche erkannt und selektiv abgebaut werden. (Finley *et al.*, 1984)

Einen räumlichen Kontrollmechanismus der Proteolyse bietet in Eukaryoten die Zellkompartimentierung. Der Proteinabbau wird hierbei lokal auf ein Kompartiment beschränkt, in das sowohl die proteinabbauenden Enzyme, die Proteasen, als auch die abzubauenen Proteine transportiert werden. Solche Kompartimente stellen membranumhüllte Organellen dar, wie z. B. das Lysosom der Säugerzelle oder die Vakuole der Hefe. Diese sind auf den geregelten Abbau von Zellkomponenten oder Metaboliten spezialisiert. Die Kontrolle der Proteolyse wird hierbei durch selektiven Import von Substratproteinen gewährleistet (Cuervo und Dice, 1998). Unter Hungerbedingungen werden auch große Mengen zytosolischer Proteine, bis hin zu ganzen Organellen durch weniger selektive Autophagozytose in die Vakuole bzw. das Lysosom aufgenommen (Mortimore *et al.*, 1996).

Dort erfolgt dann der Abbau der Proteine durch relativ unspezifische Exo- und Endopeptidasen (Mason, 1996).

Eine andere Form der räumlichen Abgrenzung proteolytischer Aktivität von der Umgebung stellt die sogenannte Selbst- oder Autokompartimentierung dar. In prokaryotischen Zellen, die keine membranumhüllten Kompartimente besitzen, bewerkstelligen selbst-kompartimentierende Proteasen den Großteil des Proteinabbaus. Auch im Zytoplasma, im Zellkern und in Mitochondrien eukaryotischer Zellen sind verschiedene, nicht miteinander verwandte Proteasen und Peptidasen dieses Strukturprinzips beheimatet. Sie sind aus mehreren enzymatisch aktiven Untereinheiten zu zylinderförmigen Komplexen mit inneren Hohlräumen von einigen Nanometern Durchmesser zusammengesetzt. Damit Substratproteine bzw. Substratpeptide durch Eintrittsöffnungen in diese Hohlräume transloziert werden können, müssen sie zunächst spezifisch erkannt und entfaltet werden. Diese Aufgaben übernehmen mit den Proteasen assoziierte Komplexe, welche Untereinheiten mit ATPase-Aktivität beinhalten. Der Proteinabbau durch solche Proteasen ist daher im Gegensatz zur lysosomalen Proteolyse ATP-abhängig (Gottesman *et al.*, 1997; Baumeister *et al.*, 1998; De Mot *et al.*, 1999).

Eine selbstkompartimentierende Protease, die in Prokaryoten sowie im Zellkern und im Zytoplasma von Eukaryoten vorkommt, ist das Proteasom. In eukaryotischen Zellen zeigt sich das Proteasom hauptverantwortlich für den selektiven, nicht lysosomalen Proteinabbau. Hierbei erkennt das Proteasom Substratproteine, die durch ein sekundäres Abbausignal, kovalent angeheftete Ubiquitin-Ketten, gekennzeichnet sind.

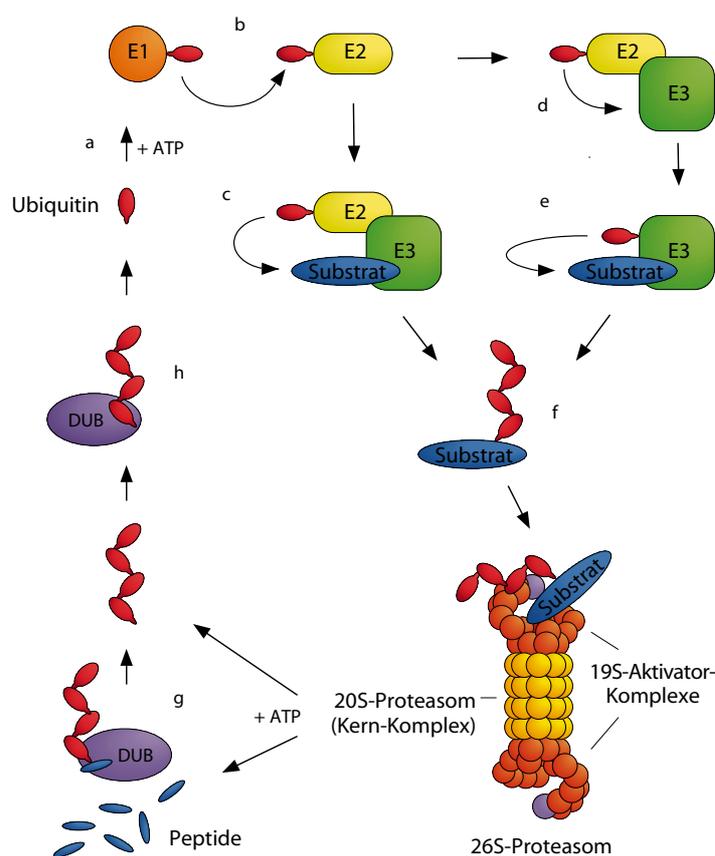
## 1.1 Das Ubiquitin-System

Die selektive Proteolyse vieler kurzlebiger Proteine in eukaryotischen Zellen wird durch das Ubiquitin-System vermittelt. Man bezeichnet sie deshalb auch als Ubiquitin-vermittelte Proteolyse. Die Substratproteine werden dabei durch das Anhängen von Ketten aus mehreren Ubiquitin-Molekülen für den proteasomalen Abbau markiert.

Ubiquitin ist ein Polypeptid von 76 Aminosäuren Länge, das sowohl in seiner Primärstruktur als auch in seiner Tertiärstruktur äußerst stark konserviert ist. So sind beispielsweise die Aminosäuresequenzen des Ubiquitins des Menschen und der Bäckerhefe bis auf drei Aminosäurereste identisch (Ozkaynak *et al.*, 1987). Generell erfolgt die Übertragung des Ubiquitins auf die Zielproteine durch die aufeinanderfolgenden Aktivitäten dreier verschiedener „Enzymtypen“, welche als E1- („Ubiquitin-aktivierende“), E2- („Ubiquitin-konjugierende“) und E3- („Ubiquitin-Protein-ligierende“) Enzyme bezeichnet werden (Abb. 1).

### 1.1.1 E1-Enzyme

Zunächst wird das Ubiquitin vom Ubiquitin-aktivierenden Enzym in einer energieverbrauchenden Reaktion adenyliert, wobei Pyrophosphat aus ATP freigesetzt wird (Haas und Rose, 1982; Hershko und Ciechanover, 1992). Anschließend wird das Ubiquitin am C-terminalen Glycinrest über eine Thioesterbindung mit einem spezifischen Cysteinrest des E1 verknüpft (Abb.1, a). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird ein solches Enzym durch das *UBA1*-Gen (Ubiquitin Aktivierung) codiert. Die Deletion dieses Gens ist letal (McGrath *et al.*, 1991). In Säugerzellen verursachen temperatursensitive Mutationen des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms eine Blockierung der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse bei nicht-permissiver Temperatur (Finley *et al.*, 1984). Dies weist auf die essentielle Funktion dieses E1-Enzyms in der Hefe und in Säugerzellen hin, während in Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und Weizen zwei bzw. drei Isoenzyme identifiziert wurden (Hatfield und Vierstra, 1992; Vierstra, 1993).



**Abb. 1: Das Ubiquitin-System.** Ubiquitin wird durch die aufeinanderfolgenden Aktivitäten von E1-, E2- und E3-Enzymen auf Substratproteine übertragen. E1-(Ubiquitin-aktivierende) Enzyme binden das Ubiquitin unter ATP-Verbrauch über eine Thioesterbindung und geben es in einer Transesterifizierungsreaktion an die E2-(Ubiquitin-konjugierenden) Enzyme weiter (a,b). Ubiquitin wird anschließend unter Mitwirkung der E3-Enzyme (Ubiquitin-Protein-Ligasen) an einen Lysinrest des Substratproteins gebunden. Die E3-Enzyme vermitteln die Ubiquitinierung des Substrats, ohne Ubiquitin selbst kovalent zu binden (c) oder indem sie es selbst zuvor von einem E2-Protein übernommen haben (d,e). Nach Aufbau einer Ubiquitin-Kette (f) werden die polyubiquitinierten Substratproteine vom 19S-Aktivator-Komplex gebunden, in ATP-hydrolysierenden Schritten entfaltet und ins Innere des 20S-Proteasoms transloziert, wo sie zu Peptiden abgebaut werden. Deubiquitinierende Enzyme (DUB) sorgen für eine Rückführung von Ubiquitin aus freien oder substratgebundenen Ubiquitin-Ketten. Dies geschieht während der Proteolyse oder im Anschluß durch Freisetzung von Ubiquitin aus den Abbauprodukten (g,h).

### 1.1.2 E2-Enzyme

Nach der Aktivierung durch das E1-Enzym wird das Ubiquitin von diesem in einer Transesterifizierungsreaktion an die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (Ubc) weitergegeben, wobei es an einen spezifischen Cysteinrest der E2-Enzyme gebunden wird (Abb.1, b). Diese Ubc-Enzyme übertragen Ubiquitin direkt oder über Ubiquitin-Protein-

Ligasen (E3-Enzyme) auf die Substratproteine (Abb. 1, c-e). Die Bindung des Ubiquitins an ein Substrat erfolgt unter Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Akzeptorproteins.

Insgesamt sind mehr als dreißig Gene für E2-Enzyme in verschiedenen Eukaryoten beschrieben worden. Allein in der Bäckerhefe codieren elf miteinander verwandte Gene (*UBC1-UBC8*, *UBC10*, *UBC11* und *UBC13*) für solche Träger-Enzyme (Hochstrasser, 1996; Hershko and Ciechanover, 1998). Die Vielzahl der zur E2-Klasse gehörenden Isoenzyme ermöglicht wahrscheinlich zu einem Teil die Spezifität des Ubiquitin-Systems. So zeigten genetische Studien, daß die verschiedenen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme an einer ganzen Reihe verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt sind. So sind u. a. folgende Funktionen der Ubc-Enzyme aus *S. cerevisiae* bekannt: Ubc2p (Rad6p) ist an der DNA-Reparatur und -Rekombination, der Sporulation, sowie dem Abbau kurzlebiger Proteine nach der „N-end rule“ beteiligt (Jentsch *et al.*, 1987; Dohmen *et al.*, 1991). Das essentielle Ubc3p (Cdc34p) ist an der Kontrolle des Zellzyklus (Abbau von G1-Zyklinen und des Kinase-Inhibitors Sic1p), sowie an der Regulation der Aminosäure-Biosynthese (Abbau von Gcn4p) beteiligt (Kornitzer *et al.*, 1994; Yaglom *et al.*, 1995; Lanker *et al.*, 1996). Ubc4p und Ubc5p steuern den Abbau abnormer Proteine unter normalen Bedingungen und defekter Proteine unter Streßbedingungen (Seufert und Jentsch, 1990; Johnson, 1992; Chen *et al.*, 1993). Oft sind mehrere E2-Enzyme am Abbau bestimmter Proteine beteiligt. So sind z. B. für den Abbau des  $\alpha 2$ -Repressors die Ubc-Enzyme Ubc4p, Ubc5p, Ubc6p und Ubc7p verantwortlich (Chen *et al.*, 1993).

### 1.1.3 E3-Enzyme

Wegen der spezifischen Defekte, die durch Mutationen in *UBC*-Genen verursacht werden, wurde angenommen, daß die E2-Enzyme an der Erkennung von Substratproteinen beteiligt sind. Allerdings konnte bisher nur für wenige E2-Enzyme eine direkte Interaktion mit Substratproteinen nachgewiesen werden. Vielmehr scheint die spezifische Funktion der meisten E2-Enzyme aus der Assoziation mit E3-Enzymen zu resultieren, welche die Substratproteine spezifisch erkennen und binden (Hershko and Ciechanover, 1998). Die Substratspezifität des Ubiquitin-Systems wird daher zum überwiegenden Teil den E3-Enzymen zugeschrieben. Sie stellen eine vergleichsweise heterogene Proteinklasse dar und kommen zum Teil als Multifaktoren-Komplexe vor. Einige dieser Ubiquitin-Protein-Ligasen übernehmen das Ubiquitin selbst von einem E2-Protein unter Ausbildung einer Thioesterbindung, bevor sie es auf das Zielprotein übertragen (Abb. 1, d). Ein solches E3-Enzym ist das in virusinfizierten Säugerzellen am Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 beteiligte E6-AP (E6-assoziiertes Protein). In Zellen, die mit sogenannten „Hochrisiko“-Formen des Papillomavirus infiziert sind, bindet das viruscodierte E6-Onkoprotein sowohl E6-AP als auch p53 und vermittelt quasi als Adaptor die Ubiquitinierung des p53 durch das

E3-Enzym (Scheffner *et al.*, 1993). Das E6-AP bindet das Ubiquitin über einen Cysteinrest in einer konservierten C-terminalen Domäne, die auch in Proteinen anderer Spezies gefunden wurde (Huibregtse *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1995). Man faßt solche Proteine zu der Familie der „Hect-Proteine“ (Homolog zu E6-AP C-Terminus) zusammen, zu denen auch die Ubiquitin-Protein-Ligasen Ufd4p und Rsp5p aus *S. cerevisiae* gehören. Ufd4p ist am Abbau von synthetischen Ubiquitin-Fusionsproteinen beteiligt, während Rsp5p *in vitro* verschiedene Proteine, u. a. die RNA-Polymerase II bindet und ubiquitiniert (Bregman *et al.*, 1995; Huibregtse *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1995).

Andere E3-Proteine, welche vermutlich die Übertragung des Ubiquitins von E2-Enzymen auf Substratproteine vermitteln, ohne Ubiquitin selbst zu binden (Abb. 1, c), sind die im Folgenden beschriebenen.

Das E3-Enzym Ubr1p aus *S. cerevisiae* bewirkt als Komplex mit Ubc2p/Rad6p die Erkennung und Ubiquitinierung von Proteinsubstraten, die gemäß der „N-end rule“ abgebaut werden (siehe unten). Eine analoge Funktion ist für die zum Hefe-Enzym homologe Ubiquitin-Protein-Ligase E3 $\alpha$  in Säugerzellen nachgewiesen worden, die einen Komplex mit dem E2-14kDa-Protein bildet.

Die Kontrolle des Zellteilungszyklus wird in eukaryotischen Zellen durch Zyklin-abhängige Proteinkinasen (Cdks, „cyclin dependent kinase“) gesteuert. Ihre Aktivität wird von der Komplexbildung mit sogenannten Zyklinen bestimmt, welche im Verlauf des Zellzyklus periodisch auftreten. Die Bildung und das Verschwinden verschiedener aktiver Cdk-Komplexe zu unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus wird durch die Synthese und den proteolytischen Abbau spezifischer Zykline als positive Regulatoren sowie von Inhibitoren der Cdks gewährleistet. Der Abbau dieser Regulatoren erfolgt Ubiquitin-vermittelt, wobei je nach Zellzyklus-Phase verschiedene Ubiquitin-Ligasen beteiligt sind (Hochstrasser, 1995; Slingerland und Pagano, 1998). So werden in der Bäckerhefe mitotische B-Typ-Zykline (Clbs) am Ende der Anaphase vom AP-Komplex ubiquitiniert. Der AP-Komplex („Anaphase promoting“), auch Cyclosom genannt, ist eine aus vielen Untereinheiten zusammengesetzte Ubiquitin-Protein-Ligase, die durch variierte Assoziation mit verschiedenen Regulatoren in der Lage ist, verschiedene Substratproteine zu ubiquitinieren (Yu *et al.*, 1996; Peters, 1998). So ist dessen Assoziation mit dem Substrat-spezifischen Aktivator Hct1p essentiell für den Abbau mitotischer Zykline (Zachariae *et al.*, 1998).

Eine weitere multimere Ubiquitin-Ligase ist der SCF-Komplex. Der SCF-Komplex aus *S. cerevisiae* besteht aus Skp1p, Cdc53p und einem sogenannten F-Box-Protein und ist mit dem E2-Enzym Ubc3p/Cdc34p assoziiert. Man vermutet, daß das F-Box-Protein die Bindung des Komplexes an sein Substratprotein vermittelt. Mit dem F-Box-Protein Grr1p bindet und ubiquitiniert der SCF-Komplex (SCF<sup>Grr1p</sup>) die phosphorylierten G1-Zykline Cln1p und Cln2p, welche Ubiquitin-vermittelt abgebaut werden. In Assoziation mit dem F-Box-Protein Cdc4p ist der SCF-Komplex (SCF<sup>Cdc4p</sup>) spezifisch für die Erkennung und Ubiquitinierung des phosphorylierten Sic1-Proteins. Der Abbau des Cdk-Inhibitors Sic1p führt zur Aktivierung

der Zyklin-abhängigen Proteinkinase beim Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Feldman *et al.*, 1997; Skowyra *et al.*, 1997; Skowyra *et al.*, 1999).

Kürzlich konnte eine zinkbindende Ringfingerdomäne als Gemeinsamkeit ansonsten verschiedenartiger E3-Enzyme (Ubr1p, AP- und SCF-Komplex) identifiziert werden. Obwohl die genaue Funktion dieser Domäne noch unbekannt ist, deutet ihr Vorhandensein in so unterschiedlichen Enzymen darauf hin, daß ihr eine wesentliche Bedeutung in der Funktion dieser Ubiquitin-Ligasen zukommt (Tyers und Willems, 1999).

An das erste an ein Substratprotein geheftete Ubiquitin-Molekül können diese Ligasen in Kombination mit E2-Enzymen weitere Ubiquitin-Moleküle unter Ausbildung von Ubiquitin-Ketten anhängen (Abb. 1, f). Für eine effiziente Proteolyse der Substratproteine ist die Ausbildung solcher Ubiquitin-Ketten am Substrat essentiell. In den meisten untersuchten Fällen wird das C-terminale Glycin-76 des Ubiquitins über eine Isopeptidbindung mit dem internen Lysinrest 48 des bereits gebundenen verknüpft, woraus Ubiquitin-Ketten unterschiedlicher Länge resultieren können. Verschiedene Befunde weisen jedoch darauf hin, daß auch Polyubiquitin-Ketten, die über Lysin-6, Lysin-11 oder Lysin-29 verknüpft sind, vom Proteasom erkannt werden (Arnason und Ellison, 1994; Johnson *et al.*, 1995; Baboshina und Haas, 1996).

#### 1.1.4 Deubiquitinierende Enzyme

Die Länge der substratgebundenen Ubiquitin-Ketten ist veränderlich. Es können sowohl zusätzliche Ubiquitin-Moleküle angehängt, als auch Ubiquitin-Einheiten von den Ketten abgespalten werden. Letzteres wird durch sogenannte deubiquitinierende Enzyme (DUB) bewerkstelligt, die auch als Ubiquitin-Carboxyterminale Hydrolasen (UCH) oder Ubiquitin-Isopeptidasen bezeichnet werden. Eine Genfamilie, die für solche Enzyme codiert, wird von den sogenannten *UBP*-Genen („ubiquitin-specific processing proteases“) gebildet. Diese codieren für Cystein-Proteasen, welche als Gemeinsamkeit kurze Konsensussequenzen mit Cystein- bzw. Histidin-Resten („Cystein- bzw. Histidin-Box“) enthalten, die an der Ausbildung der aktiven Zentren beteiligt sind. Durch Sequenzanalyse des Genoms wurden in der Hefe *S. cerevisiae* sechzehn solcher vermutlich für deubiquitinierende Enzyme codierende Gene identifiziert (Hochstrasser, 1996). Diese Ubiquitin-spezifischen Proteasen haben verschiedene Funktionen. Sie gewährleisten die Freisetzung des Ubiquitins aus den Produkten der Ubiquitin-Gene, die für verschiedene Fusionsproteine codieren (Finley und Chau, 1991). Eine regulatorische Funktion im Hinblick auf die Abbaurate von Substratproteinen durch das Proteasom wird für eine Isopeptidase postuliert, die aus Rindererythrozyten isoliert wurde (Lam *et al.*, 1997). Diese ist mit dem regulatorischen 19S-Subkomplex des Proteasoms assoziiert, welcher für die Bindung und Entfaltung von polyubiquitinierten Substratproteinen verantwortlich ist (siehe 1.4). Während ein ubiquitiniertes Substrat an das Proteasom gebunden ist, kann diese Isopeptidase die

Ubiquitin-Ketten so weit verkürzen, daß das Substrat freigesetzt wird, bevor es vom Proteasom abgebaut wird (Lam *et al.*, 1997). Des weiteren spalten Ubps Ubiquitin von Peptiden ab, die während der Proteolyse von polyubiquitinierten Proteinsubstraten durch das Proteasom entstehen und sorgen somit für eine Rückführung von freiem Ubiquitin für das Ubiquitin-System der Zelle (Abb. 1. g; Hochstrasser, 1996). Für das DUB-Enzym Ubp4p aus *S. cerevisiae*, welches auch als Doa4p bezeichnet wird, konnte gezeigt werden, daß dieses mit dem 19S-Komplex assoziiert ist und von Peptidfragmenten der Abbauprodukte kurze Ubiquitinketten am Peptid-proximalen Ende abspaltet (Papa *et al.*, 1999). Eine andere Ubiquitin-Isopeptidase, Ubp14p, kann Ubiquitin-Monomere aus solchen freien Ubiquitin-Ketten vom proximalen Ende her freisetzen (Abb. 1, h; Amerik *et al.*, 1997)

## 1.2 Abbausignale der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse

Allgemein bezeichnet man Eigenschaften von Proteinen, die ihnen metabolische Instabilität verleihen als Abbausignale oder „Degrons“ (Varshavsky, 1991). Es ist davon auszugehen, daß aufgrund der vielen möglichen Kombinationen von E2- und E3-Enzymen untereinander sowie mit zusätzlich assoziierten Faktoren eine Vielzahl von unterschiedlichen Struktureigenschaften von Proteinen erkannt werden können, die zu deren Ubiquitinierung und Abbau führen. Tatsächlich sind aber erst wenige Abbausignale für Ubiquitin-vermittelte Proteolyse identifiziert oder analysiert worden. Eine Ursache hierfür könnte möglicherweise eine Aufspaltung von Abbausignalen in separat lokalisierte Determinanten innerhalb des Proteins sein: eine Bindungsstelle für einen Faktor, der das Substrat spezifisch erkennt und die Bindungsstelle für das Ubiquitin. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß in einem gegebenen Substrat verschiedene Lysinreste als Ubiquitinierungsstellen dienen können (King *et al.*, 1996).

Als erste destabilisierende Eigenschaft wurde der N-terminale Aminosäurerest von bestimmten artifiziellen Substratproteinen entdeckt, der auch als „N-Degron“ bezeichnet wird. Dabei wurden Genfusionen zwischen der für das Ubiquitin codierenden Sequenz und der  $\beta$ -Galaktosidase von *E. coli* hergestellt, wobei das erste Codon des bakteriellen Gens beliebig verändert wurde. Diese Gene wurden in *E. coli*, *S. cerevisiae* und Mauszellen exprimiert. Von den entstehenden Fusionsproteinen wird das N-terminale Ubiquitin cotranslational durch die Ubiquitin-prozessierenden Proteasen abgespalten (Ausnahme Ub-Pro- $\beta$ -Galaktosidase), infolgedessen  $\beta$ -Galaktosidase-Proteine mit den verschiedenen N-terminalen Aminosäuren freigesetzt wurden. Die Halbwertszeit der so erzeugten Proteine hing in *E. coli*, *S. cerevisiae* und Mauszellen *in vivo* (Bachmair *et al.*, 1986; Levy, 1996 #337; Tobias *et al.*, 1991) sowie in Retikulozytenextrakten (Gonda *et al.*, 1989) von ihrem N-ständigen Aminosäurerest ab. Daraufhin konnten die Aminosäurereste in stabilisierende (Halbwertszeiten von 20 oder mehr Stunden) und destabilisierende (Halbwertszeiten von ca. 2-60 min) eingeteilt werden, wobei die Zugehörigkeit der einzelnen Reste zu den beiden

Gruppen in den verschiedenen Organismen variiert. Die Abhängigkeit der *In-vivo*-Halbwertszeit eines Proteins von der Art der N-terminalen Aminosäure wurde als „N-end Rule“ (Amino-Terminus-Regel) bezeichnet (Bachmair *et al.*, 1986). In *S. cerevisiae* sind an der Ubiquitinierung solcher Substrate die Enzyme Uba1p, Ubc2p und Ubr1p (das „N-Recognin“) beteiligt (Bartel *et al.*, 1990; Dohmen *et al.*, 1991; McGrath *et al.*, 1991). Das unprozessierte Fusionsprotein Ubiquitin-Pro- $\beta$ -Galaktosidase wird hingegen über den UFD-Weg („ubiquitin fusion degradation“) abgebaut (Johnson *et al.*, 1995).

Bisher konnten mit Ausnahme einer Replikase des Sindbis-Virus keine natürlichen Substrate mit einem „N-Degron“ gemäß der „N-end Rule“ identifiziert werden (de Groot *et al.*, 1991). Daß diesem Abbausignal keine große physiologische Bedeutung zukommt, könnte zum einen an der Acetylierung der N-terminalen Aminosäure vieler zellulärer Proteine liegen (Brown und Roberts, 1976). Andererseits enthalten Proteine nach ihrer Synthese durch Translation zunächst ein Methionin an ihrem N-Terminus, welches in der Regel nur dann durch Methionin-Aminopeptidasen abgespalten wird, wenn der zweite Aminosäurerest stabilisierenden Charakter hat (Arfin und Bradshaw, 1988; Hirel *et al.*, 1989). Für zwei natürliche Substratproteine aus *S. cerevisiae* konnte hingegen eine Ubiquitinierung über die Enzyme des „N-end rule“-Weges nachgewiesen werden. Dies sind die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins in der Paarungstyp-Signaltransduktionskaskade sowie der Transkriptionsrepressor Cup9p, der an der Regulation des Peptidimports beteiligt ist (Madura und Varshavsky, 1994; Byrd *et al.*, 1998). Diese Substrate tragen jedoch keine nach der „N-end Rule“ destabilisierenden N-terminalen Aminosäuren. Sie werden deshalb vermutlich durch andere interne Abbausignale von Ubr1p für den Abbau erkannt (Hershko and Ciechanover, 1998).

Viele kurzlebige Proteine enthalten Sequenzen, die in besonderem Maße die Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) aufweisen und deshalb auch als „PEST“-Sequenzen bezeichnet wurden (Rogers *et al.*, 1986; Rechsteiner und Rogers, 1996). Damit diese Sequenzen eine Ubiquitinierung und infolge einen Abbau des Proteins nach sich ziehen, müssen in der Nachbarschaft der PEST-Sequenzen geeignete Lysinreste vorkommen. In vielen Fällen stellen PEST-Motive für die Proteolyse von Proteinen notwendige aber nicht hinreichende Signale dar. Die Insertion einer PEST-Sequenz in normalerweise stabile Proteine verursacht nicht zwangsläufig eine Destabilisierung solcher Hybridproteine (Salama *et al.*, 1994). Darüber hinaus kommen solche Sequenzen in Proteinen vor, ohne als Abbausignale zu wirken. Für viele PEST-Sequenzen enthaltende Substratproteine konnte gezeigt werden, daß für ihre Ubiquitinierung bzw. ihren Abbau Phosphorylierungen von Serin- oder Threoninresten in diesen Sequenzen notwendig sind. So führen multiple Phosphorylierungen innerhalb der PEST-Motive der G1-Zykline Cln2p und Cln3p sowie des Transkriptionsaktivators Gcn4p aus *S. cerevisiae* zu deren Ubiquitinvermittelter Proteolyse (Kornitzer *et al.*, 1994; Yaglom *et al.*, 1995; Lanker *et al.*, 1996).

Auch Substratproteine mit anderen Abbausignalen müssen an einzelnen spezifischen Stellen phosphoryliert werden, um vom Ubiquitin-System erkannt zu werden. I $\kappa$ B $\alpha$ , ein Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B („Nuclear Factor  $\kappa$ B“) oder das multifunktionelle  $\beta$ -Catenin, welches an Zell-Zell-Adhäsion, Signal-Transduktion und Transkriptionsregulation beteiligt ist, werden von verschiedenen Signal-induzierten Kinasen an spezifischen Serinresten phosphoryliert und daraufhin ubiquitiniert (Traenckner und Baeuerle, 1995; Chen *et al.*, 1996; Orford *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung durch spezifische Protein-Kinasen scheint daher ein verbreiteter initialisierender Schritt der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse zu sein. Ob die Ubiquitin-Ligasen in solchen Fällen die phosphorylierte Domäne des Substrats erkennen oder eine durch die Phosphorylierung verursachte Veränderung der dreidimensionalen Struktur eine E3-Bindungstelle im Substrat aufdeckt, ist bisher nicht bekannt.

Ein wichtiges Abbausignal mitotischer Zykline ist die sogenannte „Destruction Box“. Sie umfaßt ein konserviertes Motiv aus neun Aminosäureresten, welches 40-50 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt ist (Yamano *et al.*, 1996). Neben diesen Zyklinen werden andere Zell-Zyklus-Regulatoren mit ähnlichen „Destruction Box“-Motiven, wie bestimmte Anaphase-Inhibitoren und Spindelkörper-assoziierte Proteine vom AP-Komplex erkannt und ubiquitiniert (Sudakin *et al.*, 1995; Juang *et al.*, 1997; Hershko and Ciechanover, 1998).

Der kurzlebige Transkriptionsrepressor Mat $\alpha$ 2 aus *S. cerevisiae* besitzt zwei distinkte Abbausignale, die als „Deg1“ und „Deg2“ bezeichnet werden (Hochstrasser und Varshavsky, 1990). Letzteres befindet sich im carboxyterminalen Bereich des Proteins, während Deg1 nach neuesten Erkenntnissen von der hydrophoben Oberfläche einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix gebildet wird, welche 19 Aminosäurereste am N-Terminus umfaßt (Johnson *et al.*, 1998). Untersuchungen zur Charakterisierung des Deg1-Abbausignals führten letztlich zur Beschreibung eines molekularen Mechanismus, der den Abbau des Mat $\alpha$ 2-Repressors reguliert. Die drei verschiedenen Zelltypen der Hefe *S. cerevisiae* umfassen haploide Zellen des Paarungstyps **a** oder  $\alpha$  sowie diploide **a**/ $\alpha$ -Zellen. Der jeweilige Zelltyp wird durch Transkriptionsregulatoren bestimmt, welche von den Genen der sogenannten MAT-Loci codiert werden. Der MAT**a**-Lokus codiert in **a**-Zellen für das Mat**a**1-Protein, der MAT $\alpha$ -Lokus in  $\alpha$ -Zellen für das Mat $\alpha$ 2-Protein. Beide Proteine inhibieren in den jeweiligen haploiden Zellen die Expression der spezifischen Gene für den gegensätzigen Paarungstyp sowie diploid-spezifische Gene. Aufgrund ihrer Kurzlebigkeit können die Transkriptionsregulatoren bei einem spontan auftretenden Paarungstypwechsel der Hefezelle rasch inaktiviert werden. In diploiden **a**/ $\alpha$ -Zellen inhibieren beide Proteine als Heterodimer die Expression haploid-spezifischer Gene, wobei die oben beschriebene amphipathische Helix des Deg1 für diese Dimerisierung entscheidend ist. Das Abbausignal Deg1 des Mat $\alpha$ 2-Proteins überlappt mit seiner für die Interaktion mit Mat**a**1p zuständigen Domäne. Durch diese Maskierung des Abbausignals von Mat $\alpha$ 2p, die auch für das Mat**a**1-Protein postuliert

wird, kommt es zu einer metabolischen Stabilisierung des Heterodimers (Johnson *et al.*, 1998).

Die Funktion von amphipathischen Helices mit hydrophoben Oberflächen als Abbausignal wurde auch für andere Proteine nachgewiesen (Sadis *et al.*, 1995). Es wird daher vermutet, daß solche amphipathischen Bereiche bei Komplex-bildenden Proteinen, die nicht an ihre(n) „Partner“ gebunden sind, als Abbausignale fungieren (Gottesman *et al.*, 1997).

### 1.3 Weitere Funktionen des Ubiquitin-Systems

Neben seiner Beteiligung an der selektiven Proteolyse von zytosolischen und nukleären Proteinen, ist das Ubiquitin/Proteasom-System in den Abbau von falsch gefalteten sekretorischen Proteinen involviert. Diese werden von einem „Qualitätskontroll-System“ im Endoplasmatischen Retikulum (ER) erkannt und zum Teil durch retrograden Transport aus dem ER geschleust. Vermutlich erfolgt schon während dieser Translokation eine Ubiquitinierung der Proteine, an der in der Bäckerhefe Ubc6p und Ubc7p beteiligt sind. Letzteres wird durch eine in der ER-Membran verankerte Komponente des Ubiquitin-Systems, das Cue1-Protein, gebunden (Hiller *et al.*, 1996; Biederer *et al.*, 1997; Plemper und Wolf, 1999).

Die primäre Funktion des Ubiquitin-Systems besteht sicherlich darin, selektiv Proteine für den Abbau zu bestimmen. Es gibt jedoch einige Beispiele, die zeigen, daß das Ubiquitin-System auch an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt ist, die nicht mit der vollständigen Proteolyse der ubiquitinierten Proteine durch das Proteasom einhergehen. So konnte in Säugerzellen für eine inaktive Vorläuferform einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B1 („Nuclear Factor  $\kappa$ B1“) eine kotranslationale Prozessierung durch das Proteasom beobachtet werden. Dabei entsteht aus dem 105 kDa großen Vorläuferprotein durch limitierte Proteolyse des C-terminalen Bereichs das reife 50 kDa große Protein (Lin *et al.*, 1998). Dieses Prozessierungsprodukt dimerisiert mit der Untereinheit p65 zum Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B1, welcher an der Expression verschiedener für die Immunantwort wichtiger Proteine beteiligt ist (Baeuerle und Baltimore, 1989; Baldwin, 1996).

Ein weiterer Prozeß, in den das Ubiquitin-System involviert ist, ist die Endozytose von Plasmamembran-Proteinen. In der Hefe *S. cerevisiae* werden beispielsweise der Rezeptor (Ste2p) des  $\alpha$ -Faktor-Pheromons, der Transporter (Ste6p) des  $\mathbf{a}$ -Faktor-Pheromons, die Uracil-Permease Fur4p sowie der Aminosäure-Transporter Gap1p infolge einer Ubiquitinierung in die Vakuole transportiert und dort abgebaut (Galan *et al.*, 1996; Hicke und Riezman, 1996; Kölling und Losko, 1997; Springael und Andre, 1998). In Säugerzellen wird eine Reihe verschiedener Hormonrezeptoren nach Bindung ihrer Liganden ubiquitiniert. Eine Ubiquitin-abhängige Endozytose konnte aber erst für den GH- („Growth

Hormone“) Rezeptor nachgewiesen werden (Strous *et al.*, 1996; Hicke, 1999). Auch für die meisten untersuchten Membranproteine ist eine Phosphorylierung die Voraussetzung für eine Ubiquitinierung durch Ubiquitin-Protein-Ligasen. Auffallend ist, daß hierbei die Zielproteine nur durch das Anhängen von einzelnen Ubiquitin-Molekülen oder Di-Ubiquitin-Ketten für die Endozytose modifiziert werden (Hicke, 1999).

Die Beteiligung des Ubiquitin/Proteasom-Systems an der Immunantwort in Vertebraten wird an späterer Stelle erläutert.

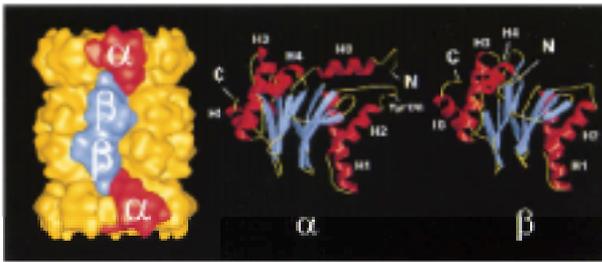
## 1.4 Das Proteasom

Das Proteasom ist eine aus vielen Untereinheiten bestehende selbst-kompartimentierende Protease, die zuerst in Eukaryoten identifiziert wurde. Proteasomen konnten dabei als Partikel mit den Sedimentationskoeffizienten 20S und 26S isoliert werden. Der kleinere Partikel stellt den katalytischen Kern des größeren und wird als 20S-Proteasom bezeichnet. Während das eukaryotische 20S-Proteasom *in vitro* verschiedene Peptidase-Aktivitäten aufweist, ist es nicht in der Lage, ubiquitinierte Proteine abzubauen (Hoffman und Rechsteiner, 1994). Für die Proteolyse ubiquitinerter Proteine bedarf es der komplexeren Struktur des 26S-Proteasoms. Dieses besitzt zusätzlich regulatorische Komponenten, die sogenannten 19S-Kappen oder 19S-Komplexe, welche beidseitig am 20S-Proteasom angelagert sind. Sie ermöglichen die Spezifität und Kontrolle der Proteolyse ubiquitinerter Proteine. 20S-Proteasomen konnten inzwischen in Archaeobakterien und Eubakterien nachgewiesen werden. Dieser einfachere Proteasomentyp scheint einen entwicklungs geschichtlich früheren Ursprung zu haben als das Ubiquitin-System, denn selbst vollständig sequenzierte Bakteriengenome ergaben keinen Hinweis auf ein bakterielles Ubiquitin.

### 1.4.1 Das 20S-Proteasom

Das 20S-Proteasom besitzt eine molekulare Masse von 700-750 kDa und ist aus 28 Untereinheiten von 20 - 35 kDa Größe zusammengesetzt, die in 4 Ringen übereinandergestapelt angeordnet sind (Baumeister *et al.*, 1988). Dieser röhrenförmige Komplex hat einen Durchmesser von ca. 12 nm und eine Länge von ca. 17 nm (Kopp *et al.*, 1986). Studien am 20S-Proteasom des Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* führten zur Aufklärung seiner Struktur und seines proteolytischen Mechanismus. Diese Protease ist nur aus zwei verschiedenen miteinander verwandten Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ , zusammengesetzt, wobei die  $\beta$ -Untereinheiten zwei innere und die  $\alpha$ -Untereinheiten zwei äußere Ringe eines  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Komplexes formen (Abb. 2). Der Komplex bildet eine faßförmige Struktur mit drei größeren Räumen, von denen der mittlere Raum von den  $\beta$ -Untereinheiten umgeben wird und die katalytische Aktivität beinhaltet (Pühler *et al.*, 1992; Zwickl *et al.*, 1992; Löwe *et al.*,

1995). Alle bisher untersuchten 20S-Proteasomen anderer Organismen folgen dem strukturellen Grundaufbau des Proteasoms aus *T. acidophilum*, welches deshalb auch als „Ur-Proteasom“ bezeichnet wird (Zwickl *et al.*, 1992). Die Untereinheiten werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit mit den Untereinheiten des *Thermoplasma*-Proteasoms in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten eingeteilt. Während das 20S-Proteasom des Eubakteriums *Rhodococcus erythropolis* je zwei verschiedene Untereinheiten des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Typs aufweist, besitzen die Proteasomen der Bäckerhefe sowie höherer Eukaryoten je sieben verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Kopp *et al.*, 1993; Tamura *et al.*, 1995; Coux *et al.*, 1996; Groll *et al.*, 1997).



**Abb. 2: *Thermoplasma* 20S-Proteasom.** Modell des 20S-Proteasoms und Tertiärstrukturen der einzelnen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aus *Thermoplasma acidophilum*, abgeleitet aus den Daten der Kristallstrukturanalyse von Löwe *et al.* (1995). Der strukturelle Grundaufbau des 20S-Proteasoms ist bis zu höheren Eukaryoten konserviert. (aus Baumeister *et al.*, 1998)

Von den vierzehn verschiedenen Untereinheiten des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae* sind dreizehn für die Lebensfähigkeit der Zellen essentiell (Heinemeyer *et al.*, 1991; Hilt und Wolf, 1995). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zeigen ähnliche Tertiärstrukturen, wobei sich die in den äußeren Ringen angeordneten, nicht katalytischen  $\alpha$ -Untereinheiten hauptsächlich durch ihre N-terminalen Extensionen von den  $\beta$ -Untereinheiten unterscheiden (Abb. 2). Diese Extensionen bilden wichtige Kontaktstellen zwischen den  $\alpha$ -Untereinheiten (Löwe *et al.*, 1995; Groll *et al.*, 1997). Weil sie im reifen 20S-Proteasom peripher an den  $\alpha$ -Ringern am Eingang zu den äußeren Höhlen lokalisiert sind, vermutet man deren weitere Funktion in der Wechselwirkung mit Komponenten des regulatorischen 19S-Komplexes oder in der Einschleusung der Proteinsubstrate (Baumeister *et al.*, 1998). Im eukaryotischen Proteasom besitzen fünf der sieben verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten Propeptide, welche im Verlauf der Proteasom-Assemblierung abgespalten werden. Bei den drei katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten führt diese Prozessierung jeweils zur Generierung eines N-terminalen Threoninrestes, der als Bestandteil des aktiven Zentrums für die proteolytische Aktivität essentiell ist (Arendt und Hochstrasser, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1997).

In Übereinstimmung mit der höheren Komplexität des eukaryotischen Proteasoms unterscheidet sich die Tertiärstruktur der Untereinheiten von denen des *Thermoplasma*-Proteasoms des weiteren durch verlängerte Schleifen zwischen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Groll *et al.*, 1997). Die meisten dieser zusätzlichen Sequenzinsertionen dienen den Wechselwirkungen der Untereinheiten mit den benachbarten Untereinheiten innerhalb eines Ringes sowie mit denen der benachbarten Ringe. Sie tragen somit vermutlich zu der definierten Topologie der Untereinheiten im Verlauf der Proteasom-Assemblierung bei (Kopp *et al.*, 1997; Schmidt und Kloetzel, 1997).

### 1.4.2 Das „Immuno-Proteasom“

Neben den sieben konstitutiv synthetisierten  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms, die auch als „Housekeeping“ Untereinheiten bezeichnet werden, besitzen Vertebraten drei weitere „fakultative“  $\beta$ -Untereinheiten. Diese werden beispielsweise in viral oder bakteriell infizierten Zellen infolge einer durch das Zytokin  $\gamma$ -Interferon (IFN- $\gamma$ ) induzierten Transkriptionsregulation exprimiert. Von den für diese Untereinheiten codierenden Genen, MECL1, LMP2 und LMP7 sind die letzten beiden im MHC II - („Major Histocompatibility Complex class II“) Cluster lokalisiert. Jede der drei IFN- $\gamma$  induzierbaren Untereinheiten zeigt hohe Sequenzähnlichkeit zu einer der drei katalytisch aktiven, konstitutiven  $\beta$ -Untereinheiten MB1/X,  $\delta$ /Y und Z. Sie werden ebenfalls mit prozessierbaren Propeptiden synthetisiert und infolge der IFN- $\gamma$ -Induktion anstelle ihrer homologen Gegenstücke (LMP7/MB1, LMP2/ $\delta$ , MECL1/Z,) ins 20S-Proteasom eingebaut. Gleichzeitig wird der Einbau der „Housekeeping“ Untereinheiten in 20S-Proteasomen supprimiert, wobei deren Expression nur wenig reduziert ist. Das Zytokin reguliert somit den Assemblierungsprozeß neuer 20S-Proteasomen durch bevorzugten Einbau der IFN- $\gamma$  induzierten Untereinheiten (Akiyama *et al.*, 1994; Früh *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1996; Schmidtke *et al.*, 1996) .

systematische Bezeichnung	Bäckerhefe	Säuger „Housekeeping“-Proteasom	Säuger Immuno-Proteasom
$\beta$ 5	Pre2p	X/MB1	LMP7
$\beta$ 1	Pre3p	Y/ $\delta$	LMP2
$\beta$ 2	Pup1p	Z	MECL1

**Tab.1:** Die proteolytisch aktiven Untereinheiten des 20S-Proteasoms aus der Hefe *S. cerevisiae* sowie der beiden 20S-Proteasomentypen aus Säugern.

Schon vor der Identifizierung der fakultativen Untereinheiten war bekannt, daß das Ubiquitin/Proteasom-System der Säugerzellen eine Rolle bei der Antigen-Präsentation durch MHC-Klasse I-Molekülen spielt (Goldberg und Rock, 1992; Michalek *et al.*, 1993; Rock *et al.*, 1994). Genetische und biochemische Studien konnten schließlich zeigen, daß in Mauszelllinien, denen die Gene LMP2 oder LMP7 fehlen, die Präsentation von bestimmten Antigen-Peptiden an der Zelloberfläche stark reduziert ist. In Zellen, denen LMP7 fehlte, konnten gleichzeitig weniger MHC-Klasse I-Moleküle an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Fehling *et al.*, 1994; Sibille *et al.*, 1995). Dies deutete darauf hin, daß ein zweiter, durch Einbau der IFN- $\gamma$ -induzierbaren Untereinheiten entstehender 20S-Proteasomentyp an der Generierung von Antigen-Peptiden und somit der Immunantwort infizierter Zellen beteiligt ist. Durch eine nachweislich veränderte proteolytische Aktivität (siehe 1.4.4) ist das Immuno-Proteasom vermutlich in der Lage, Abbauprodukte mit erhöhter Affinität zu nachfolgenden Komponenten der Immunantwort zu produzieren (Hershko und Ciechanover, 1998). Solche Antigen-Peptid-bindenden Komponenten könnten entweder

der spezifische Transporter TAP sein, der die Antigen-Peptide ins ER transportiert, oder die ER-Membran gebundenen MHC-Klasse I-Moleküle, welche die Antigen-Peptide zur Zelloberfläche transportieren und den zytotoxischen T-Zellen präsentieren (Rubin und Finley, 1995; Koopmann *et al.*, 1997).

### 1.4.3 Das 26S-Proteasom

In einer ATP-abhängigen Reaktion bindet an die beiden äußeren  $\alpha$ -Ringe des 20S-Proteasoms jeweils ein 19S-Regulator-Komplex, der aufgrund seines Molekulargewichts von ca. 700 kDa auch als PA700-Komplex (Proteasom-Aktivator von 700 kDa) bekannt ist (DeMartino *et al.*, 1994). Diesen trimeren Komplex aus 20S-Proteasom und den 19S-Komplexen bezeichnet man als 26S-Proteasom (Abb. 1). In Übereinstimmung mit ihrer physiologischen Funktion, der Proteolyse ubiquitinerter Proteine, sind 26S-Proteasomen nur in eukaryotischen Organismen identifiziert worden. Allerdings fand man kürzlich ATPase-Komplexe in Archaeobakterien, welche die Proteolyseaktivität von 20S-Proteasomen aus Archaeobakterien und Säugern *in vitro* stimulieren können. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen evolutionären Vorläufer der eukaryotischen 19S-Aktivatorkomplexe (Zwickl *et al.*, 1999).

Die starke Ähnlichkeit der regulatorischen Komplexe der Bäckerhefe und des Menschen in Struktur und Zusammensetzung ihrer Untereinheiten deutet auf ihre konservierte Funktionsweise hin. Sie sind aus fünfzehn bis zwanzig nicht proteolytisch aktiven Untereinheiten mit Molekulargewichten von 25 bis 110 kDa zusammengesetzt (Dubiel *et al.*, 1995). Die Funktionen des 19S-Komplexes liegen in der spezifischen Erkennung und Bindung ubiquitinerter Substratproteine sowie deren Entfaltung und Einschleusung in den Öffnungskanal des 20S-Proteasoms (Dubiel *et al.*, 1995; Coux *et al.*, 1996; Glickman *et al.*, 1998a; Rubin *et al.*, 1998). Für die Erkennung der ubiquitinierten Substrate sind vermutlich mehrere Ubiquitin-Ketten-Rezeptoren zuständig. Als eine solche Untereinheit, die konjugierte Ubiquitin-Ketten bindet, wurden das Mcb1-Protein („Multiubiquitin chain-binding protein“) aus *S. cerevisiae* und seine Homologen aus verschiedenen anderen Eukaryoten identifiziert (Deveraux *et al.*, 1994; Haracska und Udvardy, 1995; van Nocker *et al.*, 1996; Fu *et al.*, 1998).

Von den insgesamt 18 verschiedenen Untereinheiten des 19S-Komplexes der Bäckerhefe lassen sich nach ihrer Sequenz sechs (Rpt1p-Rpt6p) den ATPasen vom Typ der AAA-Proteine („ATPases associated with various cellular activities“) zuordnen (Richmond *et al.*, 1997). Da die Proteolyse ubiquitinerter Proteine von ATP-Hydrolyse abhängig ist, wird diesen ATPasen eine Chaperon-ähnliche Funktion in der Entfaltung und Einschleusung der Substrate zugesprochen (Glickman *et al.*, 1998b; Braun *et al.*, 1999). Die ATPasen bilden einen heteromeren Komplex, der vermutlich eine Ringstruktur einnimmt. Solche oligomeren ATPase-Ringstrukturen sind von Chaperoninen wie GroEL aus *E. coli* und dem

eukaryotischen Cct, sowie als Bestandteil verschiedener ATPase-abhängiger Proteasen in Prokaryoten bekannt (Ditzel *et al.*, 1997; Fenton und Horwich, 1997; Gottesman *et al.*, 1997). Studien am Proteasom von *S. cerevisiae* zeigten, daß die ATPasen zum sogenannten „Basiskomplex“ des 19S-Partikels gehören, der direkt an das 20S-Proteasom bindet und die drei nicht ATPase-Untereinheiten Rpn1p/Nas1p, Rpn2p/Sen3p und Rpn10p/Mcb1p beinhaltet (Glickman *et al.*, 1999). Da dieser Basiskomplex allein das 20S-Proteasom zum Abbau von Proteinen aktivieren kann, wird eine weitere Funktion der ATPasen in der Öffnung der Kanalpore zum inneren Kanal des 20S-Proteasoms vermutet, welcher im isoliert vorliegenden Proteasom durch die N-terminalen Extensionen der Untereinheiten verschlossen ist (Groll *et al.*, 1997; Rubin *et al.*, 1998). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, daß die Bindung von 19S-Komplexen an das 20S-Proteasom strukturelle Veränderungen im katalytischen Kernkomplex bewirkt, wodurch die beidseitige Einschleusung der Substratproteine in die inneren Höhlen ermöglicht wird. Die Funktion der anderen Untereinheiten des regulatorischen Komplexes ist noch unklar. Sie könnten an der spezifischen Bindung von Substraten oder löslichen Kofaktoren beteiligt sein oder als Gerüstbausteine zur Aufrechterhaltung der Konstruktion des 19S-Komplexes dienen (Glickmann *et al.*, 1998).

Nach einer Modellvorstellung wird ein ubiquitiniertes Protein folgendermaßen vom 26S-Proteasom abgebaut. Nach Bindung der Polyubiquitin-Kette an den Regulator-Komplex wird es durch dessen ATPasen entfaltet und ins Innere des Kernkomplexes geschleust. In der inneren zentralen Kammer wird es durch die proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten zu Peptiden hydrolysiert. Dieser Vorgang geht mit der Abspaltung und Regenerierung des Ubiquitins durch Proteasom-assoziierte Isopeptidasen einher (Baumeister *et al.*, 1998).

Eine Rolle für die physiologische Funktion des Proteasoms bei der Herstellung von Peptid-Antigenen spielt vermutlich ein spezieller Aktivator-Komplex, der als PA28- oder 11S-Komplex bezeichnet wird. Dieser besteht aus zwei IFN- $\gamma$ -induzierbaren Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , welche in einem vermutlich heterohexameren Ring angeordnet sind. Der PA28-Aktivator-Komplex bindet wie der 19S-Komplex an die beiden äußeren  $\beta$ -Ringe des 20S-Proteasoms und kann die katalytische Aktivität des Proteasoms zugunsten einer effizienteren Produktion von Antigen-Peptiden modulieren (Gray *et al.*, 1994; Dick *et al.*, 1996; Groettrup *et al.*, 1996). *In-vitro*-Studien zeigten, daß bestimmte Peptide von 20S-Proteasomen in Abwesenheit des PA28-Komplexes einmal, in seiner Anwesenheit jedoch zweimal gespalten wurden. Letzteres führte zur verstärkten Generierung von Peptiden mit einer Länge von acht bis neun Aminosäuren (Dick *et al.*, 1996; Shimbara *et al.*, 1997). Man vermutet daher, daß das Proteasom durch Assoziation mit dem PA28-Komplex Konformationsänderungen erfährt, die dem Proteasom zweifache Spaltung von Antigen-Peptiden ermöglichen. Dies führt dann zur effizienteren Generierung von MHC-Klasse-I-Molekül-Epitopen oder ihrem Transport ins ER (Kloetzel *et al.*, 1999). Der PA28-Komplex aktiviert und moduliert die Peptidhydrolyse des 20S-Proteasoms, kann

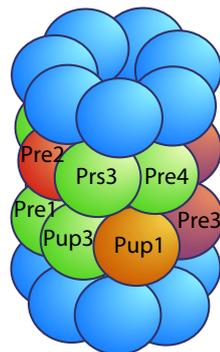
dieses aber *in vitro* nicht zur Proteolyse von gefalteten, intakten Proteinen aktivieren. Es wird daher postuliert, daß es *in vivo* (in Assoziation mit dem 20S-Komplex) an der Peptidhydrolyse von Abbauprodukten des 26S-Proteasoms beteiligt ist oder als Adaptor für bestimmte Chaperone dient. Solche Chaperon/PA28/20S-Komplexe könnten dann in der Lage sein, z. B. ein ubiquitiniertes virales Protein bis zur Stufe antigener Peptide abzubauen (Dubiel *et al.*, 1992; Bochtler *et al.*, 1999). Die Verbindung zwischen dem PA28-Komplex und dem Ubiquitin-System könnte durch die jüngsten Beobachtungen erklärt werden, daß nach  $\text{INF}\gamma$ -Stimulierung von Säugerzellen 20S- (Immuno-) Proteasomen, PA28 und der 19S-Regulator trimere Komplexe bilden (Tanahashi *et al.*, 2000; Hendil *et al.*, 1998), welche möglicherweise alle erforderlichen Eigenschaften für eine effiziente Antigen-Prozessierung in sich vereinen.

#### 1.4.4 Die proteolytischen Aktivitäten des 20S-Proteasoms

Die proteolytisch aktiven Untereinheiten des 20S-Proteasoms werden als inaktive Vorläufer mit N-terminalen Propeptiden synthetisiert. Die Abspaltung dieser Propeptide erfolgt vermutlich cis-autokatalytisch und führt zur Generierung der reifen, aktiven Untereinheiten mit N-terminalem Threonin. Dabei dient eine konservierte Konsensussequenz als Spaltungsstelle, die durch die Aminosäurereste Gly-1 und Thr+1 charakterisiert ist (Zwickl *et al.*, 1994; Chen und Hochstrasser, 1996; Schmidtke *et al.*, 1996). Aus Kristallstrukturanalysen des Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* in Gegenwart des Calpain-Inhibitors I, sowie aus Untersuchungen mit mutierten Versionen des Proteasoms wurde geschlossen, daß das katalytische Zentrum aus einer für Proteasen bislang unbekanntem katalytischen Tetrade gebildet wird. Sie besteht aus der freien N-terminalen Aminogruppe und den Seitenketten der Aminosäuren Thr1, Lys33 und Glu17 (in Eukaryoten Asp17), welche über alle aktiven  $\beta$ -Untereinheiten verschiedener Organismen konserviert sind. Das für die proteolytische Aktivität essentielle Thr1 spielt dabei die zentrale Rolle, indem es mit seiner Hydroxylgruppe den nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung ausführt (Fenteany *et al.*, 1995; Löwe *et al.*, 1995; Seemüller *et al.*, 1995; Ditzel *et al.*, 1998; Arendt und Hochstrasser, 1999). Aufgrund dieser Eigenschaften werden die aktiven Untereinheiten des 20S-Proteasoms den sogenannten Ntn (N-terminal nucleophile)-Hydrolasen zugeordnet und das 20S-Proteasom als Threonin-Protease bezeichnet (Brannigan *et al.*, 1995; Seemüller *et al.*, 1995).

Das Proteasom von *T. acidophilum* besitzt 14 identische proteolytisch aktive  $\beta$ -Untereinheiten, welche in erster Linie die Spaltung von Substratpeptiden hinter hydrophoben Aminosäureresten katalysieren. Neben dieser Aktivität, die als Chymotrypsin (Ch)-ähnliche bezeichnet wird, besitzen eukaryotische 20S-Proteasomen zwei weitere Aktivitäten: die Trypsin (T)-ähnliche Aktivität zeichnet sich durch Spaltung hinter basischen Resten aus, während die Peptidylglutamyl-Peptid-hydrolysierende (PGPH)-Aktivität Spaltung hinter sauren Aminosäureresten bewirkt (Rivett, 1989; Orłowski, 1990).

Deshalb bezeichnet man das eukaryotische Proteasom auch als multikatalytische Protease. Mit Hilfe von Mutationsanalysen und der Verwendung von synthetischen, fluoreszierenden Substratpeptiden konnten die proteolytischen Aktivitäten spezifiziert und den drei verschiedenen aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des Proteasoms von *S. cerevisiae* zugeordnet werden. Pre2p ist für die Ch-ähnliche Aktivität verantwortlich, Pup1p für die T-ähnliche und Pre3p besitzt die PGPH-Aktivität (Heinemeyer *et al.*, 1993; Enenkel *et al.*, 1994; Arendt and Hochstrasser, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1997).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae*.**

Die Untereinheiten der  $\alpha$ -Ringe sind blau, die proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten orange, rot bzw. violett, und die übrigen  $\beta$ -Untereinheiten grün dargestellt. Die Topologie der Untereinheiten ist definiert und bis zu höheren Eukaryoten konserviert.

$\beta$ -Untereinheit	Prosequenzen mit Prozessierungsstellen		Peptidase-	Spaltung
Bäckerhefe	Position: -1 +1		aktivität	hinter
Pre2p	. . . ASPQQFLRAHTDDSRNPDCKIKIAHG	<b>TTTLAF</b> . . .	Chymotrypsin-ähnliche Aktivität	hydrophoben Aminosäuren
Pre3p	MNGIQVDINRLKKGEVSLG	<b>TSIMAV</b> . . .	Peptidylglutamyl-Peptid-hydrolysierende Aktivität	sauren Aminosäuren
Pup1p	MAGLSFDNYQRNNFLAENSHTQPKATSTG	<b>TTIVGV</b> . . .	Trypsin-ähnliche Aktivität	basischen Aminosäuren

**Tab. 2: Eigenschaften der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms von *S. cerevisiae*.**

Die dazu homologen Untereinheiten aus Säugern werden mit MB1 (oder X),  $\delta$  (oder Y) und Z bezeichnet (vgl. Tab. 1 in 1.4.2). Studien mit spezifischen Proteasomen-Inhibitoren in Säugern bzw. mit gezielt erzeugten Mutationen in der Bäckerhefe, die zur Inaktivierung der einzelnen Untereinheiten führen, deuten darauf hin, daß die Ch-ähnliche Aktivität die Proteolyse-limitierende Aktivität darstellt (Jäger *et al.*, 1999).

Da die Tertiärstruktur der katalytischen Zentren der Untereinheiten konserviert ist, wird vermutet, daß die Spezifität der Substratspaltung der verschiedenen Untereinheiten durch Aminosäurereste bestimmt wird, die an der Bindung der Substratproteine beteiligt sind. Der Aminosäurerest 45, welcher an der Unterseite der Substratbindungstasche lokalisiert ist, wird als Kandidat für die Bestimmung der Spaltungsspezifität postuliert (Schmidt and Kloetzel, 1997). Verschiedene Untersuchungen deuten des weiteren darauf hin, daß für die Ausbildung der katalytischen Zentren neben der autokatalytischen Prozessierung der Propeptide, bestimmte Interaktionen mit benachbarten  $\beta$ -Untereinheiten desselben sowie des gegenüberliegenden  $\beta$ -Rings notwendig sind. Dies erklärt, warum nie

proteolytische Aktivität von isolierten katalytischen  $\beta$ -Untereinheiten nachgewiesen wurde. Die den katalytischen Untereinheiten benachbarten Komponenten könnten zudem die Spaltungsspezifität der einzelnen aktiven Untereinheiten beeinflussen (Chen und Hochstrasser, 1996; Heinemeyer *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen und andere Studien führten zu der Annahme, daß die proteolytischen Untereinheiten nicht unabhängig voneinander agieren, sondern die Substratproteolyse in einem geordneten Prozeß abläuft. Nach einer Modellvorstellung verläuft die Proteolyse eines Substrates in Zyklen unter Aktivierung und Inaktivierung des katalytischen Zentrums der Ch-ähnlichen Aktivität. Danach wird postuliert, daß in jedem Zyklus die Ch-ähnliche Aktivität die Abspaltung von Fragmenten des eingeführten Substrates bewirkt, welche von den anderen aktiven Untereinheiten weiter zu Oligopeptiden gespalten werden, bis sie klein genug sind, um aus dem Innern des Proteasoms zu gelangen (Kisselev *et al.*, 1999; Rock und Goldberg, 1999).

Immuno-Proteasomen (siehe 1.4.2) besitzen bezüglich ihrer proteolytischen Aktivitäten veränderte Eigenschaften. Verschiedene biochemische Untersuchungen mit aufgereinigten 20S- und 26S-Proteasomen aus IFN- $\gamma$  induzierten Zellen zeigten, daß bestimmte fluoreszierende Substratpeptide schneller nach hydrophoben und basischen Aminosäureresten gespalten werden als in Kontrollexperimenten mit normalen („Housekeeping“-) Proteasomen. Gleichzeitig war die maximale Kapazität der Spaltung nach sauren Resten reduziert (Driscoll *et al.*, 1993; Gaczynska *et al.*, 1993; Aki *et al.*, 1994).

Zwar konnte nachgewiesen werden, daß die veränderte Spezifität der Proteasomen bezüglich der Spaltung von Substratpeptiden durch den Einbau von IFN- $\gamma$  induzierbaren Untereinheiten verursacht wird. Welche strukturellen Eigenschaften der induzierbaren katalytischen Untereinheiten diese biochemischen Effekte bewirken, ist hingegen noch unklar. Des weiteren bleibt die immunologische Bedeutung der veränderten proteolytischen Aktivitäten des Immuno-Proteasoms zu klären. Zahlreiche Untersuchungen weisen darauf hin, daß die meisten von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Antigenpeptide hydrophobe oder basische Aminosäurereste am C-Terminus besitzen, welche durch Proteasomen generiert worden sind. Es können aber auch viele untersuchten Antigene durch Proteasomen-unabhängige Mechanismen effizient präsentiert werden (Beninga *et al.*, 1998; Rock and Goldberg, 1999).

#### **1.4.5 Assemblierung und Reifung des 20S-Proteasoms**

Die Assemblierung und Reifung eukaryotischer 20S-Proteasomen ist ein komplizierter Prozeß, der die Abfolge von präzise geordneten Einzelschritten erfordert. Erste Hinweise zur Aufklärung des initiierenden Schritts, der Assoziation der Untereinheiten, wurden durch *In-vitro*-Studien am einfacher konstruierten Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* erlangt. So konnte gezeigt werden, daß dessen isolierte  $\alpha$ -Untereinheiten spontan zu heptameren Ringen assemblieren, während die  $\beta$ -Untereinheiten allein, mit oder ohne

Propeptid, nicht dazu befähigt sind (Zwickl *et al.*, 1994). Man folgerte daraus, daß die Information der Siebenfach-Symmetrie sowie die Kapazität zur Ringbildung in den  $\alpha$ -Untereinheiten lokalisiert ist. Die Vermutung, daß somit während der 20S-Komplex-Assemblierung zunächst  $\alpha$ -Ringe gebildet werden, an die sich anschließend die  $\beta$ -Untereinheiten anlagern, wurde durch die Isolierung bestimmter Assemblierungs-intermediate bestärkt. In Säugern bestehen solche 13S-Vorläuferkomplexe aus einem kompletten Satz  $\alpha$ -Untereinheiten und drei benachbarten unprozessierten  $\beta$ -Untereinheiten (Nandi *et al.*, 1997). Einige Untersuchungen deuten darauf hin, daß der Einbau eukaryotischer  $\beta$ -Untereinheiten in einem Prozeß mit definierter Reihenfolge und Positionierung abläuft, für den spezifische Interaktionen zwischen benachbarten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten erforderlich sind (Kopp *et al.*, 1995; Gerards *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 1997; Schmidt and Kloetzel, 1997). So führt der spätere Einbau bestimmter  $\beta$ -Untereinheiten in den 13S-Komplex schließlich zur Vervollständigung des  $\beta$ -Rings. Dadurch entstehen sogenannte Halbproteasomen, welche als Vorläuferpartikel mit Sedimentationskoeffizienten von 15S bis 16S isoliert werden können. Diese beinhalten alle vierzehn Untereinheiten des 20S-Proteasoms, wobei die  $\beta$ -Untereinheiten noch überwiegend in unprozessierter Form vorliegen, ein als Reifungsfaktor identifiziertes Protein (siehe unten) und möglicherweise weitere noch nicht identifizierte Polypeptide (Frentzel *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995; Nandi *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998). Infolge des Zusammentretens zweier Halbproteasomen kommt es zur autokatalytischen Prozessierung der Propeptide der aktiven Untereinheiten und damit zur Ausbildung der katalytischen Zentren im letzten Schritt der Reifung des eukaryotischen 20S-Proteasoms (Chen und Hochstrasser, 1996; Schmidtke *et al.*, 1996; Heinemeyer *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998).

In den letzten Jahren wurde verstärkt versucht, die Bedeutung der Propeptide der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten für die Assemblierung und Reifung von 20S-Proteasomen zu ergründen. Analog zur Funktion N-terminaler Propeptide von bakteriellen Serin-Proteasen wird für einige Propeptide von  $\beta$ -Untereinheiten postuliert, daß sie als intramolekulare Chaperone die Faltung des Vorläufer-Proteins vermitteln (Shinde und Inouye, 1994; Chen and Hochstrasser, 1996; Schmidt *et al.*, 1999). Während die nur acht Aminosäuren langen Propeptide der  $\beta$ -Untereinheiten des Ur-Proteasoms aus *Thermoplasma* nicht für eine korrekte Faltung oder die Assemblierung des 20S-Komplexes essentiell sind (Zwickl *et al.*, 1994), konnte gezeigt werden, daß die Propeptide der  $\beta$ -Untereinheiten aus *Rhodococcus* mit einer Länge von 65 bzw. 58 Aminosäuren die Faltung der Vorläuferproteine und deren Einbau ins Proteasom begünstigen. Wie auch bei anderen intramolekularen Chaperonen beobachtet werden konnte (s. oben), können sie diese Funktionen auch in *trans* als separat exprimierte Peptide erfüllen (Zühl *et al.*, 1997).

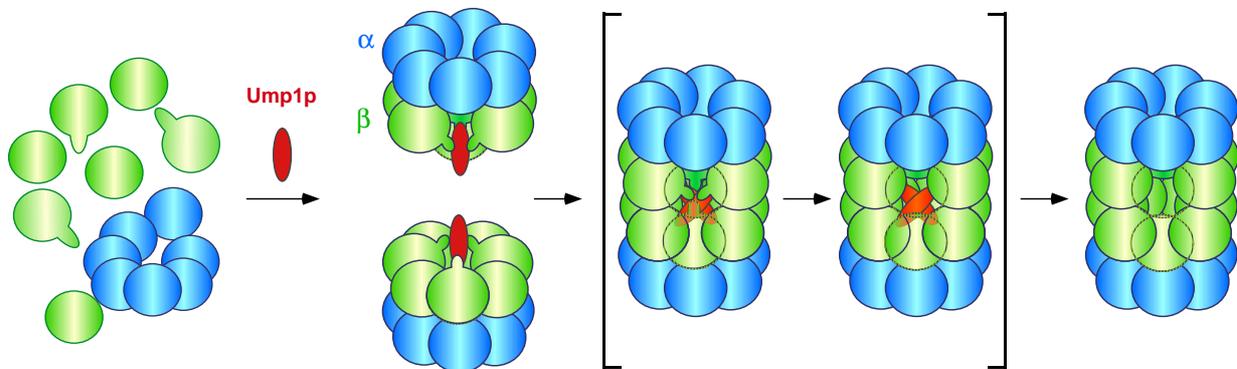
Die meisten der bislang geringen Erkenntnisse über die Bedeutung der Propeptide für die Assemblierung der komplexeren eukaryotischen 20S-Proteasomen wurde durch Studien in der Hefe *S. cerevisiae* gewonnen. Fünf ihrer sieben verschiedenen proteasomalen

$\beta$ -Untereinheiten werden als Vorläuferproteine mit Propeptiden unterschiedlicher Länge synthetisiert (s. auch Tab. 2). Die Prozessierung der drei aktiven Untereinheiten Pre2p, Pup1p und Pre3p verläuft infolge der Assemblierung zweier Halbproteasomen vermutlich *cis*-autokatalytisch nach dem gleichen biochemischen Mechanismus wie die Peptidspaltung in Substratproteinen durch reife Untereinheiten (Ditzel *et al.*, 1998). Die Propeptide der inaktiven Untereinheiten Pre4p und Prs1p werden vermutlich in nachfolgenden Schritten durch benachbarte proteolytisch aktive Untereinheiten prozessiert, an einer Stelle, die acht bzw. neun Aminosäurereste aufwärts der korrespondierenden Thr1-Position der aktiven Untereinheiten liegt (Groll *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1997).

Die Expression der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten ohne deren Propeptide führt zu unterschiedlichen Phänotypen der einzelnen Mutanten. Während die Deletion des Propeptids für die Zellen letal ist und Pup1-Propeptid-Deletionsmutanten eine verlangsamte Zellproliferation und erhöhte Sensitivität unter verschiedenen Streßbedingungen zeigen, besitzen Deletionsmutanten des Pre3p-Propeptids keinen auffälligen Phänotyp (Chen and Hochstrasser, 1996; Arendt and Hochstrasser, 1999). In den Pup1p- und Pre3p-Propeptid-Deletionsmutanten ist die proteolytische Aktivität der mutierten  $\beta$ -Untereinheit drastisch reduziert. In diesen Fällen ist eine Acetylierung der  $\alpha$ -Aminogruppe der N-terminalen Threoninreste der  $\beta$ -Untereinheiten durch die Nat1-Ard1- $N^{\alpha}$ -Acetyltransferase Ursache für deren Inaktivierung (Arendt und Hochstrasser, 1999). Durch diese Ergebnisse mußte eine bis dahin postulierte physiologische Funktion der Propeptide der aktiven eukaryotischen  $\beta$ -Untereinheiten relativiert werden. Vielmehr als eine verfrühte proteolytische Aktivität zu verhindern, bewahren sie die proteolytischen Untereinheiten vor einer irreversiblen Inaktivierung, bevor die katalytischen Zentren durch Einschluß im Innern der selbstkompartimentierenden Protease vom Zytosol getrennt sind. Daß die Propeptide nicht alleine dem Schutz der  $\alpha$ -Aminogruppe des Threoninrestes vor Acetylierung dienen, wird durch die Beobachtung bestärkt, daß die Propeptid-Deletionsmutanten von Pre2p und Pup1p schlechter wachsen als Mutanten, in denen die proteolytische Aktivität der Untereinheiten durch gezielten Aminosäure-Austausch (pre2-T20A bzw. pup1-T30A) ausgeschaltet ist. Darüber hinaus bringt auch eine Pre2-Propeptid-Deletionsmutante, in der die  $N^{\alpha}$ -Acetyltransferase durch Deletion des für eine Untereinheit codierenden *NAT1*-Gens ausgeschaltet ist, keine lebensfähigen Zellen hervor (Chen und Hochstrasser, 1996; Arendt und Hochstrasser, 1999).

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der Propeptide für die Assemblierung des eukaryotischen 20S-Proteasoms wurde aus in der Arbeitsgruppe Dohmen durchgeführten Studien zur Funktion des Ump1-Proteins der Hefe *S. cerevisiae* gewonnen (Ramos *et al.*, 1998). Hefen, denen dieses 148 Aminosäuren lange Protein fehlt, zeigen vermindertes Wachstum und Defekte in der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse. Die 20S-Proteasomen solcher Mutanten besitzen überwiegend unvollständig prozessierte Formen der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten, was mit einer drastischen Reduzierung aller proteolytischen Aktivitäten

einhergeht. Im Wildtyp ist das Ump1-Protein mit dem 15S-Proteasom-Vorläuferkomplex assoziiert, während es im reifen 20S-Komplex nicht nachweisbar ist. Aus diesen Ergebnissen und anderen biochemischen Studien wurde folgendes Modell abgeleitet (Abb. 4).



**Abb. 4: Modell zur Funktion des Reifungsfaktors Ump1p bei der Assemblierung und Reifung des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae*.** (Erläuterungen siehe Text)

Das Ump1-Protein bindet in einer Chaperon-ähnlichen Funktion an die Propeptide der Vorläuferproteine der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten in den Halbpoteasomen. Während der Assemblierung zweier Halbpoteasomen kommt es zu strukturellen Veränderungen in der Anordnung von Ump1 und den Propeptiden der  $\beta$ -Untereinheiten, wodurch die autokatalytische Prozessierung der Propeptide induziert wird. Im Anschluß an die Aktivierung der proteolytischen Zentren wird der Reifungsfaktor Ump1p im Inneren der katalytischen Kammer des reifen 20S-Proteasoms abgebaut (Ramos *et al.*, 1998).

Wie bereits beschrieben ist das Propeptid von Pre2p für die Lebensfähigkeit der Zellen essentiell, wobei es wie die Propeptide der  $\beta$ -Untereinheiten des *Rhodococcus*-Proteasoms auch in *trans* fungieren kann (Chen und Hochstrasser, 1996). Zellen, denen hingegen das Pre2-Propeptid und das Ump1-Protein fehlen, sind wieder lebensfähig. Dies deutet darauf hin, daß für den zuvor beschriebenen Reifungsprozeß des 20S-Proteasoms von *S. cerevisiae* eine Interaktion des Ump1p mit dem Propeptid des Pre2p-Vorläuferproteins erforderlich ist.

## 1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion des Ump1-Proteins und seine Interaktion mit proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms näher zu analysieren. Des weiteren sollte untersucht werden, ob und inwieweit Proteasomenreifungsfaktoren vom Typ des Ump1-Proteins in ihrer Struktur und Funktion konserviert sind. Ein interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang war die Bedeutung solcher Reifungsfaktoren für die Entstehung der verschiedenen Proteasomentypen, wie sie in Säugerzellen vorkommen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Gibco, Paisley, Schottland
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Arginin	Janssen, Beerse, Belgien
Bacto-Agar	Biomatik GmbH
Bradford-Farbreagensz	Biorad, München
Bromphenolblau	Janssen, Beerse, Belgien
CaCl <sub>2</sub>	Janssen, Beerse, Belgien
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Chloroform	Baker, Deventer, Niederlande
CPRG	Boehringer, Mannheim
Cycloheximid	Serva, Heidelberg
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dATP	Amersham Pharmacia Life Science,
Detransulfat	Amersham Pharmacia Life Science
DMF	Janssen, Beerse, Belgien
DMSO	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Fluka, Deisenhofen
Fluororotat	Toronto Research Chemicals
Formamid	Riedel-de Haen, Seelze
Ficoll Typ 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Galaktose	Roth, Karlsruhe
Glukose	Caesar & Loretz, Hilden
Glycin	Serva, Heidelberg
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Riedel de Haen, Seelze
Hefeextrakt	GibcoBRL, Paisley, Schottland
HEPES	Serva, Heidelberg
Histidin	Fluka, Deisenhofen
KAc	Acros, Geel, Belgien
Kanamycin	Serva, Heidelberg
LiCl	Riedel de Haen, Seelze
LiAc	Sigma, St. Louis, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Baker, Deventer, Niederlande
[ <sup>35</sup> S]-Methionin	ICN, USA
MgCl <sub>2</sub>	Baker, Deventer, Niederlande
MgSO <sub>4</sub>	Janssen, Beerse, Belgien
MOPS	Sigma, St. Louis, USA
NaCl	Baker, Deventer, Niederlande
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Riedel de Haen, Seelze
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Baker, Deventer, Niederlande
NEM	Sigma, St. Louis, USA
NH <sub>4</sub> Ac	Acros, Geel, Belgien
N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7- Amido-4-Methylcoumarin	Bachem
PEG3350	Roth, Karlsruhe
Pepton	Difco, Detroit, USA
Phenol	Roth, Karlsruhe

Phenylalanin	Acros, Geel, Belgien
RbCl	Acros, Geel, Belgien
SDS	Serva, Heidelberg
Sorbitol	Sigma, St. Louis, USA
TCA	Roth, Karlsruhe
Tris	USB, Cleveland, USA
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit, USA
Uracil	Sigma, St. Louis, USA
Xylencyanol	Sigma, St. Louis, USA
Yeast Nitrogen Base	Difco, Detroit, USA

Die Proteaseinhibitoren Antipain, Aprotinin, Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin, NEM und PMSF wurden von der Firma Sigma, St. Louis, USA bezogen.

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck Eurolab, Darmstadt bezogen.

## 2.2 Medien und Stämme

### 2.2.1 Hefestämme

Tab. 3: verwendete Hefestämme (\**K. lactis*, \*\**S. pombe*, sonst *S. cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Ref.
JD53	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
JD59	<i>MAT<math>\alpha</math> ump1<math>\Delta</math>::HIS3 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
JD47-13C	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	Dohmen <i>et al.</i> , 1995
JD81-1A	<i>MAT<math>\alpha</math> ump1<math>\Delta</math>::HIS3 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
JD131	<i>MAT<math>\alpha</math> PUP1-2xHA::Ylplac211 UMP1-2xHA::Ylplac128 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
JD135	<i>MAT<math>\alpha</math> PRE3-2xHA::Ylplac211 UMP1-2xHA::Ylplac128 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	Ramos <i>et al.</i> , 1998
JD216	<i>MAT<math>\alpha</math> ump1<math>\Delta</math>-3 pre2<math>\Delta</math>1::HIS3 leu2-3,112 trp1-<math>\Delta</math>63 ura3-52</i>	R. J. Dohmen
*CBS2359	Wildtyp	American Type Culture Collection, Maryland, ATCC8585
**130 <sup>+</sup>	<i>his3<math>\Delta</math> leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 h<sup>+</sup></i>	Gould <i>et al.</i> , 199

#### 2.1.2 Medien zur Anzucht von Hefestämmen

Vollmedium YPD: 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose

Vollmededium YPGal: 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Galaktose

Minimalmedium SD: 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, 2% Glukose, Histidin, Methionin je 0,01 mg/ml, Arginin 0,02 mg/ml, Lysin,

Tryptophan je 0,04 mg/ml, Threonin 0,05 mg/ml, Isoleucin, Phenylalanin je 0,06 mg/ml, Uracil 0,04 mg/ml

Minimalmedium SG: wie SD, anstelle von 2% Glukose mit 2% Galaktose

Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar.

Zur Selektion plasmidhaltiger Hefezellen oder von Hefezellen mit ins Genom integrierten Markergenen wurden die Zellen in/auf Minimalmedium kultiviert, dem die entsprechende Aminosäure oder Base nicht zugesetzt war. FoA-haltige Platten enthielten 1 mg/ml FoA. Die Kultivierungstemperatur betrug 30°C.

### 2.1.3 Bakterienstämme

Tab. 4: verwendete Stämme von *E. coli*

Stamm	Genotyp	Quelle
XL1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac<sup>-</sup> lacI<sup>q</sup> proAB<sup>+</sup> lacZΔM15 tn10 (tet<sup>r</sup>)</i>	Bullock <i>et al.</i> , 1987
MC1061	<i>hsdR mcrB araD139Δ (araABC-leu)7679 ΔlacX74 galU galK rpsL thi</i>	Meissner <i>et al.</i> , 1987
CJ236	F' cat (pCJ105; M13 <sup>5</sup> Cm') <i>dut ung1 thi-1 relA1 spoT1 mcrA</i>	BioRad, Hercules, USA
BL21	DE3 [ <i>lacI lacUV5-Promotor, T7 RNA-Pol</i> ] F' <i>opmT [lon] hsdS rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup></i>	Stratagene, La Jolla, USA
M15	pREP4; F' <i>lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup></i>	Qiagen, Hilden

### 2.1.4 Medien zur Anzucht von Bakterienstämmen

LB-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl

SOC-Medium: 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 20 mM Glukose, 10 mM NaCl  
2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,5

Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar.

Zur Selektion auf Zellen mit plasmidcodierter Antibiotikaresistenz wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

Die Bakterien wurden bei einer Temperatur von 37°C kultiviert.

## 2.3 Plasmide

### 2.3.1 Bakterienplasmide

Tab 5.: verwendete Bakterienplasmide

Plasmid	Beschreibung , Funktion	Quelle
pUC19	Klonierungsvektor, Kompetenz zur $\alpha$ -Komplementation, ColE1, Amp <sup>r</sup> , rop <sup>-</sup>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUCK11	pUC19 mit <i>EcoRI</i> -Fragment aus genom. <i>K.lactis</i> -DNA incl <i>KIUMP1</i>	diese Arbeit
pUCK13	pUC19 mit <i>EcoRI</i> -Fragment aus genom. <i>K.lactis</i> -DNA incl <i>KIUMP1</i>	diese Arbeit
pJH14	Subklon von pUCK11	diese Arbeit
pJH16	Subklon von pUCK13	diese Arbeit
pQE-40	Basisvektor von pJH31	Qiagen
pJH31	Expression von 6xHis- <i>HsUMP1</i>	diese Arbeit
pGEX-2T	Expression von GST	Pharmacia
pJH56	Expression von GST- <i>UMP1</i>	diese Arbeit
pJH64	Expression von GST- <i>MmUMP1</i>	diese Arbeit

### 2.3.2 Hefepasmide

Tab. 6: verwendete Hefepasmide

Plasmid	Beschreibung		Quelle
	Replikationsmodul und selektierbarer Marker	Ursprung und Funktion	
pJDCEX2	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Basisvektor, benutzt für Expression verschiedener cDNA: $P_{CUP1}$ - <i>EcoRI</i> - <i>BglII</i> -cDNA- <i>KpnI</i> -2xHA-Epitop- <i>XhoI</i> -T <sub>CYC1</sub>	R. J. Dohmen
pRS314	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Basisvektor von pJH57	Sikorski und Hieter, 1989
pUb23R	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	$P_{GAL1}$ -kontrollierte Expression von Ub-Arg- $\beta$ -Galaktosidase	R. J. Dohmen
pUb23M	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	$P_{GAL1}$ -kontrollierte Expression von Ub-Met- $\beta$ -Galaktosidase	R. J. Dohmen
pUb23P	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	$P_{GAL1}$ -kontrollierte Expression von Ub-Pro- $\beta$ -Galaktosidase	R. J. Dohmen
YCp50- $\alpha_{2,69}$ - $\beta$ Gal	<i>ARS1/CEN4, URA3</i>	$P_{GAL1}$ -kontrollierte Expression v. Mat $\alpha_{2,68}$ - $\beta$ -Galaktosidase	R. J. Dohmen
YCp50- <i>UMP1</i>	<i>ARS1/CEN4, URA3</i>	Expression von <i>UMP1</i> unter Kontrolle des eigenen Promotors	Ramos <i>et al.</i> , 1998
pJNERF22	<i>ARS1/CEN4, TRP1</i>	enthält $P_{UMP1}$ - <i>UMP1</i> , benutzt zur Umklonierung in pJH57	R. J. Dohmen
pKB64	2 $\mu$ -DNA, <i>URA3</i>	$P_{GAL1}$ -kontrollierte Expression von Gcn4p- $\beta$ -Galaktosidase	Kornitzer <i>et al.</i> , 1994
pJD248	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, $P_{CUP1}$ - <i>ScUMP1</i> -2xHA-Epitop-T <sub>CYC1</sub>	R. J. Dohmen
pJH26	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, $P_{CUP1}$ - <i>KIUMP1</i> -2xHA-Epitop-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit
pJH30	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, $P_{CUP1}$ - <i>HsUMP1</i> -2xHA-Epitop-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit
pJH32	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, $P_{CUP1}$ - <i>MmUMP1</i> -2xHA-Epitop-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit
pJH33	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, $P_{CUP1}$ - <i>Mm/ScUMP1</i> (-I)-2xHA-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung		Quelle
	Replikationsmodul und selektierbarer Marker	Ursprung und Funktion	
pJH34	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, P <sub>CUP1</sub> - <i>Sc/MmUMP1</i> -2xHA-Epitop-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit
pJH36	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, P <sub>CUP1</sub> - <i>SpUMP1</i> -2xHA-Epitop-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit
pJH41	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, P <sub>CUP1</sub> - <i>Sp/ScUMP1</i> -2xHA-Epitop-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit
pJH44	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, P <sub>CUP1</sub> - <i>Mm/ScUMP1</i> (-II)-2xHA-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit
pJH45	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, P <sub>CUP1</sub> - <i>Mm/ScUMP1</i> (-III)-2xHA-T <sub>CYC1</sub>	diese Arbeit
pJH46	<i>ARS1/CEN4, TRP1</i>	Derivat von YCplac22, zur Konstruktion von chimären PRE2-Genen; P <sub>PRE2</sub> - <i>XhoI-NcoI</i> -PRE2	diese Arbeit
pJH54	<i>ARS1/CEN4, TRP1</i>	Derivat von pJH46, Expression von Pro <sub>S.pombe</sub> -Pre2p-2xHA	diese Arbeit
pJH57	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Derivat von pRS314, enthält P <sub>UMP1</sub> - <i>UMP1</i> , hergestellt für Einführung gezielter Punktmutationen und anschließender Expression in Hefe	diese Arbeit
pJH57-1	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -D31A	diese Arbeit
pJH57-2	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -R34A	diese Arbeit
pJH57-3	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -E54A	diese Arbeit
pJH57-4	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -N59A	diese Arbeit
pJH57-5	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -Q64A	diese Arbeit
pJH57-6	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -K83A	diese Arbeit
pJH57-7	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -E87A	diese Arbeit
pJH57-8	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -D108A	diese Arbeit
pJH57-9	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -E120A	diese Arbeit
pJH57-10	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -D137A	diese Arbeit
pJH57-11	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -E143A	diese Arbeit
pJH57-12	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -D121G	diese Arbeit
pJH57-13	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -R73A	diese Arbeit
pJH57-14	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -I75T	diese Arbeit
pJH57-21	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Der. v. pJH57, Ex.. v. <i>ump1</i> -V26G-D31A-D108A	diese Arbeit
pJH57-22	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Mutagenese-Derivat v. pJH57, Expression von <i>ump1</i> -H139R	diese Arbeit
pJD566	<i>ARS1/CEN4, URA3</i>	Expression von Pre2p	R. J. Dohmen
pJD577	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Expression von Ubiquitin-Pre2p-2xHA	R. J. Dohmen
pJD582-3	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Expression von Pro <sub>M.musculus</sub> -Pre2p-2xHA	R. J. Dohmen
pJD583	<i>ARSH4/CEN6, TRP1</i>	Expression von Pro <sub>S.pombe</sub> -Pre2p-2xHA	R. J. Dohmen
pJH58	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, Expression von ProPre2p	diese Arbeit
pJH61	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, Expression von ProPup1p	diese Arbeit
pJH62	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, Expression von ProPre3p	diese Arbeit
pJH63	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJDCEX2, Expression von Ubiquitin-Pre2p	diese Arbeit
pJH65	2 $\mu$ -DNA, <i>LEU2</i>	Derivat von pJH62, Expression von Ubiquitin-Pre3p	diese Arbeit

### 2.3.3 Plasmid-cDNA-Banken

Tab. 7: verwendete cDNA-Banken

Beschreibung	Quelle
<i>S. pombe</i> cDNA-Bank, Basisvektor: pDB20 (2 $\mu$ , <i>URA3</i> , P <sub>ADH1</sub> , T <sub>ADH1</sub> )	Fikes <i>et al.</i> , 1990
<i>M. musculus</i> cDNA-Bank aus embryon. Fibroblasten	Boehm <i>et al.</i> , 1998
<i>H. sapiens</i> cDNA-Bank ;pADNS (2 $\mu$ , <i>LEU2</i> ; P <sub>ADH1</sub> , T <sub>ADH1</sub> ); aus Zelllinie U118	Colicelli <i>et al.</i> , 1989

## 2.4 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 8: verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung	Beschreibung
JD70	GGTCGGTACCCAATGCCTAATTGTTTTTCG	3'-UMP1-ORF
JD280	CGCGAATTCATGCAAGCTATTGCCGAT	5'-PRE2-ORF
JD286	CGCGAATTCATGGCAGGTTTATCGTTCGA	5'-PUP1-ORF
JD290	GCCTTCGAGCGTCCAAAACCTTC	5'-CYC1-Terminator
JD301	CGCGGTACCCGCCAATAACGTTGTTGAAAG	3'-PRE2-ORF
JH420	GGATCTCACAGATTATAATGAAG	intern <i>Sp</i> UMP1-ORF
JH421	CATTCAAGGCGAATTTGTTGCG	intern <i>Sp</i> UMP1-ORF
JH423	CGCGAATTCATGCCAATGAATATCGTTCC	5'-KIUMP1-ORF
OF465	CGCAGATCTAGTACACACAGAAAGTTAAC	5'-PRE3-ORF
JH489	GCGGAATTCATGAAGATTGTTCTGACGTGCAAC	5'- <i>Sp</i> UMP1-ORF
JH490	CGCGGTACCCGAGACCATATCTAATGGCCATTTCC	3'- <i>Sp</i> UMP1-ORF
JH504	CGCAGATCTATGAATGCCAGAGGACTTGGATC	5'- <i>Hs</i> UMP1-cDNA
JH506	CGCGGTACCCAGTAAACCAAGTTTATATTCCACC	3'- <i>Hs</i> UMP1-cDNA
JH518	GCGAGATCTATGAATATCGTCCACAAGATAC	5'-UMP1-ORF
JH519	GCGAGATCTATGAACGCCAGAGGTCTTGGG	5'- <i>Mm</i> UMP1-cDNA
JH520	CGCGGTACCCAGCAAGCCCAGCTTATGTTCC	3'- <i>Mm</i> UMP1-cDNA
JH525	GCGGGTACCCAATCCCCATTCTCTTTTC	3'-KIUMP1-ORF
JH526	CATCCATTAGAATCAACATTGAA	intern UMP1-ORF, für „Assembly-PCR“ <i>Mm/Sc</i> UMP1-I und <i>Sp/Sc</i> UMP1
JH527	CACCCTCTGAGTTATCAGAAAA	intern <i>Mm</i> UMP1-cDNA, für „Assembly-PCR“ <i>Sc/Mm</i> UMP1
JH528	TTCAATGTTGATTCTAATGGATGACTGGGCAAAAG TTCATTTTTTC	intern <i>Mm</i> UMP1-cDNA bzw UMP1-ORF für „Assembly-PCR“ <i>Mm/Sc</i> UMP1-I
JH529	TTTTCTGATAACTCGAGAGGGTGTCTGTCATTCAAT TGTGTGGAAAAG	intern UMP1-ORF bzw <i>Mm</i> UMP1-cDNA, für „Assembly-PCR“ <i>Sc/Mm</i> UMP1
JH576	CTTCAATGTTGATTCTAATGGATGTTTATTTTCAAC ACGGTG	intern <i>Sp</i> UMP1-ORF bzw UMP1-ORF für „Assembly-PCR“ <i>Sp/Sc</i> UMP1
JH601	ATGGAAATGGAAATCGTCAATCGT	intern UMP1-ORF, für „Ass.-PCR“ <i>Mm/Sc</i> UMP1-II
JH602	TCGATTGACGATTTCCATTTCCATCTGTAACCTCAG GGGAG	intern <i>Mm</i> UMP1-cDNA bzw UMP1-ORF für „Assembly-PCR“ <i>Mm/Sc</i> UMP1-II
JH603	GACATACTACTGAACAAAGAGTGC	intern UMP1-ORF, für „Assembly-PCR“ <i>Mm/Sc</i> UMP1-III
JH604	GCACTCTTTGTTTCAGTAGTATGTCCAGTGAGAGGT TTGAGCTCGGG	intern <i>Mm</i> UMP1-cDNA bzw UMP1-ORF für „Assembly-PCR“ <i>Mm/Sc</i> UMP1-III
JH622	TGCCCTCCTTGCCACCACATTACGCCAGCAA	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -D31A)
JH623	TTGCCAGACACATTAGCCCAGCAAGAAGGCGG	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -R34A)
JH624	ACAGACATCCATTAGCATCAACATTGAAGAAC	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -E54E)
JH625	GAATCAACATTGAAGGCTGGGAAACCACACA	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -N59A)
JH626	AACTGGGAAACCACAGCGCGCCAAAGACAAAT	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -Q64A)
JH627	ATTGCCGAACCAATGGCAAGGACGATGGAAAT	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -K83A)
JH628	TGAAAAGGACGATGGCAATGGAAATCGTCAAT	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -E87A)
JH629	GTAGTATACACCGTGCCATACTACTGAACAAA	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -D108A)
JH639	GCRTCRTAYTTYTCYTTRAACCA	degener. <i>Sc</i> -ORF <i>RPL11A</i> für Amplif. v. 5'- <i>KIPRE2</i>
JH640	GTYTCCCARAAAYTGRCARTC	degener. <i>Sc</i> PRE2 für Amplif. v. 5'- <i>KIPRE2</i> (s. 2.16)
JH669	GCAGCATCGATTGGGCGGACGTCTACCCTGGT	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -E120A)
JH670	CCATGGTAGGTGATGCCGTCCACAGCAAATC	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -D137A)
JH671	TCCACAGCAAATCGCAAACAATTAGGCATT	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -E143A)
JH673	AAATGGAACAGTATGCACAAATATTTGGCATTG	für zielgerichtete Mutagenese ( <i>ump1</i> -R73A)

## 2.5 Enzyme

Lysozym	Sigma, St- Louis, USA
Lyticase	Sigma, St- Louis, USA
T4-DNA-Polymerase	NEB, Beverly, USA
T4-Ligase	GibcoBRL, Paisley, Schottland
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim sowie NEB, Beverly, USA
Taq/PWO- („Expand“-) Polymerase	Boehringer, Mannheim

## 2.6 Antikörper

Beschreibung	Quelle
monoklonaler Maus-Anti- $\beta$ -Galaktosidase-Antikörper, Maus-Anti-HA-Antikörper (16B12)	Promega, Babco, Richmond, USA
Schaf-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Meerrettich-Peroxidase- gekoppelt)	Boehringer, Mannheim
Kaninchen-Anti- <i>HsUmp1</i> -Antiserum	Davids Biotechnologie, Regensburg
Esel-Anti-Kaninchen-IgG (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt)	Amersham Life Science
Kaninchen-Anti-20S-Proteasom-Antikörper	K. Tanaka (Ramos <i>et. al</i> )
Anti-LMP7-Antikörper	Affiniti Research Products Ltd., Exeter, UK

## 2.7 Verschiedenes

Heringssperma-DNA	Promega
Glasperlen	Roth, Karlsruhe
Glaswolle	Roth, Karlsruhe
Glutathion-Separose 4B	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Kalbsthymus-DNA	Sigma, St. Louis, USA
$\lambda$ -DNA	NEB, Beverly, USA
Rinderserumalbumin	NEB, Beverly, USA
Röntgenfilme	„Medical X-ray film Super RX“, Fuji, Japan
Superose 6 HR 10/30	Pharmacia, Uppsala, Schweden
ProteinA-Sepharose	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Chromatographie-Papier	Whatman, Großbritannien

## 2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für analytische Zwecke erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA nach der von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse aus 1,5 ml stationärer Kultur.

Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen, Klonierungen und Amplifikation mittels PCR wurde mit Hilfe des Präparationskits „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers isoliert.

## 2.9 Präparation von genomischer DNA aus Hefe

### 2.9.1 Präparation von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die DNA-Präparation wurde nach einer modifizierten Version der von Hoffman und Winston (1987) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Hefen wurden aus 20 ml einer stationären SD-Kultur bei 3000 x g abzentrifugiert, in 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und in 200 µl Lysis-Puffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 0,1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA) resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte nach Zugabe von ca. 100 µl Glasperlen und 200 µl Phenol/Chloroform (1:1) durch dreiminütiges Schütteln bei max. Geschwindigkeit in einem IKA-Vibrax-VXR (Janke & Kunkel). Anschließend wurden 200 µl H<sub>2</sub>O zugegeben, das Lysat gemischt und 5 min bei Raumtemperatur und 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem Volumen Phenol/Chloroform versetzt, wie zuvor zentrifugiert, der Überstand mit 1 Volumen Chloroform versetzt und erneut zentrifugiert. Die in ein neues Reaktionsgefäß überführte wässrige Phase wurde mit 1 ml 96% Ethanol gemischt und 2 min wie zuvor zentrifugiert. Es folgten Waschen des Pellets mit 1 ml 70% Ethanol, Trocknung und schließlich Aufnahme des Pellets in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O.

### 2.9.2 Präparation von genomischer DNA aus *K. lactis* und *S. pombe*

Die Präparation von genomischer DNA aus diesen Hefen erfolgte nach der Methode beschrieben in Durkacz *et al.* (1985). Zur enzymatischen Lyse der Zellen wurden 10 µg Lyticase pro OD<sub>600</sub>-Einheit Zellen eingesetzt. Die Präzipitation der DNA erfolgte in Abwandlung vom Protokoll nach Zugabe von Natriumacetat zu einer Endkonzentration von 300 mM sowie 2 Vol. 96% Ethanol bei -20°C für 2 h.

## **2.10 Transformation**

### **2.10.1 Transformation von *E. coli***

Die Transformation von *E.coli* wurde nach Protokoll 3 von Hanahan (1985) durchgeführt oder durch Elektro-Transformation mit dem Electroporator II der Firma Invitrogen nach der vom Hersteller empfohlenen Methode. Für Elektro-Transformationen wurden der *E. coli*-Stamm MC1061 verwendet. Zur Klonierung von Plasmid-DNA wurde, sofern nicht anders erwähnt, der *E. coli*-Stamm XL1 Blue verwendet.

### **2.10.2 Transformation von *S. cerevisiae***

Die Transformation der Hefen erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz *et al.* (1995) oder mit gefrierkompetenten Hefezellen nach der von R. J. Dohmen beschriebenen Methode (Dohmen *et al.*, 1991)

## **2.11 DNA-Restriktion**

Die Restriktion der DNA mittels Endonukleasen erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Puffer und Temperatur für 2-3 h. Es wurden 2-5 U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt.

## **2.12 Ligation**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten bzw. Religation von geschnittenen Plasmiden wurden T4-Ligase und Ligationspuffer der Firma Gibco BRL verwendet. Die Ligation erfolgt unter Einsatz von 1 U Ligase über Nacht bei 16°C.

## **2.13 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8%-1,5%ige TAE-Agarosegelen bei 25-30mA. Gel- und Laufpuffer enthielten 40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA, 0,05% Ethidiumbromid. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 0,2 Volumen Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 15% Ficoll Typ 400) versetzt. Als Längen- und Konzentrationsstandard wurde 1  $\mu\text{g}$  mit *HindIII/EcoRI* geschnittene Lambda-DNA eingesetzt. Die aufgetrennte DNA konnte anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

## 2.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Fragmentisolierung wurde mit dem „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Vorschrift durchgeführt.

## 2.15 Enzymatische Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung des High Fidelity Kit der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt. 50 µl Reaktionsgemisch (50 mM Tris-HCl pH 9,2; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden je 50 pmol der entsprechenden Oligonukleotide sowie je 200 µM der Nukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 2 U „Expand“-Polymerase (Boehringer Mannheim) und 1-10 ng der DNA zugesetzt, die das zu amplifizierende DNA-Fragment enthielt. Die PCR wurde im Thermocycler „UNO“ der Firma Biometra durchgeführt. Zur Denaturierung der DNA wurde das Reaktionsgemisch für 2 min 30 sek auf 94°C erhitzt. Anschließend erfolgten 25 bis 30 Zyklen mit folgenden Schritten:

1.: 30 sek / 94°C (Denaturierung)

2.: 45 sek / 58 °C (Hybridisierung)

3.: 60 sek pro kb Fragmentlänge / 72°C (Elongation)

In einem abschließenden Schritt erfolgte Inkubation für 5 min bei 72°C.

Die Hybridisierungstemperatur (2.) wurde den spezifischen Schmelzpunkten der Oligonukleotide angepaßt.

Für die Amplifikation und anschließende Klonierung (in Plasmid pJDCEX2) der codierenden Sequenzen der *UMP1*-Gene verschiedener Spezies wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

*KIUMP1*: JH423 und JH525

*SpUMP1*: JH489 und JH490

*MmUMP1*: JH519 und JH520

*HsUMP1*: JH504 und JH506

Die Amplifikation der Säuger-DNAs erfolgte unter Benutzung der in Abschnitt 2.3.3 aufgeführten cDNA-Banken.

Die hier nicht aufgeführten Oligonukleotide sind in den einzelnen Abschnitten aufgeführt, die den Zusammenhang ihrer Benutzung beschreiben.

### 2.15.1 Generierung von Hybridgenen durch „Assembly“-PCR

Mit diesem Verfahren, welches man auch als „splicing by overlap extension“ bezeichnet, wurden DNA-Fragmente mittels PCR zu Hybrid-Genen fusioniert. Die beiden zu fusionierenden Gen-Fragmente „A“ und „B“ wurden zunächst in zwei getrennten Reaktionen amplifiziert. Die „Primer“ wurden so konstruiert, daß die Enden der PCR-Produkte komplementäre Enden enthielten. Das führte dazu, daß der am 5'-Ende des Fragmentes B hybridisierende Primer mit seiner 3'-Hälfte hybridisierte, während sein 5'-Anteil dagegen zum 3'-Ende des Fragmentes A komplementär war. Nach der Aufreinigung der beiden PCR-Produkte wurden diese denaturiert und gemeinsam in einer weiteren PCR eingesetzt. Die beiden komplementären Enden hybridisierten dabei und wurden somit auf die vollständige Länge der neuen Genkombination verlängert. Gleichzeitig wurde dieses Hybrid-Gen durch Zugabe von Primern, die an seinen Enden hybridisieren, amplifiziert (Reaktionsbedingungen siehe 2.15).

Zur Generierung von Hybridgenen zur Expression chimärer Ump1-Proteine wurden folgende synthetische Oligonukleotide in der jeweils 1. PCR verwendet (vgl. 2.4):

<i>Mm/ScUMP1-I</i>	PCR A: JH519, JH528; PCR B: JD70, JH526
<i>Mm/ScUMP1-II</i>	PCR A: JH519, JH602; PCR B: JD70, JH601
<i>Mm/ScUMP1-III</i>	PCR A: JH519, JH604; PCR B: JD 70, JH603
<i>Sc/MmUMP1</i>	PCR A: JH518, JH 529; PCR B: JH520, JH527
<i>Sp/ScUMP1</i>	PCR A: JH576, JH489; PCR B: JD70, JH526

Die Zusammensetzung der chimären Proteine bezüglich ihrer Aminosäurereste für welche diese Hybridgene codieren, ist im folgenden aufgelistet:

<i>Mm/ScUmp1-I</i>	<i>MmUmp1</i> <sub>1-46</sub> - <i>ScUmp1</i> <sub>52-148</sub>
<i>Mm/ScUmp1-II</i>	<i>MmUmp1</i> <sub>1-81</sub> - <i>ScUmp1</i> <sub>87-148</sub>
<i>Mm/ScUmp1-III</i>	<i>MmUmp1</i> <sub>1-103</sub> - <i>ScUmp1</i> <sub>109-148</sub>
<i>Sc/MmUmp1</i>	<i>ScUmp1</i> <sub>1-51</sub> - <i>MmUmp1</i> <sub>47-141</sub>
<i>Sp/ScUmp1</i>	<i>SpUmp1</i> <sub>1-36</sub> - <i>ScUmp1</i> <sub>52-148</sub>

### 2.15.2 Aufreinigung PCR-amplifizierter DNA-Fragmente

Die Aufreinigung der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe des „PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach der Anleitung des Herstellers.

## **2.16 Klonierung des 5'-Bereiches des zum *PRE2* homologen Gens aus *Kluyveromyces lactis***

Die Klonierung dieser nicht in den Datenbanken eingetragenen DNA erfolgte aufgrund folgender Strategie. In *S. cerevisiae* liegt das *PRE2*-Gen in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem ORF *RPL11A*, welches vermutlich für eine Komponente der ribosomalen 60S-Untereinheit codiert. Weil die Anordnungen von Genen in *S. cerevisiae* und *K. lactis* oftmals übereinstimmen (Wolfe et al., 1997) und ribosomale Komponenten sowie die reifen Anteile der proteasomalen  $\beta 5$ -Untereinheit stark konserviert sind (diese Arbeit), wurden Oligonukleotiden konstruiert, welche jeweils eine degenerierte Sequenz dieser Gene enthalten. Unter Benutzung dieser Oligonukleotide konnte der 5'-Bereich des zum *PRE2* homologen Gens mittels PCR amplifiziert werden. Die Oligonukleotide JH639 (*RPL11A*) und JH640 (*ScPRE2*) wurden in einer PCR unter Benutzung genomischer DNA aus *K. lactis*-Stamm CBS2359 bei einer „Annealing“-Temperatur von 48°C eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt und mit restringiertem, polyT-modifiziertem Vektor pBluescriptII SK (Stratagene) ligiert.

## **2.17 Amplifikation neu konstruierter Plasmide**

Die Amplifikation eines neu konstruierten Plasmides erfolgte durch Transformation des *E. coli*-Stammes XL1 Blue mit dem DNA-Ligationsansatz gefolgt von selektiver Anzucht der Transformanten auf Agarplatten. Anschließend erfolgte Kultivierung verschiedener *E. coli*-Klone in Flüssigkultur. Nach Plasmidisolierung aus den Kulturen wurde die Plasmid-DNA durch analytische Restriktion untersucht.

## **2.18 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung erfolgte nach der enzymatischen Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierungsreaktionen wurden unter Verwendung des Sequenzierkits der Firma USB nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wurde mit Hilfe des Präparationskits der Firma Qiagen aus dem *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  isoliert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Reaktionsprodukte wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel benutzt. Dieses wurde aus Fertiglösungen der Firma National Diagnostics nach Angaben des Herstellers angefertigt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 3 h bei 60 W. Zur Detektion der aufgetrennten Reaktionsprodukte wurde ein Autoradiogramm durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das getrocknete Gel hergestellt.

## 2.19 Spezifischer Nachweis von DNA

### 2.19.1 Spezifischer Nachweis von DNA mittels „Southern Blotting“

Genomische Hefe-DNA wurde mit Restriktionsendonucleasen geschnitten und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 45 min zur Denaturierung der DNA in 0,5% NaOH, 1,5 M NaCl inkubiert und zur anschließenden Neutralisierung zweimal für 15 min in 0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl geschwenkt. Der Transfer der denaturierten DNA auf eine Nylon-Membran (Hybond-N) erfolgte durch „Kapillar-Blotting“ in 20 x SSPE (3,6 M NaCl, 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM EDTA, pH 7,6) über Nacht. Anschließend wurde die Membran 5 min in 2 x SSPE gewaschen und die DNA durch Inkubation für 2 h bei 80°C fixiert. Die Membran wurde für 1 h bei 65°C in Hybridisierungslösung (5 x SSC: 1,75 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7, 1% „Blocking Reagent“ (Boehringer), 0,1% N-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS) inkubiert. Zur Hybridisierung der membrangebundenen DNA mit DIG-dUTP-markiertem DNA-Fragment wurde die Membran in Hybridisierungslösung mit ca. 50 ng markierter DNA über Nacht bei 65°C inkubiert. Die markierte DNA wurde zuvor durch zehnmütiges Kochen frisch denaturiert, gefolgt von sofortigem Abkühlen in Eiswasser für 5 min. Anschließend erfolgte zweimaliges Waschen der Membran für 5 min bei RT in 2 x SSC, 0,1% SDS und zweimaliges Waschen für 10 min bei 65°C in 0,1 x SSC, 0,1% SDS. Der colorimetrische Nachweis der an die Ziel-DNA gebundenen markierten DNA wurde unter der Benutzung des „DIG Nucleic Acid Detection Kit“ und des „Blocking Reagenz“ von Boehringer durchgeführt.

Zur Hybridisierung unter niedrig stringenten Bedingungen wurde die Hybridisierung bei erniedrigter Temperatur durchgeführt. Der zweite Waschschrift erfolgte ebenfalls bei erniedrigter Temperatur zweimal für 15 min in 1 x SSC.

### 2.19.2 Spezifischer Nachweis von DNA mittels „Kolonie-Hybridisierung“

*E. coli* -Zellen des Stammes MC1061 wurden mit den zu analysierenden Plasmiden (der cDNA-Bibliothek von *S. pombe* bzw. der partiellen genomischen DNA-Bibliothek von *K. lactis*) transformiert und die Transformanten auf einer LB-Agar-Platte von 14 cm Ø zu Kolonien angezogen. Zellen der Kolonien wurden durch Auflegen einer Nylon-Membran (Hybond N) von 13,5 cm Ø auf diese überführt. Die auf die Membran transferierten Zellen wurden durch Überschichtung der Membran mit 4 ml Lysozym-Lösung (10mg/ml) und Inkubation für 30 min bei 37°C lysiert. Anschließend wurde die Membran nacheinander für je 15 min auf Chromatographie-Papiere gelegt welche zuvor in Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung bzw. SSC-Lösung (siehe 2.19.1) getränkt worden waren. Zur Fixierung der DNA an die Membran erfolgte Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm für 3 min. Zur Entfernung von Proteinen und anderen Zellbestandteilen wurde die

Membran in Proteinase K - Lösung für 30 min bei 37°C inkubiert und in 2 x SSC für 15 min gewaschen. Die Hybridisierung mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP-markiertem DNA-Fragment sowie das anschließende Waschen der Membran erfolgte wie in 2.19.1 beschrieben. Die Detektion der an die Ziel-DNA gebundenen markierten DNA geschah durch Exposition von Röntgenfilmen.

## 2.20 Spezifischer Nachweis von RNA

Auf Nylonmembran transferierte RNA wurde 2-4 h bei 42°C in Hybridisierungslösung (5 x SSPE (0,9 M NaCl, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM EDTA, pH 7,6), 50% deionisiertes Formamid, Denhardts Reagenz, 1% SDS, 5% Dextransulfat) mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  denaturierter Heringsperma-DNA (Promega) inkubiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der membrangebundenen RNA mit der markierten DNA-Sonde durch Inkubation in Hybridisierungslösung (ohne Heringsperma-DNA) mit ca. 50 ng [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dATP-markiertem DNA-Fragment für 16-20 h bei 42°C. Die markierte DNA wurde zuvor durch zehnmütiges Kochen denaturiert, gefolgt von sofortigem Abkühlen in Eiswasser für 5 min. Die Membran wurde danach zweimal für 15 min in 100 ml 2 x SSPE bei RT, anschließend zweimal für 45 min in 100 ml 2 x SSPE mit 2% SDS bei 64°C und schließlich zweimal für 15 min in 0,1 x SSPE bei RT gewaschen. Der Nachweis der an die RNA gebundenen radioaktiv markierten DNA erfolgte durch Exposition von Röntgenfilmen.

Die Quantifizierung der RNA-Banden wurde mit dem Bio-Imaging Analyser BAS 1500 der Firma Fuji durchgeführt.

Zur wiederholten Hybridisierung einer auf Nylon-Membran transferierten RNA wurde die Probe durch zweimaliges, fünfminütiges Schwenken in kochendheißer SDS-Lösung (0,5 %) abgelöst. Zur Kontrolle erfolgte Exposition eines Röntgenfilms für mehrere Tage.

## 2.21 Markierung von DNA

Die Markierung erfolgte nach der Methode der „random primed“-Markierung (Feinberg und Vogelstein, 1984). Als „Primer“-Gemisch wurde der „Hexanucleotid-Mix“ der Firma Boehringer unter der Anleitung des Herstellers verwendet. Für radioaktive Markierung wurden ca. 50 ng (mittels PCR amplifiziertes) DNA-Fragment und 50  $\mu\text{Ci}$  [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP eingesetzt. Für Markierung durch Einbau von Digoxigenin-dUTP wurde der „DIG-DNA-Labeling-Mix“ von Boehringer nach Anleitung des Herstellers und 200 ng DNA-Fragment benutzt. Die Reaktionsansätze enthielten 0,1 U/ $\mu\text{l}$  Klenow-Fragment und wurden für 2-3 h bei 37° inkubiert.

## 2.22 Aufreinigung markierter DNA

Zur Trennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente von nicht eingebauten Nukleotiden und Hexanukleotiden erfolgte eine Chromatographie des Reaktionsgemisches über eine „Mini Quick spin™“-Säule der Firma Boehringer Mannheim nach Anleitung des Herstellers. DIG-dUTP markierte DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Vol. 4 M LiCl und 3 Vol. 96% Ethanol für 2 h bei -20°C gefällt, 15 min bei 15.000 x g und 4°C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. .

## 2.23 Mutagenese des *UMP1*-Gens

### 2.23.1 Herstellung eines Vektors zur Generierung einzelsträngiger Plasmid-DNA

Das *UMP1*-Gen wurde mitsamt seiner Promotorsequenz durch Restriktion mit den Endonukleasen *SacI* und *HindIII* aus dem Plasmid ausgeschnitten. Pararall wurde der Hefeexpressionsvektor pRS314 partiell mit denselben Enzymen verdaut. Das linearisierte Vektorfragment, sowie das *UMP1*-Fragment wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung isoliert, ligiert und in *E. coli* amplifiziert (2.17). Die daraus gewonnene DNA des Plasmides pJH57 wurde für die Oligonukleotid-vermittelte *in vitro* Mutagenese verwendet.

### 2.23.2 Herstellung einzelsträngiger pJH57-Plasmid-DNA

Die Mutagenese des *UMP1*-Gens basierte auf der von Kunkel entwickelten Methode (Kunkel, 1985; Kunkel *et al.*, 1987). Der *E. coli* Stamm CJ236 (F' *dut<sup>-</sup> ung<sup>-</sup>*) wurde mit dem Hefevektor pJH57 transformiert, welcher das zu mutagenisierende *UMP1*-Gen enthält. Dieser Vektor ist ein Derivat des Phagemids pBluescript II SK (Stratagene) und beinhaltet den Replikationsursprung des filamentösen Phagen f1. Zellen der Transformanten wurden in 10 ml LB-Medium, 30 mg/ml Chloramphenicol bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 angezogen. Zur Transfektion der Zellen erfolgte Zugabe von ca. 10<sup>6</sup> Helferphagen des Stammes M13K07 und Inkubation über Nacht bei 37°C. Zur Sedimentation der Bakterien wurde die Kultur für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert und ca. 80% des phagenhaltigen Überstandes vorsichtig abgenommen. Die Isolierung der uracilhaltigen, einzelsträngigen Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte unter Benutzung des „QIAprep Spin M13“-Kits der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers.

### 2.23.3 Oligonukleotid-vermittelte *in vitro* Mutagenese des *UMP1*-Gens

Die Synthese des mutagenen DNA-Stranges wurde in einer *In-vitro*-Reaktion unter Benutzung der einzelsträngigen Plasmid-DNA als Matrize, eines Oligonukleotids, welches die Sequenz der zu inserierenden Mutation(en) enthält und der T4-DNA-Polymerase durchgeführt. Zur Steigerung der Syntheseeffizienz wurde das Oligonukleotid zuvor unter Einsatz von 5U/0,2 nmol T4-Polynukleotidkinase (Boehringer, Mannheim) phosphoryliert (Zoller und Smith, 1983).

Zur Hybridisierung des Oligonukleotids mit der einzelsträngigen Plasmid-DNA wurden ca. 100 ng einzelsträngige Plasmid-DNA und ca. 3 pmol Oligonukleotid in 20 mM Tris/HCl (pH 7,3 bei 37°C), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl in einem Gesamtvolumen von 10 µl auf 85°C erhitzt, in ca. 1 h allmählich auf 40°C abgekühlt und schließlich für 10 min in Eiswasser inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 2 µl 5x Synthese-Puffer (jeweils 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 5 mM ATP, 50 mM Tris/HCl, pH 7,3 bei 37°C, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), sowie 0,5 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl, GibcoBRL) und 0,5 µl T4-DNA-Polymerase (NEB) gegeben. Es erfolgte Inkubation für 10 min bei RT und anschließend für 2h bei 37°C. Danach wurde die Synthese-Reaktion durch Zugabe von 40 µl 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA abgestoppt. 10 µl des Ansatzes wurden durch Gelelektrophorese auf erfolgte Doppelstrang-DNA-Synthese untersucht. 15 µl des Heteroduplex-DNA-haltigen Ansatzes wurden zur Transformation des *E. coli*-Stammes XL1Blue eingesetzt und die Transformanten zur Amplifikation von mutierter Plasmid-DNA kultiviert.

### 2.24 Herstellung von Zellextrakten aus *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von Zellextrakten für Western-Analysen wurden 5 OD<sub>600</sub>-Einheiten Zellen einer exponentiell wachsenden Hefekultur bei 3000 x g 3min abzentrifugiert, mit 0,5 Vol. H<sub>2</sub>O gewaschen und in 300 µl Lysispuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 1% Triton X-100) mit je 20 µg/ml der Proteaseinhibitoren Antipain, Aprotinin, Chymostatin, Leupeptin und Pepstatin sowie 1 mM PMSF resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Glasperlen (Ø 0,45 mm) erfolgte der Aufschluß der Zellen durch dreiminütiges Schütteln auf einem IKA-Vibrax-VXR (Janke & Kunkel) bei max. Geschwindigkeit. Unlösliche Zellbestandteile wurden 10 min bei 15000 x g und 4°C abzentrifugiert.

### 2.25 Herstellung von Zellextrakten aus L-Zellen von *Mus musculus*

Zur Western-Analyse von Zellextrakten aus L-Zellen wurden die Zellen zunächst in PBS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 1/3 Volumen 3 x Laemmli-Probenpuffer durch fünfminütiges Kochen lysiert. Nach Zentrifugation bei 15000 x g für 15 min wurde der Überstand für die weitere Analyse abgenommen.

## 2.26 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) wurde mit dem Proteintest-Farbreagenz der Firma BioRad durchgeführt. Von diesem wurden 200 µl zu in 800 µl H<sub>2</sub>O verdünntem Zellextrakt gegeben und die Extinktion bei 595 nm gegen die Nullprobe photometrisch bestimmt. Als Standard wurde BSA der Firma Biolabs benutzt.

## 2.27 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese von Laemmli (1970).

Es wurde ein 4%iges Sammelgel (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,05% TEMED, 4% Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8) und ein 7 - 12%iges Trenngel (0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS, 0,03% APS, 0,067% TEMED, 7% Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8) verwendet. Der Laufpuffer enthielt 0,125 M Tris-HCl, 0,96 M Glycin, 0,1% SDS (pH 8,3). Als Molekulargewichts-Standard diente der „Rainbow coloured protein molecular weight marker RPN 755“ der Firma Amersham Life Science. Die Proben wurden vor der Auftrennung in Probenpuffer zur Endkonzentration 50 mM Tris/HCl, 10% Glycerin, 2% SDS, 0,01 % Bromphenolblau, 1% β-Mercaptoethanol aufgenommen.

Es wurden das „Mini Protean II“-System der Firma BioRad oder die Hoefer SE400 Serie von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V bzw. 150 V.

## 2.28 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mittels „Elektroblot“ (Trans-Blot Cell, BioRad) auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Übertragung erfolgte im Transfer-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 190 mM Glycin, 20% Methanol, 0,1% SDS) bei 60 - 70 V für 1 - 1,5 h. Nach dem Transfer wurde die Proteine auf der Membran durch Schwenken in Fixierlösung (10% Essigsäure, 25% Isopropanol) fixiert. Nach dem Waschen der Membran mit Wasser folgte das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen durch Schwenken in PBST (137mM NaCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 0,1% Tween20) mit 3% Magermilchpulver („Blotting Grade Blocker“, BioRad) für 1 h. Für die Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran mit 1:5000 verdünntem Maus-Anti-HA-Antikörper in PBST mit 3% Magermilchpulver 1 h geschwenkt. Es folgten Waschen der Membran für 2 x 5 min in PBST und 2 x 5 min in Waschpuffer (1M NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5% Tween20) sowie zehninütige Inkubation in PBST mit 3% Magermilchpulver. Danach wurde die Membran 1 h mit 1:2000 verdünntem sekundärem Antikörper (Anti-Maus-IgG, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase) in PBST mit 3% Magermilchpulver geschwenkt. Das anschließende

Waschen der Membran wurde durch Schwenken für jeweils 2 x 5 min in PBST, in Waschpuffer, erneut in PBST und schließlich für 2 min in PBS (entspricht PBST ohne Tween 20) durchgeführt. Der enzymkatalysierte Nachweis der gebundenen Antikörper mittels Chemilumineszens erfolgte unter Benutzung des ECL-Systems der Firma Boehringer Mannheim und Exposition von Röntgenfilmen.

Bei der Western-Analyse von Rohextrakten aus L-Zellen von *Mus musculus* wurde der affinitätsgereinigte Anti-HsUmp1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 oder 1:100 eingesetzt. Der Anti LMP7-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurden Anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase aus Esel (Amersham Pharmacia Biotech)) in einer Verdünnung von 1:4000 benutzt.

## 2.29 Quantitative Bestimmung der spezifischen $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Hefelysaten

Zur Bestimmung der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine wurden Hefezellen aus 5 ml einer SD-Kultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,7-1,0 abzentrifugiert, das Pellet mit 1,5 ml  $H_2O$  gewaschen und in 100  $\mu$ l Z-Puffer (0,1 M Na-Phosphat, 10 mM KCl, 1 mM  $MgSO_4$ , 0,27%  $\beta$ -Mecaptoethanol) resuspendiert. Nach Zugabe von ca. 50  $\mu$ l Glasperlen erfolgte der Aufschluß der Zellen durch zweiminütiges Schütteln auf einem IKA-Vibrax-VXR (Janke & Kunkel). Die Glasperlen, Zelltrümmer und unlösliches Material wurde dann durch Zentrifugation für 10 min bei 15000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand (Zellextrakt) wurde für eine Proteinkonzentrationsbestimmung (nach Bradford) sowie die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität verwendet. Für die kinetische Messung wurde CPRG (Chlorphenolrot- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) als Substrat verwendet, welches in einer Endkonzentration von 1 mM dem in 1 ml Z-Puffer verdünntem Zellextrakt zugesetzt wurde. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Extinktionsänderung der Probe bei einer Wellenlänge von 574 nm (Kontron Instruments) bei 30°C über einen Zeitraum von 20 min. Die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde in mU/mg Zellextraktprotein berechnet. Eine Enzymeinheit U entspricht der Enzymmenge, die 1  $\mu$ mol Substrat (CPRG) in einer Minute umsetzt.

$$\text{spezifische } \beta\text{-Galaktosidase-Aktivität} = \frac{\Delta E_{574} / \Delta t \times \text{Meßvolumen}}{\epsilon_{547}(\text{CPR}) \times \text{Vol. (ZE)} \times \text{Proteingehalt (ZE)}}$$

ZE: Zellextrakt

Vol.: Volumen

$\Delta E_{574} / \Delta t$ : Extinktionsänderung über der Zeit

$\epsilon_{547}(\text{CPR})$ : Extinktionskoeffizient von freiem Chlorphenolrot bei 574 nm =  $75 \text{ mmol}^{-1} \times \text{l} \times \text{cm}^{-1}$

## 2.30 Untersuchung der Proteinstabilität durch „Pulse-Chase“-Analyse

### 2.30.1 Vorübergehende *in vivo* Markierung von Protein mit [<sup>35</sup>S]-Methionin („Pulse“)

Hefezellen einer bis zur OD<sub>600</sub> von 0,7 - 1,0 gewachsenen SD-Kultur wurden abzentrifugiert und in 0,8 ml 2x SD-Medium ohne Methionin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,6 ml 2x SD-Medium ohne Methionin aufgenommen und durch Zugabe von ca. 240 µCi [<sup>35</sup>S]-Methionin, gefolgt von fünfminütigem Schütteln bei 30°C markiert. Im folgenden wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 sec bei 15000 x g pelletiert, in 300 µl 2x SD-Medium mit 10 mM unmarkiertem Methionin und 64 µg Cycloheximid resuspendiert und unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt sowie nach 10 und 30 min erfolgte die Entnahme von 100 µl Aliquots. Diese wurden in je ein eisgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 400 µl Glasperlen, 600 µl Lysis-Puffer (50 mM Hepes pH 7,5; 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 1% Triton X-100) und je 20 µg/ml der Proteaseinhibitoren Antipain, Aprotinin, Chymostatin, Leupeptin und Pepstatin sowie 10 mM NEM überführt. Schließlich wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C über Nacht gelagert.

Nach Auftauen der Zellsuspensionen erfolgte der Aufschluß der Zellen durch dreiminütiges Schütteln auf einem IKA-Vibrax-VXR (Janke & Kunkel). Nach Zentrifugation für 10 min bei 15000 x g und 4°C wurde der Überstand für TCA-Präzipitation bzw. Immunopräzipitation verwendet .

### 2.30.2 Quantifizierung des radioaktiv markierten Proteins mittels TCA-Präzipitation

Zur Quantifizierung des Einbaus radioaktiven [<sup>35</sup>S]-Methionins in zelluläre Proteine wurden diese zunächst von nicht inkorporiertem Methionin getrennt . Dies erfolgte durch TCA-Präzipitation der Proteine. Dazu wurden je 3 µl der Zellextrakte auf ein Antibiotika-Testplättchen gegeben. Dieses wurde nach zehnteilminütigem Trocknen zweimal in 10% TCA getaucht mit anschließendem Absaugen der Flüssigkeit durch Auflegen auf ein Papierhandtuch. Es folgte fünfminütiges Kochen des Plättchens in siedender 10%iger TCA und erneutes zweimaliges Eintauchen in 10% TCA bei RT gefolgt von Auflegen auf ein Papierhandtuch. Anschließend wurde das Testplättchen zweimal in Ethanol getaucht, bei 65°C für 10 min getrocknet und in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A der Firma Zenssen) gegeben. Die Radioaktivität der Probe wurde schließlich mit Hilfe des Szintillationszählers der „LS8000 Series“ der Firma Beckmann quantifiziert.

### 2.30.3 Immunpräzipitation von $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteinen

Zu Zellextrakten mit gleichen Mengen an radioaktiv markierten Proteinen wurden je 0,5  $\mu$ g monoklonale anti- $\beta$ -Galaktosidase-Antikörper gegeben. Die Proben wurden mit Lysis-Puffer auf gleiches Volumen gebracht (ca. 600  $\mu$ l) und über Nacht auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 40  $\mu$ l Protein A-Sepharose (100 mg/ml) erfolgte Inkubation für 3 - 4 h bei 4°C in einem Rotationsinkubator. Nun wurden die Proben 2 sek abzentrifugiert und die pelletierten Protein A-Sepharose-Immunkomplexe dreimal mit 0,8 ml eiskaltem Lysis-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5; 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 1% Triton X-100) mit 0,1% SDS gewaschen. Die Pellets wurden anschließend mit je einem Volumenteil 2x Laemmli-Probenpuffer mit 4%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, zur Denaturierung 3 min gekocht, 30 sec zentrifugiert und die Überstände zur Auftrennung des immunpräzipitierten Materials auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen.

### 2.31 Immunpräzipitation von proteasomalen Komplexen

Der *S. cerevisiae*-Stamm JD59 wurde mit den für verschiedene Ump1p codierenden Plasmiden pJD248, pJH32, pJH33, pJH34, pJH44 und pJH45 bzw mit pJDCEX2 transformiert. Die Kultivierung der Transformanten sowie der Aufschluß der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.24 beschrieben. Die Immunpräzipitation proteasomaler Komplexe erfolgte unter Benutzung von Kaninchen-Anit-20S-Proteasom-Antikörper (2  $\mu$ g je Ansatz) wie in 2.30.3 beschrieben, mit dem Unterschied, daß die Waschschrte der Protein A-Sepharose-Immunkomplexe mit Lysis-Puffer ohne Zusatz von SDS erfolgten.

### 2.32 Fraktionierung von Hefezellextrakten durch Gelfiltration

Die Fraktionierung von Hefezellextrakten durch Gelfiltration wurde nach der Methode von P. C. Ramos *et al.*, (1998) durchgeführt.

#### 2.32.1 Herstellung von Zellextrakten aus *S. cerevisiae* für Fraktionierung durch Gelfiltration

Hefezellen wurden in 200 ml SD Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,5 angezogen, bei 3000 x g abzentrifugiert, mit 100 ml eiskaltem Wasser gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Zerreiben der gefrorenen Zellen mit einem Stößel im Mörser unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff. Danach wurden 2 ml Extraktionspuffer (50mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 15% Glycerol) pro g Frischgewicht zum Hefelysat gegeben und die Suspension bei 31.000 x g und 2°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde einer

zweiten Zentrifugation bei 60.000 x g und 2°C für 30 min unterzogen und in dem daraus gewonnenen Überstand die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Für die Gelfiltration wurden 800 µg Protein in 200 µl Extraktionspuffer eingesetzt. Die Chromatographie erfolgte über eine mit Extraktionspuffer äquilibrierte Superose-Säule (Superose 6 HR 10/30 der Firma Pharmacia Biotech) unter Benutzung des FPLC-Systems Biosys 2000 der Firma Beckmann. Das Säulenvolumen betrug 24 ml, die Durchflußrate 0,3 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,6 ml gesammelt und die Fraktionen 12 - 30 für Peptidase-Aktivitätsmessungen sowie Western-Analysen eingesetzt.

### **2.33 Messung der spezifischen Peptidase-Aktivität der proteasomalen $\beta$ -Untereinheit Pre2p**

Die Messung der für die  $\beta$ -Untereinheit Pre2p spezifischen chymotrypsin-ähnlichen Aktivität erfolgte nach der Methode, beschrieben von Ramos *et al.* (1998). Die Messung erfolgte unter Benutzung des synthetischen Substates N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-amid-4-Methylcoumarin (Bachem). Die katalytische Aktivität des Pre2-Proteins führt zur Peptidspaltung des Substates hinter dem Aminosäurest Tyrosin. Die Quantifizierung der Fluoreszenz des freigesetzten Produkts 7-Amid-4-Methylcoumarin im Spektrofluorimeter dient als Maß für die proteolytische Aktivität. Bei den durchgeführten Messungen wurden jeweils 20 µl der durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen mit 20 µl Extraktionspuffer (2.32.1) versetzt mit 1 µl einer 10 mg/ml konzentrierten Substrat-Stocklösung (in 0,2 M NaOH) gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1,36 ml -20°C kaltem, 96%igem Ethanol abgestoppt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm mit einer Spaltbreite von 5 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm mit einer Spaltbreite von 2,5 nm im Spektralfluorimeter (Perkin Elmer, LS 50B). Verifiziert wurde, daß die Messung im linearen Bereich durchgeführt wurde.

### **2.34 Aufreinigung des heterolog exprimierten HsUmp1-Proteins**

#### **2.34.1 Generierung des Plasmids zur Expression von 6xHis-Epitop-markiertem HsUmp1-Protein**

Die codierende Sequenz des menschlichen *UMP1*-Gens wurde nach Restriktion des Plasmides pJH30 mit den Restriktionsendonukleasen *Bgl*III und *Kpn*I und gelektrophertischer Trennung der geschnittenen Plasmid-DNA aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Sie wurde mit dem durch *Bam*HI und *Kpn*I restringierten *E. coli*-Expressionsvektor pQE-40 ligiert („pJH31“) und in *E. coli* amplifiziert (2.17). Die Insertion führt zu einer Fusion einer für sechs

(N-terminale) Histidin-Reste codierenden Sequenz mit der *HsUMP1*-cDNA ohne Unterbrechung des Leserahmens

### 2.34.2 Expression von 6xHis-Epitop-markiertem *HsUmp1*-Protein in *E. coli*

Zur heterologen Expression des 6xHis-Epitop-markierten *HsUmp1*p wurde der *E. coli* Stamm M15 (pREP4) mit dem Plasmid pJH31 transformiert. Transformierte Zellen wurden über Nacht in LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin angezogen. Die Zellen dieser Vorkultur wurden in LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Es erfolgte Zugabe von IPTG zur Endkonzentration von 1 mM und Inkubation für 1,5 h. Die Zellen wurden für fünf min bei 5000 x g abzentrifugiert.

Zur Expressionskontrolle wurde das Zellsediment aus zwei OD<sub>600</sub> Einheiten für 5 min in 150 µl Laemmli-Probenpuffer gekocht und nach zehnmündiger Zentrifugation bei 15000 x g wurde der Überstand für die weitere Analyse abgenommen.

Zur Untersuchung der Löslichkeit des 6xHis-*HsUmp1* wurden Aufschlüsse unter nativen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde das Zellsediment aus fünf OD<sub>600</sub>-Einheiten in 300 µl Lysispuffer ( 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10 mM Imidazol) mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 200 µl Glasperlen drei min im Vibrax geschüttelt. Nach Zentrifugation für zehn min bei 15000 x g wurde der Überstand für weitere Analysen abgenommen. Analog wurde dieser Aufschluß mit PBS (137 mM NaCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM KCl, pH 8,0) als Lysispuffer durchgeführt.

### 2.34.3 Aufreinigung des 6xHis-Epitop-markierten *HsUmp1*-Proteins durch Affinitätschromatographie

Mit IPTG induzierte *E. coli* - Zellen aus 800 ml Kultur (siehe 2.34.2) wurden 10 min bei 5000 x g abzentrifugiert, in 50 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 2 ml 25mM Tris/HCl pH 8, 10% Glycerin, 0,5% SDS, 0,5% β-ME gekocht. Nach Zentrifugation bei 15000 x g für 10 min wurde der Überstand in 8 ml Puffer B (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) aufgenommen.

2 ml 50 %ige Ni-NTA-Matrix (Ni-NTA Agarose der Firma Qiagen) wurden zweimal in 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen (1 min Zentrifugation bei 500 x g) und für 30 min in 1 ml Puffer B äquilibriert. Die Matrix wurde anschließend in dem in Puffer B aufgenommenen Zellextrakt für 1,5 h geschwenkt. Anschließend wurde mit der Matrix eine Säule von 1 cm Durchmesser gepackt, der Durchlauf aufgefangen und die Säule wie folgt gewaschen:

1. 5 ml 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl pH 8,0
2. 3 ml 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris/HCl pH 6,3

3. 3 ml 8 M Harnstoff, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris/HCl pH 6,1

Anschließend erfolgte Elution der an die Ni-NTA-Matrix gebundenen Proteine in drei Elutionsschritten durch Zugabe von je 1 ml 8 M Harnstoff, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM Tris/HCl pH 4,6.

Die Fraktionen aller Wasch- und Elutionsschritte wurden aufgefangen und durch SDS-PAGE gefolgt von Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung analysiert.

#### **2.34.4 Aufreinigung des 6xHis-Epitop-markierten *HsUmp1*-Proteins durch Gel-Elektrophorese und Elektro-Elution**

Das von der Ni-NTA-Matrix eluierte Protein (aus Elutionsschritt 2, siehe 3.11.2) wurde in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel (Dimension des Trenngels: 1450 x 900 x 3 mm) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte durch zehnmütige Inkubation des Gels in eiskalter KCl-Lösung (1M). Die deutlich weißlich gefärbte Bande des *HsUmp1*-Proteins wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein durch Elektro-Elution im Electro-Eluter der Firma BioRad eluiert. Dies erfolgte unter Verwendung von 0,125 M Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS als Laufpuffer bei 30 mA für 6,5 h. Das Volumen des Eluats betrug 2 ml.

#### **2.35 Affinitätsreinigung des Anti-*HsUmp1*-Antikörpers aus Antiserum**

Es wurden ca. 500  $\mu\text{g}$  des über Ni-NTA-Säule aufgereinigten 6xHis-*HsUmp1*-Proteins (in Elutionspuffer, siehe 2.34.3) mit 1 Volumenteil  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt auf eine 15  $\text{cm}^2$  große, in Methanol äquilibrierte PVDF-Membran geträufelt. Nach Waschen der Membran mit PBST für 5 min, wurde sie für 45 min in PBST, 3% Magermilchpulver inkubiert (2.28). Anschließend wurden 3 ml des Antiserums in 15 ml PBST, 3% Magermilchpulver zu der Membran gegeben und für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgten Waschschritte wie in 2.28 beschrieben nach Inkubation mit dem 1. Antikörper. Nach zweimaligem Waschen in PBS für 2 min wurden 1,3 ml einer 0,2 M Glycin-Lösung (pH 2,5) auf die Membran geträufelt und für 1 min leicht geschwenkt. Diese Lösung wurde in 12 Aliquots von 100  $\mu\text{l}$  durch Zugabe zu jeweils 50  $\mu\text{l}$  1 M Tris/HCl neutralisiert (ergibt  $\text{pH} \geq 7,5$ ), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.36 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen durch Aufreinigung über Säulenmatrix-gebundenes Protein

### 2.36.1 Konstruktion der Plasmide für die Expression von GST-Ump1p-Fusionsprotein sowie proteasomaler $\beta$ -Untereinheiten

Für die Expression eines Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase (GST) und dem Ump1-Protein aus *S. cerevisiae* wurde der *E. coli*-Expressionsvektor pGEX-2T (Pharmacia) benutzt, welches für die GST aus *Schistosoma japonicum* codiert. Die Amplifikation der codierenden DNA des *UMP1*-Gens aus genomischer DNA des Stammes JH47-13C erfolgte unter Benutzung von Oligonukleotiden als „Primer“, die flankierende *Bam*HI bzw. *Eco*RI-Schnittstellen besitzen. Nach Aufreinigung des PCR-Produktes wurde es mit den entsprechenden Enzymen restringiert und das Fragment nach gelelektrophoretischer Trennung aus dem Gel isoliert. Das Fragment wurde anschließend mit dem analog restringierten Vektor pGEX-2T ligiert, was zur Fusion mit der für GST codierenden Sequenz, ohne Unterbrechung des Leserahmens führt. Das daraus resultierende Plasmid pJH56, wie auch die im folgenden beschriebenen wurden in *E. coli* amplifiziert (2.17) und die korrekte Insertion durch Sequenzanalyse überprüft.

Für die Generierung von Plasmiden zur Expression von zweifach HA-Epitop-markierten Pre2-, Pre3- und Pup1-Vorläuferproteinen wurden die für diese Proteine codierende DNA per PCR amplifiziert. *PRE2* wurde unter Benutzung von Oligonukleotid JD280 und JD301 mit DNA von Stamm JD47-13C als Matrize amplifiziert. Im Falle von *PUP1* und *PRE3* wurden DNA-Fragmente amplifiziert welche die codierenden Sequenzen der Gene, fusioniert mit der für das HA-Epitop codierenden Sequenz, gefolgt von einer *Xba*I-Restriktionstelle beinhalten. Als Matrizen wurde hierbei die DNA der Hefestämme JD135 bzw JD131 benutzt, die diese Sequenzen (gefolgt vom *CYC1*-Terminator) als chromosomale Integration tragen. *PRE3* wurde unter Benutzung der Oligonukleotide OF465 (mit 5'-flankierender *Bgl*II-Schnittstelle) und JD290, *PUP1* unter Benutzung der Oligonukleotide JD286 (mit flank. *Eco*RI-Schnittstelle) und JD290 amplifiziert. Aufreinigung der PCR-Produkte vor und nach Restriktion mit *Bgl*II und *Xba*I bzw. *Eco*RI und *Xba*I erfolgte wie oben beschrieben. Die DNA-Fragmente wurden mit dem analog restringierten Hochkopienzahl-Vektor pJDCEX2 (vgl. Tab. 6) ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide pJH58, pJH62 und pJH61 codieren für die mit zweifach HA-Epitop-markierten Proteine unter Kontrolle des kupferinduzierbaren  $P_{CUP1}$ -Promotors.

Plasmid pJH65 codiert für die Fusion aus Ubiquitin und dem reifen Teil des Pre3-Proteins und ist ein Derivat von pJH62. Die für Ubiquitin-Pre3p codierende Sequenz wurde durch Restriktion mit *Bam*HI (5' von *PRE3*) und *Pst*I (im 3'-Ende von *PRE3*) aus Plasmid isoliert und mit dem *Bgl*II (5' von *PRE3*) und *Pst*I geschnittenen Plasmid pJH62 ligiert.

Plasmid pJH63 codiert für die Fusion aus Ubiquitin und dem reifen Teil des Pre2-Proteins und wurde folgendermaßen konstruiert. Aus dem Plasmid pJD577, welches ebenfalls die für diese Fusion codierenden DNA enthält, wurde mit *XhoI* (in *UBI*) und *KpnI* (3' vom *PRE2*) restringiert und das Fragment isoliert. Dieses wurde mit einem analog geschnittenen pJDCEX2-Derivat ligiert, welches die codierende Sequenz von Ubiquitin enthält.

### **2.36.2 Herstellung von Zellextrakten aus GST- und GST-Ump1-Fusionsprotein-exprimierenden *E. coli*-Zellen**

Zur Expression von Glutathion-S-Transferase (GST) bzw. GST-Ump1-Fusionsproteinen wurde der *E. coli* Stamm BL21 (pDE3) mit den Plasmiden pGEX-2T bzw pJH56 (pGEX-2T-*ScUMP1*) transformiert. Die Transformanten wurden in LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert und nach Zugabe von 1 mM IPTG für weitere 1,5 h induziert.

Ca. 200 OD<sub>600</sub>-Einheiten wurden in 10 ml PBS (137 mM NaCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1 mM KCl, pH 7,6) gewaschen und in 1 ml Lysispuffer (PBS, 1% Triton X-100, pH 7,6 mit Proteaseinhibitoren („Complete“, Boehringer) resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden 1,5 mg/ml Lysozym sowie 400 µl Glasperlen gegeben. Es erfolgte Inkubation bei RT für 10 min gefolgt von 10-minütiger Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen dreimal (bei zwischenzeitlicher Kühlung auf Eis) für 1,5 min im Vibrax-Schüttler geschüttelt. Nach Zugabe von 300 µl Lysispuffer erfolgte Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 10 min und Ultrazentrifugation des Überstandes bei 50000 x g und 4°C für 20 min. Zum Überstand wurde Glycerin zur Endkonzentration von 10% gegeben. Nach Aliquotierung des Zellextraktes wurde dieses in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.36.3 Aufreinigung von GST und GST-Ump1-Fusionsproteinen durch Bindung an Glutathion-Sepharose-Matrix**

Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) wurde zunächst zweimal mit zehnfachem Volumen PBS, 1% Triton X-100 gewaschen und für 30 min in fünffachem Volumen Lysispuffer (siehe 2.36.2) äquilibriert. Zu je 50 µl Glutathion-Sepharose erfolgte Zugabe von Lysispuffer und dem Zellextrakt aus 50 OD<sub>600</sub>-Einheiten der GST- bzw GST-Ump1-Protein exprimierenden *E. coli* (siehe 2.36.2) zu einem Gesamtvolumen von 400 µl. Nach Schwenken der Ansätze für 30 min wurde die Glutathion-Sepharose durch Zentrifugation bei 200 x g für 1 min sedimentiert und die Überstände abgenommen. Das Waschen der Sepharose erfolgte zweimal mit 500 µl Lysispuffer und einmal mit 500 µl NT-N-Puffer (20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 1 mM DTT, pH 7,6; 3,6 mg/ml Proteaseinhibitoren-Mix „Complete“, Boehringer (Mannheim)). Hierzu wurde die Sepharose wie zuvor bei 200 x g für 1 min

sedimentiert. Die mit GST bzw. GST-Ump1p beladene Glutathion-Sepharose wurde für anschließende Aufreinigungs-Experimente eingesetzt.

#### **2.36.4 Herstellung von Hefe-Zellextrakten für die Aufreinigung über matrixgebundenes GST-Ump1-Fusionsprotein**

Zur Überexpression von zweifach HA-Epitop-markierten proteasomalen Untereinheiten wurden die entsprechenden Hefetransformanten in SD-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von ca. 0,8 kultiviert. Nach Zugabe von  $CuSO_4$  zu einer Endkonzentration von 100  $\mu M$  wurden die Zellen bis zu einer  $OD_{600}$  von 2-2,5 weiter kultiviert. 20  $OD_{600}$ -Einheiten wurden zunächst in 20 ml  $H_2O$  gewaschen und in 600  $\mu l$  NT-N-Puffer (siehe 2.36.3) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 400  $\mu l$  Glasperlen dreimal für 1,5 min im Vibrax mit Zwischenkühlung auf Eis geschüttelt. Es erfolgte Zugabe von 300  $\mu l$  Lysispuffer und Zentrifugation für 10 min bei 15000 x g und 4°C. Der Überstand wurde anschließend bei 50000 x g und 4°C für 20 min erneut zentrifugiert. Zum Überstand wurde Glycerin zu einer Endkonzentration von 10 % gegeben. Nach Aliquotierung und Schockgefrieren in flüssigem  $N_2$  wurden die Zellextrakte bei -80°C gelagert. Für die Gewinnung von Zellextrakten, welche frei von Komplex-gebundenen proteasomalen Untereinheiten sind, wurden die Extrakte nach der Ultrazentrifugation unter Benutzung von „Ultrafree-0,5 Centifugal Filter Devices Biomax 100“ filtriert (nach Angaben des Herstellers Amicon) und die Filtrate, wie zuvor beschrieben, eingefroren und gelagert.

#### **2.36.5 Aufreinigung der Hefezellextrakte über matrixgebundenes GST-Ump1-Fusionsprotein**

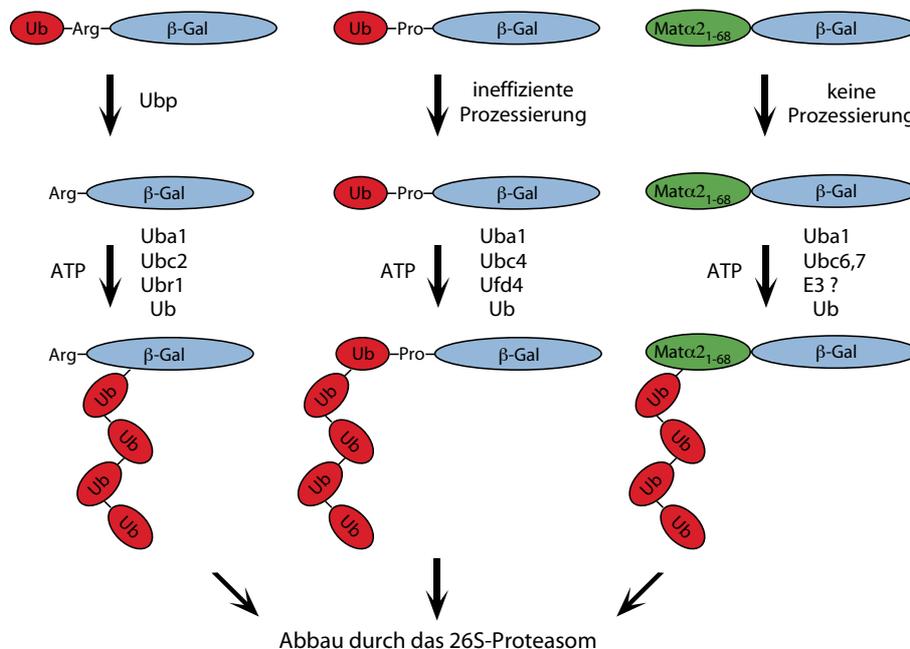
Je 10  $\mu l$  der mit GST bzw GST-Ump1p beladenen Glutathion-Sepharose wurden mit 100  $\mu l$  NT-N-Puffer in jeweils eine 200  $\mu l$  fassende Pipettenspitze gefüllt, die zuvor durch Einfüllen von Glaswolle in der Spitze für die Sepharose undurchlässig gemacht wurde. Nach Durchfluß des Puffers wurde jeweils eine definierte Menge Hefezellextrakt (2.36.4) in 50  $\mu l$  NT-N Puffer auf die Mini-Säule gegeben. Nach Durchfluß (ca. 15 min dauernd) wurden die Säulen dreimal mit je 100  $\mu l$  NT-N-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Glaswolle beinhaltende Spitze der Mini-Säulen unter Benutzung einer frischen Skalpellklinge vorsichtig abgeschnitten und die Säulenmatrix nach Zugabe von 20  $\mu l$  Wasser und Aufsetzen einer Gilson-Pipette in eine Eppendorfgefäß gedrückt. Die Sepharose-Matrix wurde nach Zugabe von 30  $\mu l$  zweifach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer gekocht und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde schließlich zum immunologischen Nachweis der Epitop-markierten proteasomalen Untereinheit eingesetzt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Charakterisierung der *ump1* $\Delta$ -Mutante

Die *ump1*-Mutante („ubiquitin mediated proteolysis“) wurde ursprünglich in einem genetischen „Screening“-Verfahren isoliert (Ramos *et al.*, 1998). Dieses Verfahren beruhte auf der Selektion von spontan entstehenden Mutanten der Hefe *S. cerevisiae* mit Defekten in der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse. Als Testsubstrate wurden dabei solche verwendet, die gemäß der „N-end rule“ abgebaut werden (siehe Einleitung 1.2). Die Isolierung des *UMP1*-Gens erfolgte durch Transformation der *ump1*-Mutante mit einer Genbank aus genomischer Hefe-DNA und der anschließenden Selektion von Transformanten, bei denen der Proteolysedefekt bezüglich der N-end rule-Testsubstrate aufgehoben war (Ramos *et al.*, 1998).

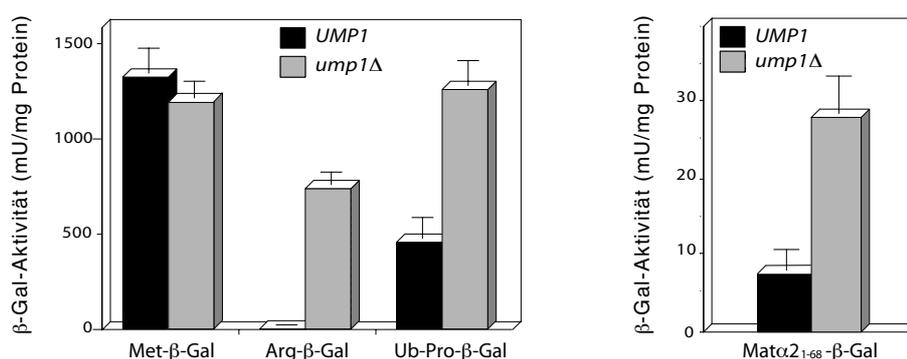
Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst eine phänotypische Charakterisierung einer Mutante vorgenommen, bei der die komplette codierende Sequenz des *UMP1*-Gens deletiert worden war. Ziel dieser Untersuchungen war es, das Ausmaß der Defekte zu ermitteln und Hinweise auf deren Ursprung zu gewinnen. Dazu wurden der Wildtyp-Stamm JD47-13C und die *ump1* $\Delta$ -Mutante (Stamm JD59) mit Plasmiden transformiert, die zur Expression verschiedener artifizieller Testsubstrate der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse führen (Abb. 5).



**Abb. 5: Abbauwege verschiedener Testsubstrate der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.** (Erklärungen siehe Text)

Zwei der Plasmide codieren für Fusionsproteine, in denen Ubiquitin (Ub) entweder über einen Argininrest (Plasmid pUb23R) oder einen Methioninrest (Plasmid pUb23M) mit der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) aus *E. coli* verknüpft ist. Das Ubiquitin-Molekül wird (vermutlich kotranslational) von deubiquitinierenden Enzymen (Ubp) abgespalten. Dies führt zur Generierung von  $\beta$ -Gal-Proteinen mit N-terminalem Arginin- bzw. Methioninrest. N-terminales Arginin gehört nach der „N-end rule“ zu den destabilisierenden Aminosäuren und führt somit zum raschen Abbau der  $\beta$ -Gal, während Methionin als stabilisierende Aminosäure der  $\beta$ -Gal eine Halbwertszeit von mehreren Stunden verleiht. Letzteres Testsubstrat dient somit zur Expressionskontrolle für die folgenden Untersuchungen. Das Fusionsprotein Ub-Prolin- $\beta$ -Gal (Plasmid pUb23P) wird nur ineffizient von Ubp-Enzymen prozessiert und die unprozessierte Form unabhängig vom „N-end rule-Weg“ von anderen Enzymen des Ubiquitin-Systems („UFD-Weg“) erkannt (Johnson *et al.*, 1995). Ein weiteres Testsubstrat der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse stellt eine Fusion aus den ersten 68 Aminosäuren des Mat $\alpha$ 2-Repressors der Hefe *S. cerevisiae* mit der  $\beta$ -Galaktosidase dar. Das Mat $\alpha$ 2-Protein ist ein kurzlebiger, den Zelltyp der Hefe regulierender Transkriptionsrepressor (s. Einleitung 1.2). Der N-terminale Anteil des Mat $\alpha$ 2-Proteins beinhaltet das Abbausignal „Deg1“, welches von spezifischen Enzymen des Ubiquitin-Systems erkannt wird (s. Einleitung und Abb. 5). Da die Expression des *MAT $\alpha$ 2*-Gens zelltypspezifisch ist, wurde die Stabilität in Transformanten der *MAT $\alpha$* -Stämme JD53 (Wt) und JD81-1A (*ump1 $\Delta$* ) untersucht (Plasmid YCp50-Mat $\alpha$ 2<sub>1-68</sub>- $\beta$ -Gal).

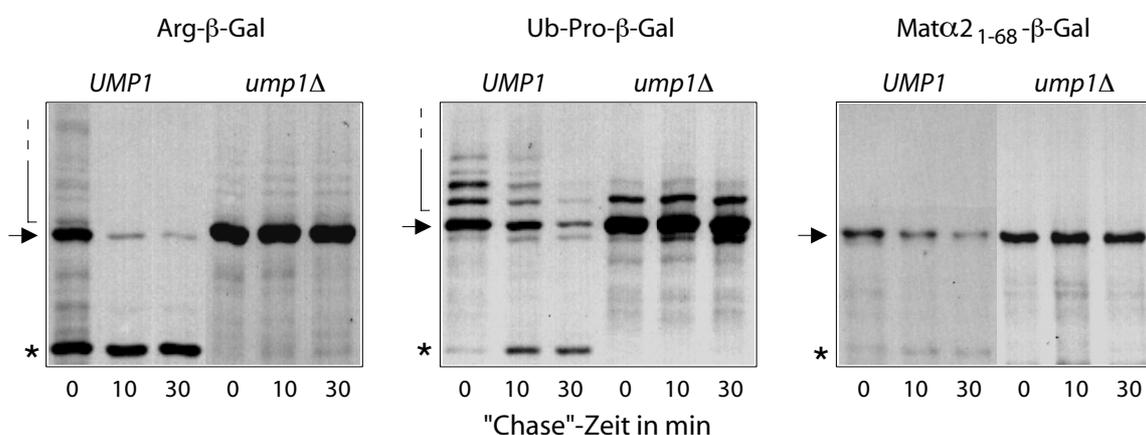
Von den zuvor beschriebenen Hefetransformanten wurden Zellextrakte hergestellt und zur Bestimmung der Gleichgewichts-Konzentrationen der verschiedenen Testsubstrate die spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 6. zusammengefaßt.



**Abb. 6: Spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der verschiedenen Testsubstrate Ubiquitin-vermittelter Proteolyse in Wildtyp und *ump1 $\Delta$* -Mutante.** Wildtypzellen und Zellen der *ump1 $\Delta$* -Mutante wurden mit den für verschiedene  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine (siehe Abb.5) codierenden Plasmiden pUb23M, pUb23R, pUb23P sowie YCp50- $\alpha$ 2<sub>1-68</sub>- $\beta$ -Gal transformiert. Die enzymatische Aktivität wurde in Zellextrakten aus exponentiell wachsenden Kulturen der verschiedenen Transformanten durch Umsatz des Substrates CPRG über 20 min bei 37°C ermittelt (s. Abschnitt 2.28). Die Aktivitäten entsprechen den Mittelwerten aus den Messungen von Zellextrakten aus fünf unabhängigen Transformanten und sind für die Wildtypzellen als schwarze Säulen und für die *ump1 $\Delta$* -Mutante als graue Säulen dargestellt. Die Standardabweichungen sind durch Querbalken über den Säulen dargestellt.

Wie aus den Ergebnissen der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsmessungen hervorgeht, ist die Gleichgewichts-Konzentration des „N-end rule“-Substrates Met- $\beta$ -Galaktosidase aufgrund seiner stabilisierenden N-terminalen Aminosäure in Zellen des Wildtyps und der *ump1 $\Delta$* -Mutante ungefähr gleich groß. Das nach der „N-end rule“ sehr kurzlebige Fusionsprotein Arg- $\beta$ -Galaktosidase liegt hingegen in den Zellextrakten der *ump1 $\Delta$* -Mutante in ungefähr 90-fach höherer Konzentration vor als in denen von Wildtypzellen. Die Testsubstrate Ub-Pro- $\beta$ -Gal sowie Mat $\alpha_{21-68}$ - $\beta$ -Gal sind ebenfalls in der *ump1 $\Delta$* -Mutante deutlich höher konzentriert als in Wildtypzellen. Die gemessenen spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten betragen für die Mutante jeweils das drei- bis vierfache des Wertes für die Wildtypzellen.

Um zu verifizieren, daß die unterschiedlichen  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten nicht auf unterschiedlicher Expression oder Aktivität der Testsubstrate in Wildtyp und Mutante beruhen, sondern auf einen Defekt in der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse der *ump1 $\Delta$* -Mutante zurückzuführen sind, erfolgte anschließend die Untersuchung der metabolischen Stabilität der verschiedenen Testsubstratproteine. Dazu wurden „Pulse Chase“-Experimente mit den entsprechenden Transformanten von Wildtyp und *ump1 $\Delta$* -Mutante durchgeführt. Diese Analysen beruhen auf einer kurzen vorübergehenden *In-vivo*-Markierung („Pulse“) von Proteinen mit radioaktivem [ $^{35}$ S]-Methionin mit einer anschließenden Inkubation in Anwesenheit eines Überschusses von nicht radioaktivem Methionin („Chase“). Zu bestimmten Zeiten der „Chase“-Periode wurden dann Zellproben entnommen und in deren Extrakten vorhandene  $\beta$ -Gal-Proteine nach Immunpräzipitation analysiert (Abb. 7).

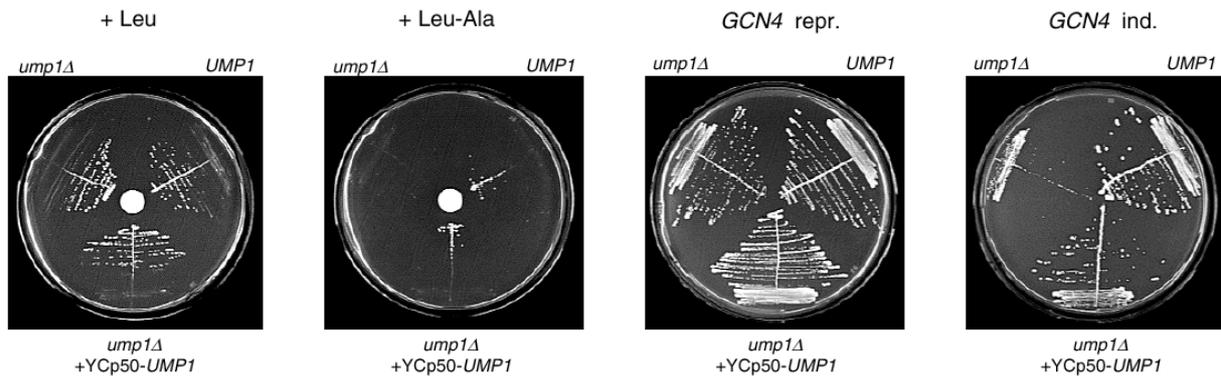


**Abb. 7: „Pulse Chase“-Analysen zur Untersuchung der metabolischen Stabilität von Testsubstraten der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse in Wildtyp und *ump1 $\Delta$* -Mutante.** Zellen von Wildtyp (*UMP1*) und *ump1 $\Delta$* -Mutante wurden mit Plasmiden transformiert, welche zur Expression von verschiedenen Testsubstraten der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse führen (siehe Abb 5.). Die Proteine der Zellen von exponentiell wachsenden Kulturen dieser Transformanten wurden *in vivo* mit [ $^{35}$ S]-Methionin für 5 min („Pulse“) markiert (Spuren „0“), gefolgt von Inkubation mit unmarkiertem Methionin („Chase“) für 10 bzw. 30 min (Spuren „10“ bzw. „30“). Es folgten Extraktion, Immunpräzipitation, gelelektrophoretische Auftrennung und Detektion der radioaktiv markierten Proteine durch Fluorographie. Die Präzipitation erfolgte durch Fällung von Immunkomplexen zwischen den Testsubstratproteinen und Anti- $\beta$ -Galaktosidase-Antikörpern aus Aliquots mit gleichem Gehalt an radioaktiv markierten Proteinen. Die offenendigen Klammern geben die Position von multiubiquitinierten Testsubstratproteinen und die Sterne von charakteristischen 90 kDa großen Abbauprodukten der  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine an.

Die Ergebnisse der „Pulse Chase“-Analysen zeigten, daß die metabolische Stabilität der drei Testsubstrate Arg- $\beta$ -Gal, Ub-Pro- $\beta$ -Gal sowie Mat $\alpha$ <sub>2,1-68</sub>- $\beta$ -Gal in den Zellen der *ump1 $\Delta$* -Mutante im Vergleich zu Wildtypzellen drastisch erhöht war. In Wildtypzellen war der Großteil der  $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteine nach 30 Minuten abgebaut, während in der Mutante in diesem Zeitraum kein Abbau erkennbar war. Diese Beobachtung korrelierte mit den zuvor ermittelten Unterschieden in den  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in den Rohextrakten von Wildtyp und *ump1 $\Delta$* -Mutante. Vergleicht man die metabolische Stabilität der drei untersuchten Proteine miteinander, zeichnet sich das Arg- $\beta$ -Gal-Fusionsprotein durch den raschesten Abbau in Wildtypzellen aus. Für dieses Testsubstrat wurden zugleich auch die höchsten Aktivitätsunterschiede zwischen Wildtyp und Mutante gemessen.

Weitere Hinweise auf Eigenschaften der *ump1 $\Delta$* -Mutante ergaben die in Abb. 8 dargestellten Wachstumsanalysen, die auf folgenden Prinzipien beruhen. Der „N-end rule“-Weg reguliert in der Hefe *S. cerevisiae* den Import von Peptiden durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse des Cup9-Proteins. Dieses Regulatorprotein reprimiert die Transkription des *PTR2*-Gens, welches für einen Dipeptid-Transporter in der Plasmamembran codiert (Byrd *et al.*, 1998). Dabei wird die Stabilität des Cup9-Repressors durch die Anwesenheit von Peptiden im Medium reguliert. Abb. 8 verdeutlicht, daß die *ump1 $\Delta$* -Mutante einen Defekt in der Aufnahme von Dipeptiden hat. Die Leucin-Auxotrophie des Stammes JD59 (*ump1 $\Delta$  leu2-3,112*) konnte im Gegensatz zu der des Wildtypstammes JD47-13C (*leu2-3,112*) nicht durch Leu-Ala-Dipeptide im Medium kompensiert werden.

Des weiteren weist die *ump1 $\Delta$* -Mutante eine erhöhte Sensitivität gegen Überexpression eines Fusionsproteins aus dem Gcn4-Protein und der  $\beta$ -Galaktosidase auf (Abb. 8). Der Transkriptionsaktivator Gcn4p von *S. cerevisiae* ist an der Regulation der Biosynthese von Aminosäuren und Purinen beteiligt und aufgrund seines Ubiquitin-vermittelten Abbaus unter normalen physiologischen Bedingungen kurzlebig, während er unter Aminosäuremangel stabilisiert wird (Kornitzer *et al.*, 1994). Mit dem Plasmid pKB64 transformierte Hefen ermöglichen die regulierbare Expression des Gcn4- $\beta$ -Gal-Fusionsproteins in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle. Die Transkription des plasmidcodierten Fusionsgens steht unter der Kontrolle des starken *GAL1*-Promotors. Dies führt zur Repression des Fusionsgens auf glukosehaltigem Medium und zur Transkriptions-Induktion auf galaktosehaltigem Medium. Die Überexpression des Gcn4- $\beta$ -Gal-Fusionsproteins führt wie in Abb. 8 ersichtlich, in der *ump1 $\Delta$* -Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu einer deutlichen Wachstumsinhibierung. Dieser toxische Effekt läßt sich durch eine verstärkte Anreicherung des intrazellulären Gcn4- $\beta$ -Gal-Fusionsproteins aufgrund des Proteolyse-Defektes der *ump1 $\Delta$* -Mutante erklären.



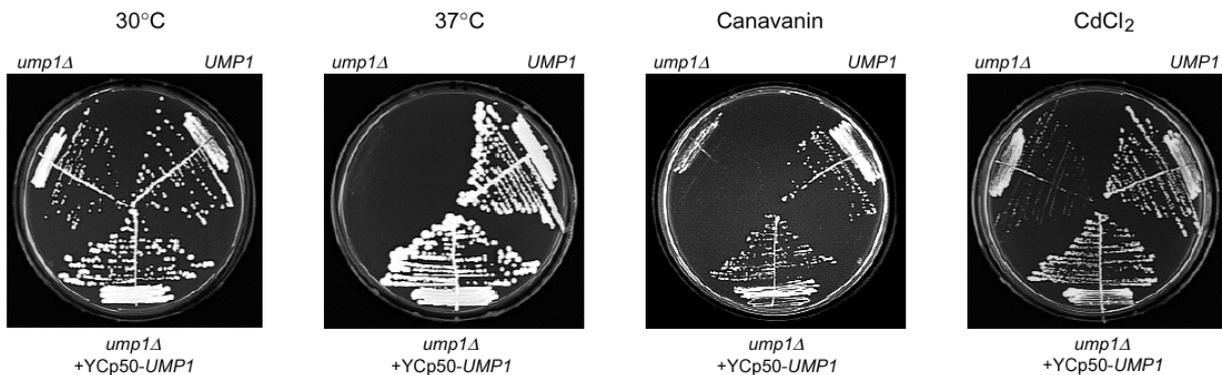
**Abb. 8: Phänotypanalyse der *ump1Δ*-Mutante als Hinweis auf die Stabilisierung bestimmter Proteolysesubstrate.** Die Leucin-auxotrophen Zellen (*leu2-3,112*) der *ump1Δ*-Mutante (JD59), des Wildtyps (JD47-13C) und Zellen der *ump1Δ*-Mutante transformiert mit *Ycp50-UMP1* (Expression des Wildtyp-*UMP1*-Gens) wurden auf Minimalmedium-Platten ausgestrichen. Als Leucin-Quelle wurden Antibiotika-Testplättchen mit 50  $\mu$ l 50 mM Leucin (1. Platte v. l.) bzw. 50 mM Dipeptid Leucin-Alanin (2. Platte v. l.) in der Plattenmitte platziert. Dieselben Hefe-Stämme wurden zur Expression des Gcn4p- $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteins mit dem Plasmid pKB64 transformiert. Die vom *GAL1*-Promotor regulierte Expression des Fusionsproteins führt zur Repression auf glukosehaltigem Medium und zur Expressionsinduktion auf galaktosehaltigem Medium. Zellen der Transformanten wurden auf SD-Minimalmedium („*GCN4 repr.*“) bzw. SG-Minimalmedium („*GCN4 ind.*“) ausgestrichen. Die Zellen wurden für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, daß die Anwesenheit des *UMP1*-Gens einen starken Einfluß auf die metabolische Stabilität der verschiedenen Testsubstrate hat. Weil an der Ubiquitinierung der verschiedenen Testsubstrate voneinander unabhängige Komponenten des Ubiquitin-Systems beteiligt sind (siehe Abb. 5), lag die Vermutung nahe, daß in der *ump1Δ*-Mutante nicht die Erkennung bestimmter Proteolysesubstrate gestört ist, sondern ein genereller Defekt in der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse vorliegt.

Um weitere Hinweise darauf zu finden, wurde anschließend untersucht, ob die *ump1Δ*-Mutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber solchen Steßbedingungen aufweist, die ein verstärktes Auftreten von falsch gefalteten oder defekten intrazellulären Proteinen verursachen. Es ist bekannt, daß viele falsch gefaltete, oder andersartig geschädigte Proteine vom Ubiquitin-System der Zelle erkannt und durch das Proteasom abgebaut werden. Für eine Reihe von verschiedenen Hefemutanten mit Defekten in der vom 26S-Proteasom abhängigen Proteolyse konnte eine Hypersensitivität gegenüber Steßbedingungen wie Hitze, Inkubation auf Canavanin- oder Cadmiumchlorid-haltigen Medien nachgewiesen werden, die auf eine Anhäufung von defekten oder geschädigten Proteinen zurückzuführen ist (Seufert und Jentsch, 1990; Hilt *et al.*, 1993; Jungmann *et al.*, 1993). Mit Ausnahme von Ubc4p und Ubc5p sind die Komponenten des Ubiquitin-Systems, die an der Erkennung oder Ubiquitinierung solcher Proteine beteiligt sind, bisher weitgehend unbekannt (Seufert and Jentsch, 1990).

Wie in Abb. 9 zusammengefaßt, zeigt die *ump1Δ*-Mutante Temperatursensitivität. Bei 30°C ist ihr Wachstum im Vergleich zum Wildtyp vermindert, während bei 37° kein

Wachstum erkennbar ist. Außerdem ist die Mutante hypersensitiv gegenüber Canavanin und Cadmium-Ionen. In Gegenwart von 0,8 µg/ml Canavanin bzw. 30 µM CdCl<sub>2</sub> im Medium zeigt die *ump1Δ*-Mutante gegenüber dem Wildtyp drastisch reduziertes Wachstum.



**Abb. 9: Wachstum der *ump1Δ*-Mutante im Vergleich zu Wildtypzellen unter Streßbedingungen.**

Zellen der *ump1Δ*-Mutante (JD59), Wildtypzellen (Stamm JD47-13C) und Zellen der *ump1Δ*-Mutante transformiert mit Ycp50-*UMP1* (Expression des Wildtyp-Gens) wurden auf Vollmedium-Platten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30°C bzw. drei Tage bei 37°C inkubiert. Alternativ wurden dem Medium 0,8 µg/ml Canavanin oder 30 µM CdCl<sub>2</sub> zugesetzt (3. bzw. 4. Agarplatte v. l.) und bei 30°C für drei Tage inkubiert.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der *ump1Δ*-Mutante können folgendermaßen zusammengefaßt werden. Die *ump1Δ*-Mutante besitzt einen Defekt im Abbau verschiedener Substrate der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse, deren Abbau über unterschiedliche Wege des Ubiquitin-Systems erfolgt. Sie weist des weiteren eine Hypersensitivität gegenüber Streßbedingungen auf, welche zur Generierung von geschädigten oder falsch gefalteten Proteinen in der Zelle führen, die bekanntermaßen Ubiquitin-abhängig vom Proteasom abgebaut werden. Der pleiotrope Phänotyp der *ump1Δ*-Mutante deutete somit auf einen generellen Defekt in der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse hin. Die Befunde legten den Schluß nahe, daß das *UMP1*-Gen für eine Funktion des Ubiquitin-/Proteasom-Systems im Anschluß an die Ubiquitinierung der Substrate wichtig ist. Die Beobachtung, daß die von der Sequenz des *UMP1*-Gens abgeleitete Primärstruktur des Ump1-Proteins keine auffälligen Übereinstimmungen mit bereits identifizierten Komponenten des Ubiquitin-konjugierenden Systems aufweist, paßten zu dieser Hypothese.

Inzwischen konnte in unserem Labor eine Reihe von biochemischen Analysen zur Aufklärung der Funktion des Ump1-Proteins in *S. cerevisiae* beitragen. Das 148 Aminosäuren große Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung des 20S-Proteasoms. Nach unserer Modellvorstellung (siehe Abb. 4 der Einleitung) bindet es an die 15S-Vorläuferkomplexe (Halbproteasomen), möglicherweise unter chaperonähnlicher Interaktion mit den

Propeptiden unprozessierter  $\beta$ -Untereinheiten. Infolge der Zusammensetzung zweier Halbproteasomen vermittelt es die Prozessierung der Vorläuferproteine und somit die Aktivierung des reifen 20S-Proteasoms.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sowie ein Teil der bis hierher dargestellten Ergebnisse sind inzwischen veröffentlicht (Ramos *et al.*, 1998).

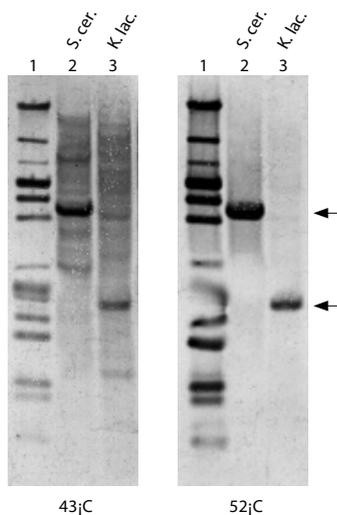
### **3.2 Klonierung des *UMP1*-homologen Gens aus der Hefe *Kluyveromyces lactis***

Zu Beginn dieser Arbeit waren keine zum *UMP1*-Gen der Bäckerhefe homologen Gene aus anderen Organismen in den Datenbanken detektierbar. Daher wurde zunächst ein Versuch unternommen, solche Gene aus mit der Bäckerhefe näher verwandten Spezies zu klonieren. Die Isolierung und Sequenzanalyse solcher Homologen aus anderen Hefen sollte die Identifizierung weiterer homologer *UMP1*-Sequenzen in den Datenbanken ermöglichen. Sie sollte darüber hinaus den Grundstein für weitere Untersuchungen zur Funktion des Ump1-Proteins legen. Vergleiche der aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Primärstrukturen verschiedener *UMP1*-Gene könnten Hinweise auf konservierte und funktionell bedeutende Regionen erbringen. Solche Informationen können später wichtige Beiträge zur Aufklärung der Funktions-Strukturbeziehungen des Ump1-Proteins liefern.

Voraussetzung für die Isolierung eines zum *UMP1* homologen Gens aus *Kluyveromyces lactis* aufgrund der Sequenzähnlichkeit beider Gene, war eine zur detektierbaren Kreuzhybridisierung ausreichende Übereinstimmung ihrer Nukleotidsequenzen. Um diese zu analysieren, wurde zunächst eine Southern-Blot-Analyse genomischer DNA von *K. lactis* mit dem *S. cerevisiae* *UMP1*-Gen als Sonde unter niedrig stringenten Bedingungen durchgeführt.

#### **3.2.1 Heterologe Hybridisierung des *UMP1*-Gens mit genomischer DNA aus *K. lactis***

Chromosomale DNA wurde aus dem *K. lactis*-Stamm CBS2359 und für eine Positivkontrolle aus dem *S. cerevisiae* Stamm JD47-13C isoliert, mit der Endonuclease *EcoRI* restringiert und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der DNA auf eine Membran erfolgte die Hybridisierung der gebundenen DNA mit DIG-dUTP-markierter *UMP1*-DNA. Das Ergebnis des kolorimetrischen Nachweises der an die Ziel-DNA gebundenen markierten DNA zeigt Abb. 10. Ein signifikantes Signal wurde sowohl bei einer Hybridisierungstemperatur von 43°C als auch bei 52°C im Bereich von *K. lactis*-DNA-Fragmenten der Größe 1,7 - 1,8 kb erhalten.



**Abb. 10: Southern-Blot-Analyse zur Detektion eines *UMP1*-Gens in *Kluyveromyces lactis*.** Gezeigt ist die Detektion von genomischer, *EcoRI*-restringierter DNA aus *S. cerevisiae* (Spur 2) und *K. lactis* (Spur 3) durch Hybridisierung mit der codierenden DNA des *UMP1*-Gens aus *S. cerevisiae*. In Spur 1 wurde *EcoRI/HindIII* restringierte  $\lambda$ -DNA als Größenstandard aufgetragen. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte nach Hybridisierung mit DIG-dUTP-markierter DNA bei 43°C bzw. 52° und anschließender Bindung von Enzym-gekoppeltem Anti-DIG-Antikörper durch kolorimetrischem Nachweis der an die Ziel-DNA gebundenen markierten DNA. Der obere Pfeil gibt die Position des in *S. cerevisiae* detektierten Fragmentes mit dem *UMP1*-Gen an, und der untere Pfeil die Position des 1,7-1,8 kb großen, in der *K. lactis* DNA detektierten Fragmentes, welches zur Herstellung einer partiellen genomischen Genbank kloniert wurde.

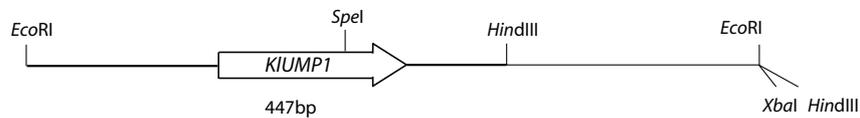
### 3.2.2 Herstellung einer partiellen Genbank aus *K. lactis*

Zur Herstellung einer partiellen Genbank wurde erneut *EcoRI*-restringierte DNA von *K. lactis* elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend ein Stück Agarosegel ausgeschnitten, welches DNA-Fragmente der Größe 1,6 bis 1,9 kb enthielt. Diese wurden aus dem Gelstück isoliert, mit *EcoRI*-geschnittenem und dephosphoryliertem *E. coli*-Vektor pUC19 ligiert und nach Elektro-Transformation von Zellen des *E. coli*-Stammes MC1061 kloniert. Dadurch wurden ca. 2000 Klone erhalten, welche mittels „Kolonie-Hybridisierung“ analysiert wurden (s. Abschnitt 2.18.2).

### 3.2.3 Isolierung des *UMP1*-Gens aus *K. lactis*

Für die Durchmusterung der 2000 Klone mittels „Kolonie-Hybridisierung“ wurde [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dATP-markierte *UMP1*-DNA verwendet. Von den vier Kolonien, welche die stärksten Signale ergaben, wurden Zellen kultiviert und die Plasmid-DNA isoliert. Anschließende Restriktionsanalysen in Verbindung mit Southern-Blot-Analysen ergaben, daß alle vier Plasmide dasselbe signalverursachende *EcoRI*-DNA-Fragment in unterschiedlichen Orientierungen beinhalten (Abb. 11). Von zwei Klonen, die das inserierte Fragment in unterschiedlicher Orientierung aufwiesen, wurden Subklone hergestellt. Dies erfolgte durch Restriktion mit den Endonukleasen *SpeI* (im inserierten Fragment) und *XbaI* (in der „MCS“) und anschließender Religation des Vektorfragments, bzw. (bei umgekehrter Orientierung des *EcoRI*-Fragmentes) durch Ligation des *HindIII*-Fragmentes mit dem pUC19-Vektor. Die anschließende Sequenzierung der so erhaltenen Plasmid-DNA (pJH14 bzw. pJH16) zeigte, daß das ursprünglich klonierte *EcoRI*-Fragment einen offenen Leserahmen (ORF) von 447 bp Länge enthält (siehe Anhang). Die aus der Nukleotidsequenz dieses ORFs abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt im Vergleich mit der Aminosäuresequenz des Ump1-Proteins

61 % identische Aminosäurereste (Abb. 12, Abschnitt 3.3) Aus der hohen Übereinstimmung der Primärstrukturen der beiden Proteine konnte gefolgert werden, daß das zu dem *UMP1*-Gen homologe Gen aus *K. lactis* isoliert wurde, welches im folgenden als *KIUMP1* bezeichnet wird.



**Abb. 11: Schematische Darstellung des im Durchmusterungsverfahren isolierten genomischen DNA-Fragmentes aus *Kluyveromyces lactis*.** Das DNA-Fragment enthält das *UMP1*-Gen aus *K. lactis* und wurde als Insertion eines Plasmides nach einer Kolonie-Hybridisierung isoliert. Angegeben sind die Positionen von Schnittstellen, die für die Subklonierung des *KIUMP1*-Gens verwendet wurden.

### 3.3 Identifizierung und Isolierung eines *UMP1*-homologen Gens aus *Schizosaccharomyces pombe*

Zum damaligen Zeitpunkt wurde durch computergesteuerte Suche in den Datenbanken eine 195 bp lange Nukleotid-Sequenz gefunden, welche übersetzt in Aminosäuresequenz auffallende Übereinstimmungen zu denen der *Ump1*-Proteine aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* aufwies. Sie war als partielle codierende Sequenz einer unbekanntes mRNA aus *Schizosaccharomyces pombe* deklariert („*S. pombe* unknown protein mRNA, partiel cds“; Datenbank-Kennnummer U97376).

Mit Hilfe der von dieser Nucleotidsequenz abgeleiteten Oligonukleotide JH420 und JH421 konnte dieses DNA-Fragment mittels PCR-Amplifikation isoliert werden. Als „Template“ wurde hierbei eine Plasmidbibliothek von cDNA aus *S. pombe* verwendet, woraus geschlossen werden konnte, daß die zu dem amplifizierten DNA-Fragment gehörige cDNA in einem der Bibliothek-Plasmide enthalten ist. Deshalb war das Ziel der im folgenden beschriebenen Untersuchungen, dieses Plasmid zu isolieren.

Zellen des *E.coli*-Stammes XL1 Blue wurden mit der cDNA-Bibliothek transformiert und die daraus erhaltenen ca. 5000 Klone mittels Kolonie-Hybridisierung analysiert. Als Sonde diente das per PCR amplifizierte 195 bp große DNA-Fragment, welches zuvor radioaktiv markiert worden war. Von der einzigen Kolonie, welche ein detektierbares Signal lieferte, wurde eine Flüssigkultur angezogen und daraus die Plasmid-DNA isoliert. Diese DNA wurde als „Template“ in einer analytischen PCR, wieder unter Verwendung der Oligonukleotide JH420 und JH421 eingesetzt. Die Amplifikation eines ca. 200 bp großen DNA-Fragmentes ließ vermuten, daß das isolierte Plasmid die gewünschte cDNA-Insertion enthielt. Zur Sequenzierung wurde die Insertion durch Restriktion mit *NotI* aus dem isolierten Plasmid ausgeschnitten und in den Vektor pRS314 kloniert. Die daraus erhaltene Nukleotidsequenz beinhaltet einen 387 bp umfassenden offenen Leserahmen, der die

zuvor in der Datenbank identifizierte partielle codierende Sequenz einschloß. Die aus dem ORF abgeleitete Aminosäuresequenz weist signifikante Übereinstimmungen mit den Primärstrukturen der Ump1-Proteine aus *S.cerevisiae* und *K.lactis* auf. Ein computergestützter Aminosäuresequenzvergleich zeigte, daß 43% der Aminosäurereste entweder mit denen des Ump1p von *S.cerevisiae* oder von *K.lactis* übereinstimmen (siehe Abb. 12). Daraus konnte geschlossen werden, daß auch aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* ein zum *UMP1*-Gen homologes Gen isoliert wurde, welches im folgenden als *SpUMP1* bezeichnet wird.

ScUmp1p	1	- -	MNIVP	QD	TFKS	QV	STD	QD	KSVL	SS	SAV	PSL	PD	TL	RQQ	36																								
KlUmp1p	1	M	PMN	IV	SP	DFKS	AV	ATD	KG	CEHQ	S	NAV	ASL	PD	VFRE	38																								
SpUmp1p	1	- -	MKIVP	DV	EPAA	EVS	GN	- - - - -	- - - - -	- - - - -	FKV	SVL	EPS	IP	- -	27																								
ScUmp1p	37	E	GA	V	PL	S	TQL	NDR	H	P	L	E	S	T	L	K	N	W	E	T	T	Q	R	Q	R	Q	M	E	Q	Y	R	Q	74							
KlUmp1p	39	V	G	-	A	R	P	L	N	T	Q	L	N	D	R	H	P	L	E	S	R	V	R	N	W	D	E	T	Q	H	K	R	Q	L	E	Q	Y	R	Q	75
SpUmp1p	28	A	V	- - - - -	- - - - -	H	R	V	E	N	K	H	P	L	E	S	R	L	K	N	W	E	A	Q	Q	Q	I	R	L	D	S	M	R	R	59					
ScUmp1p	75	I	F	G	I	A	E	P	M	K	R	T	M	E	M	E	I	V	N	R	-	T	D	F	N	P	L	S	T	N	G	S	I	H	R	D	I	L	L	111
KlUmp1p	76	I	F	G	V	A	E	P	M	K	R	V	M	E	L	K	L	V	Q	N	-	T	D	F	N	P	L	N	Q	S	-	N	L	H	K	D	V	L	M	111
SpUmp1p	60	I	Y	G	L	H	E	P	V	R	R	E	M	E	Q	K	L	A	S	Q	S	R	P	L	A	L	G	G	S	A	N	F	H	L	D	I	L	A	97	
ScUmp1p	112	N	K	E	C	S	I	D	W	E	D	V	Y	P	G	T	G	L	Q	A	S	T	M	V	G	D	D	V	H	S	K	I	E	K	Q	L	G	I	148	
KlUmp1p	112	N	K	E	A	S	I	D	W	E	D	V	Y	P	T	S	D	F	A	S	G	M	M	V	A	D	D	V	H	T	K	I	E	K	R	M	G	I	148	
SpUmp1p	98	N	R	E	A	V	L	D	E	T	D	I	Y	- - - - -	- - - - -	A	A	P	I	P	L	E	M	T	Y	Q	N	E	M	A	I	R	Y	G	L	129				

**Abb 12: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Ump1-Proteinen aus verschiedenen Hefespezies.**

Dargestellt ist ein Verleichen der Aminosäuresequenzen der Ump1-Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScUmp1p), *Kluyveromyces lactis* (KlUmp1p) und *Schizosaccharomyces pombe* (SpUmp1p). Die Sequenzen der beiden letztgenannten wurden von der aus diesen Spezies isolierten codierenden DNA der *UMP1*-Gene abgeleitet. Identische Aminosäurereste sind grau unterlegt. Der Sequenzvergleich wurde unter Benutzung der Programms ClustalW1.8 ({Thompson, 1994 #471}) durchgeführt.

Um die cDNA-Sequenz des *UMP1* aus *S.pombe* mit der genomischen Sequenz zu vergleichen, wurde das *UMP1*-Gen aus einer genomischen DNA-Präparation aus *S.pombe* (Stamm 130<sup>+</sup>) mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden von den 5'- bzw. 3'-Enden der Nukleotidsequenz der isolierten cDNA Oligonukleotide mit flankierenden Schnittstellen abgeleitet (JH489, JH490) und für die PCR eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde isoliert und in Plasmid pJDCEX2 kloniert. Aus der anschließenden Sequenzierung der Insertion ging hervor, daß das auf diese Weise klonierte *UMP1*-Gen aus *S.pombe* ein 104 bp großes Intron beinhaltet (siehe Anhang). Im Rahmen des Europäischen *Schizosaccharomyces*-Genom-Sequenzierungsprojektes wurde die Nukleotidsequenz der cDNA dieses Gens inzwischen identifiziert (Datenbank-Kennnummer AL031518). Das Genprodukt ist als „Putative Proteasome Maturation Factor“ deklariert.

### 3.4 Das Ump1-Protein ist von der Hefe bis zum Menschen konserviert

Wie in den vorigen Abschnitten beschrieben, konnten zum *UMP1*-Gen von *S. cerevisiae* homologe Gene aus den Hefen *K. lactis* und *S. pombe* isoliert werden. Unter Benutzung der aus diesen Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden daraufhin (unter Benutzung der EDV-Programme BLAST und PSI BLAST) regelmäßig die Datenbanken nach vermeintlichen Homologen aus anderen Organismen durchsucht. Während diese computergestützten Sequenzanalysen zu Beginn dieser Arbeit noch erfolglos blieben, war es im Laufe der Zeit möglich, infolge der ständigen Erweiterung der Datenbanken eine Reihe von Ump1-Homologen verschiedener Eukaryoten zu identifizieren. So konnten die codierenden Nukleotid-Sequenzen der *UMP1*-Gene aus den drei Säugern Maus (*Mus musculus*), Ratte (*Rattus norvegicus*) und Mensch (*Homo sapiens*), dem Zebrafisch (*Danio rerio*), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, sowie aus den Pflanzen Schwarzfichte (*Picea mariana*) und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) in den Datenbanken gefunden werden (Datenbank-Kennnummern siehe Anhang). Die Informationen aus diesen Daten bildeten die Grundlage für verschiedene, im folgenden beschriebenen Untersuchungen. Zum einen wurde die codierende DNA von *UMP1*-Genen aus Maus und Mensch per PCR amplifiziert, kloniert und für verschiedene Analysen verwendet. Des weiteren wurden mit den aus den Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen computergestützte Sequenzvergleiche (mit Hilfe des Programmes ClustalW1.8; Jeanmougin *et al.*, 1998) durchgeführt. Das Ergebnis eines solchen Vergleiches von allen zur Verfügung stehenden Sequenzen ist in der Abbildung 13 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß der Proteasomenreifungsfaktor Ump1 von der Hefe bis hin zu höheren Eukaryoten konserviert ist. Verdeutlicht wird dies durch die in der Abbildung blau hinterlegten Aminosäurereste. Derart markierte Aminosäurereste sind unter den Ump1-Proteinen der Wirbeltiere identisch oder zu diesen identisch. Solche stark konservierten Reste sind in den Ump1-Proteinen der Hefen (mit Ausnahme der N-terminalen Regionen) über das gesamte Protein verteilt. So sind nach diesem „Alignment“ beispielsweise 24 % der Aminosäurereste des Ump1-Proteins von *S. cerevisiae* mit denen des humanen Ump1-Proteins identisch.

Im allgemeinen weist die Konservierung bestimmter Positionen in homologen Proteinen von phylogenetisch entfernt verwandten Spezies darauf hin, daß diese Aminosäurereste für die Funktion der Proteine wichtig sind. Stark konserviert sind deshalb häufig Aminosäurereste von katalytischen Zentren, von Modifikationszielorten oder von Sequenzmotiven, welche für die Interaktion mit anderen Zellkomponenten verantwortlich sind.

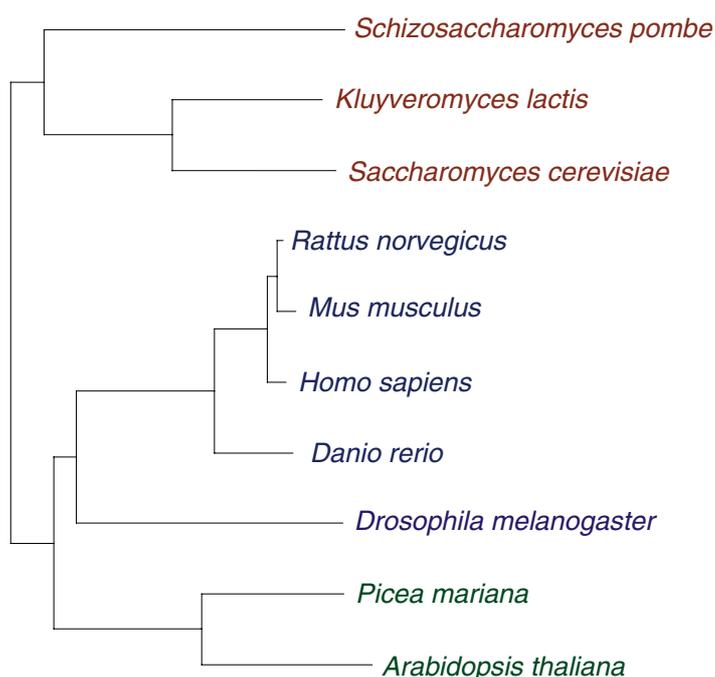
<i>S. cer.</i>	1	--	MNIVPQDTFKSQVSTDDQKSVLSSAVPSLPD	TRQQEGGAVPLSTQLNDRHHPLESTLKNWETTQ	64		
<i>K. lac.</i>	1	MPMNI	VPSPDFKSAVATDKCEHQSNVAVSLP	DFVFRQVGARPLNTQLNDRHHPLESRVRNWDETQ	65		
<i>S. pom.</i>	1	--	MKIIVDVEPAAEVSGFKVS	--VL--EPSIP--AVHRVENKHHPLESRLKNWEAQQ	49		
<i>P. mar.</i>	1	--	MDPVQOSLPHEIGGI	--TDLRFGLA--GVKSDILISHHPVQVIQENAKKQKQ	47		
<i>A. tha.</i>	1	--	MESEKKAIAHEIGGVK	--NDALRFGLH--GVKSNIIGSHPLLESSYSEKSKK	47		
<i>D. mel.</i>	1	--	MYQPSLKVQPAEVSVL	--NATGRVGMPTTEANCLNQLAHVHRLRDLSELNNEHQ	51		
<i>D. rer.</i>	1	--	GLRSQKDSVPTGLCPQAGPYGV	--QDSLRKGFSSVKNELLPSHPLELSEKNFQNLQ	56		
<i>M. mus.</i>	1	--	MNARGLGSSELKDSIPVAELSA	--SGPFESHDLLRKGFFS--CVKNELLPSHPLELSEKNFQNLQ	59		
<i>R. nor.</i>	1	--	ARGLGSQKDSIPVTELSA	--SGPFESHDLLRKGFFS--CVKNELLPSHPLELSEKNFQNLQ	57		
<i>H. sap.</i>	1	--	MNARGLGSSELKDSIPVTELSA	--SGPFESHDLLRKGFFS--CVKNELLPSHPLELSEKNFQNLQ	59		
<i>S. cer.</i>	65	RQRQMEQYRQIFGIAE	PMKRTMEMEIVNR	TDFNPLST	NGSIHRDILLNKECSI	DWEDVYPTGLQ	129
<i>K. lac.</i>	66	HKRQLEQYRQIFGVAE	PMKRVMEKLVQNTDFNPLN	--QSNLHKDVL	MNKEASIDWEDVYPTSDFA	129	
<i>S. pom.</i>	50	QOIRLDSMRR	IYGLHEPVRREMEQKIASQSSR	PLAIGGSANFHLD	ILANREAVLDETDIYAAP	--112	
<i>P. mar.</i>	48	REMKRNILAKTYGSA	FPLKMDIEQQILSRFQRP	PPGELPSSMLGLES	LTGSLDEFSEFYLNDRP	--E112	
<i>A. tha.</i>	48	EALKRTVIAHAYGTA	LPLKMDMDRQILSRFQRP	PPGIPSSMLGLE	VYTGAVDDFFGFEDYLNDRP	--D112	
<i>D. mel.</i>	52	YNRNMQMLRNHEGL	GPLKMGMERFAAQVGR	LPFLSSSNFMDD	VLGRCDSIGFEDFMNLP	--113	
<i>D. rer.</i>	57	DKMNFN	TLRNIQGLHAPLKLQMEYRAAKQIQ	RLPFLPSSNLALD	TLRGSDDTIGFEDILNDP	--118	
<i>M. mus.</i>	60	DKMNFSTLRNI	QGLFAPLKLQMEFKAVQV	HRLPFLPSSNLSLD	ILRGNDETIGFEDILNDP	--121	
<i>R. nor.</i>	58	DKMNFSTLRNI	QGLFAPLKLQMEFKAVQV	ORLPFLPSSNLSLD	ILRGNDETIGFEDILNDP	--119	
<i>H. sap.</i>	60	DKMNFSTLRNI	QGLFAPLKLQMEFKAVQV	ORLPFLSSNLSLD	VLRGNDETIGFEDILNDP	--121	
<i>S. cer.</i>	130	ASTMVGDDVH	SKIEKQLGI	-----	148		
<i>K. lac.</i>	130	SGMMVADDDVHT	KIEKRMGI	-----	148		
<i>S. pom.</i>	113	--	IPLMPTYONEMAIRYGL	-----	129		
<i>P. mar.</i>	113	SETFVPADMH	HGMVRLGLSKGPVCRSFM	141			
<i>A. tha.</i>	113	SETFKPVDFHH	GMEVRLGISKGPVCRSFM	141			
<i>D. mel.</i>	114	ENSEHMRQ	PHAVVEKSLGIYQ	-----	134		
<i>D. rer.</i>	119	VQCEMMGD	PHIMTEYKLGLL	-----	138		
<i>M. mus.</i>	122	SOSELMGEPH	VMVEHKLGLL	-----	141		
<i>R. nor.</i>	120	SOSELMGEPH	MMVEYKLGLL	-----	139		
<i>H. sap.</i>	122	SQSEVMGEPH	LMVEYKLGLL	-----	141		

Abb. 13: Sequenzvergleich der Ump1-Proteine aus verschiedenen Spezies. Die aus den codierenden Sequenzen der Ump1-Gene verschiedener Organismen abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden in einer computergestützten Analyse unter Verwendung des Programms ClustalW1.8 (Jeanmougin et al., 1998) verglichen. Aminosäurereste, die bei verschiedenen Spezies übereinstimmen, sind farbig unterlegt. Zwischen den Wirbeltieren *D. rer.*, *M. mus.*, *R. nor.*, und *H. sap.* identische Aminosäurereste und mit diesen identische Reste aus anderen Spezies sind blau unterlegt. Identische Aminosäurereste der Hefen *S. cer.*, *K. lac.* und *S. pom.* sowie Reste anderer Spezies, die mit diesen übereinstimmen, sind orange unterlegt. Analog wurden die identischen Aminosäurereste der Pflanzen *P. mar.* und *A. tha.* und solche die mit diesen übereinstimmen grün, sonstige übereinstimmende Aminosäurereste gelb unterlegt. Die Sterne geben die Positionen von stark konservierten Aminosäureresten an, die im Rahmen der Mutationsanalyse des Ump1-Proteins aus *S. cer.* gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die drei Querbalken über den Aminosäureresten geben konservierte Bereiche an, welche als Fusionsstellen bei der Konstruktion von Hybridgenen zur Expression chimärer Ump1-Proteine benutzt wurden (nähere Erläuterungen siehe Text).

*S. cer.*: *Saccharomyces cerevisiae*; *K. lac.*: *Kluyveromyces lactis*; *S. pom.*: *Schizosaccharomyces pombe*; *P. mar.*: *Picea mariana*; *A. tha.*: *Arabidopsis thaliana*; *D. mel.* *Drosophila melanogaster*; *D. rer.*: *Danio rerio*; *M. mus.*: *Mus musculus*; *R. nor.*: *Rattus norvegicus*; *H. sap.*: *Homo sapiens*

Im Hinblick auf Untersuchungen zur Funktion des Ump1-Proteins eröffnete die Identifizierung seiner konservierten Aminosäurereste somit neue Möglichkeiten. In Abschnitt 3.7 werden die Ergebnisse eines Mutageneseverfahrens beschrieben, welches zum gezielten Austausch von konservierten Aminosäureresten im Ump1-Protein aus *S. cerevisiae* angewendet wurde.

Die aneinander gereihten Ump1-Aminosäuresequenzen weisen nur an einer Stelle eine unmittelbare Abfolge von mehreren stark konservierten Resten auf. Computergestützte Sequenzvergleiche ergaben, daß die Sequenz HPLE (Position 51-54 des *S. cerevisiae* Ump1p, s. Abb. 13) keine Ähnlichkeit mit bekannten Sequenzmotiven besitzt. Schließlich wurden die Daten aus dem Primärstruktur-Vergleich der Ump1-Proteine noch mit Hilfe des Computers bearbeitet, um den phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der Ump1-Proteine graphisch darzustellen. Das Ergebnis (Abb. 14) verdeutlicht, daß die Verwandtschaft der Ump1-Proteine mit der allgemeinen phylogenetischen Verwandtschaft der Spezies gut korreliert.



**Abb. 14: Phylogenetische Verwandtschaft von Ump1-Proteinen verschiedener Spezies.**

Unter Benutzung des Programms Clustal X (Thompson et al.; 1997) wurde nach der „NJ“- („Neighbour Joining“-) Methode ein Stammbaum errechnet und mit Hilfe des Programms NJ-plot (Thompson et al., 1997) als Dendrogramm dargestellt. Die Speziesbezeichnungen der Hefen sind in orange, die der Wirbeltiere Ratte, Maus, Mensch und Zebrafisch in blau, die der Fruchtfliege in violett und die Speziesbezeichnungen der Pflanzen Schwarzfichte und Ackerschmalwand in grün dargestellt.

Angesichts der doch zum Teil stark abweichenden Primärsequenzen der Ump1-Proteine aus den verschiedenen Spezies, stellte sich die Frage nach der funktionellen Konservierung dieses Proteins.

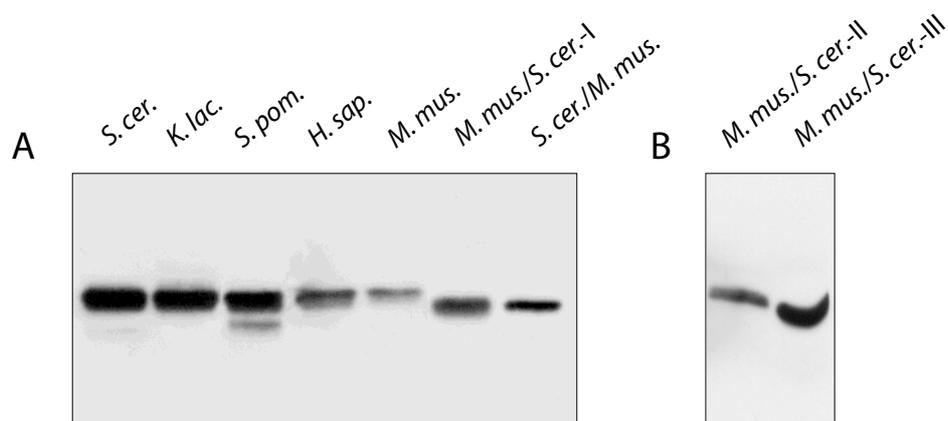
### 3.5 Entfernt verwandte Ump1-Proteine sind funktionell nicht austauschbar

In einem ersten Schritt sollte daher untersucht werden, ob das Ump1-Protein der Hefe *S. cerevisiae* durch die Ump1-Proteine anderer Hefen oder der Säuger Maus und Mensch funktionell ersetzt werden können. Dazu wurden zunächst die codierenden Sequenzen der *UMP1*-Gene der Hefen *K. lactis* und *S. pombe*, sowie der Säuger-Gene in einen Hefe-Expressionsvektor eingefügt. Dazu erfolgte die Amplifikation der jeweiligen *UMP1*-cDNAs mittels PCR unter Benutzung von Oligonukleotiden als „Primer“, welche flankierende Endonuklease-Restriktionsschnittstellen besaßen (Abschnitt 2.14). Nach Restriktion der PCR-Produkte mit den entsprechenden Enzymen wurden die DNA-Fragmente mit dem analog restringierten Hefe-Expressionsplasmid pJDCEX2 (vgl. Tab. 6 in 2.2.2) ligiert. Diese Plasmide wurden in *E. coli* amplifiziert und die Insertionen durch Sequenzanalyse überprüft.

In gleicher Weise wurden Plasmide für die Expression von Ump1-Protein-Chimären konstruiert. Mit Hilfe der „Assembly-PCR“-Technik wurden Hybrid-cDNAs generiert, welche aus einem Teil der für das Ump1-Protein aus *S. cerevisiae* und einem Teil der für das Ump1-Protein aus Maus codierenden Sequenzen bestehen (Material und Methoden, 2.14.1). Eines der hergestellten Plasmide gewährleistete die Expression einer Ump1p-Chimäre, welche aus dem N-terminalen Drittel des Ump1-Proteins aus der Maus und den C-terminalen zwei Dritteln des Ump1-Proteins aus der Bäckerhefe besteht (*Mm/ScUmp1-I*). Als Fusionsstelle der beiden Proteinteile wurde dabei die konservierte Region mit der Aminosäuresequenz HPLE gewählt (vgl. Abschnitt 3.4 und Abb. 17, B). Ein zweites Plasmid codierte für ein chimäres Ump1p, welches das N-terminale Drittel aus Bäckerhefe und die C-terminalen zwei Drittel aus Maus über dieselbe Fusionsstelle verbindet (*Sc/MmUmp1*).

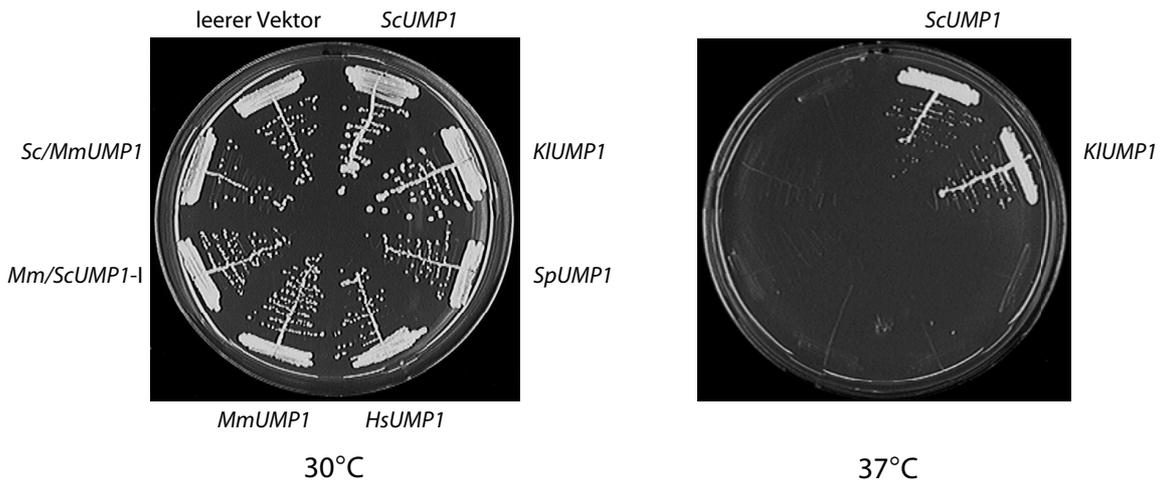
Alle Plasmide beinhalteten die jeweilige *UMP1*-cDNA fusioniert an zwei für das HA-Epitop codierende Sequenzen unter Kontrolle des kupferinduzierbaren *CUP1*-Promotors aus Hefe und der Terminatorsequenz des *CYC1*-Gens aus Hefe. Der Basisvektor pJDCEX2 besitzt einen Teil der 2 $\mu$ -DNA aus *S. cerevisiae*, was zu einer Kopienzahl von ca. 50 Plasmiden in der Bäckerhefe führt (Gietz und Sugino, 1988). Mit diesen Plasmiden (pJH26,30,32,33,34,36) wurde schließlich der für das *UMP1*-Gen deletierte Hefestamm JD59 transformiert. Zur Kontrolle erfolgte dies auch mit dem analog konstruierten Plasmid pJD248, welches das *UMP1*-Gen aus *S. cerevisiae* enthielt.

Um zunächst die Expression der verschiedenen *UMP1*-Konstrukte zu verifizieren, wurden aus Flüssigkulturen der Transformanten (mit 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) Zellextrakte hergestellt und einer Western-Analyse unterzogen (Abb. 15, A).



**Abb. 15: Immunologische Detektion verschiedener in *S. cerevisiae* exprimierter Ump1-Proteine bzw. Ump1-Protein-Chimären.** Zellextrakte des *ump1Δ*-Deletionsstammes JD59, transformiert mit den für verschiedene Ump1-Proteine (bzw. Ump1-Protein-Chimären) codierenden Plasmiden, wurden durch Western-Blot-Verfahren analysiert. Teil A zeigt die Detektion der Ump1-Proteine aus *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Homo sapiens* und *Mus musculus*, sowie zweier chimären Proteine aus Maus- und Bäckerhefe-Ump1p. Teil B zeigt die Detektion von zwei weiteren chimären Ump1-Proteinen mit Anteilen aus Maus und Bäckerhefe. Die immunologische Detektion der C-terminal zweifach HA-Epitop-markierten Proteine erfolgte unter Benutzung von Maus-Anti-HA-Antikörpern. (für nähere Erläuterungen der Chimären siehe Abb. 17, B bzw. Abschnitt 2.15.1).

Diese Analysen (Abb. 15) zeigten, daß alle Ump1-Proteine (und die beschriebenen chimären Ump1p) in den Plasmid-Transformanten exprimiert wurden. Es wurde dann weiter untersucht, ob der Wachstumsdefekt der *ump1Δ*-Mutante (siehe Abschnitt 3.1) durch die heterologe Expression der verschiedenen Ump1-Proteine komplementiert werden kann. Dazu wurden Zellen der Hefetransformanten auf Vollmedium ausgestrichen und bei 30°C oder 37°C inkubiert. Abb. 16 zeigt, daß nur das *UMP1*-Gen aus *K. lactis* (*KIUMP1*) den Wachstumsdefekt der *ump1Δ*-Mutante komplementierte. Die Zellen der übrigen Transformanten besaßen hingegen den temperatursensitiven Wachstumsphänotyp der *ump1Δ*-Mutante, sie zeigten vermindertes Wachstum bei 30°C und kein Wachstum bei 37°C.



**Abb. 16: Test auf Komplementation des Wachstumsdefekts der *ump1Δ*-Mutante durch heterologe Expression von *UMP1*-Genen verschiedener Spezies.** Wachstum der *ump1Δ*-Mutante, transformiert mit plasmidcodierten *UMP1*-Genen aus *S. cerevisiae* (*ScUMP1*), *Kluyveromyces lactis* (*KIUMP1*), *Schizosaccharomyces pombe* (*SpUMP1*), *Homo sapiens* (*HsUMP1*), *Mus musculus* (*MmUMP1*) sowie chimären *UMP1*-Genen zusammengesetzt aus Teilen der *UMP1*-Gene von Maus und Bäckerhefe (*Mm/ScUMP1-I* und *Sc/MmUMP1*); nähere Erläuterungen siehe Abb. 17, B und Text. Die Zellen wurden auf Vollmedium-Agarplatten ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

Von den untersuchten Ump1-Proteinen (bzw. -Protein-Chimären) kann also nur das Ump1p von *K. lactis* das *S. cerevisiae* Ump1p funktionell ersetzen. Rückblickend auf die Primärstrukturvergleiche der Ump1-Proteine zeigt sich, daß diese beiden Proteine auch den höchsten Grad an Übereinstimmungen bezüglich ihrer Aminosäurereste aufweisen. Die entfernter verwandten Homologen aus den Säugern bzw. der relativ nah verwandten Spezies *S. pombe* besitzen offenbar strukturelle Eigenschaften, die einer Funktion in der Bäckerhefe nicht gerecht werden.

Um zu überprüfen, ob die offensichtlich in *S. cerevisiae* nicht funktionellen Ump1-Proteine aus anderen Spezies oder die chimären Ump1-Varianten in Proteasom-Vorläuferkomplexe assemblieren, wurde ausgehend von der folgenden Überlegung eine weitere einfache Wachstumsanalyse durchgeführt.

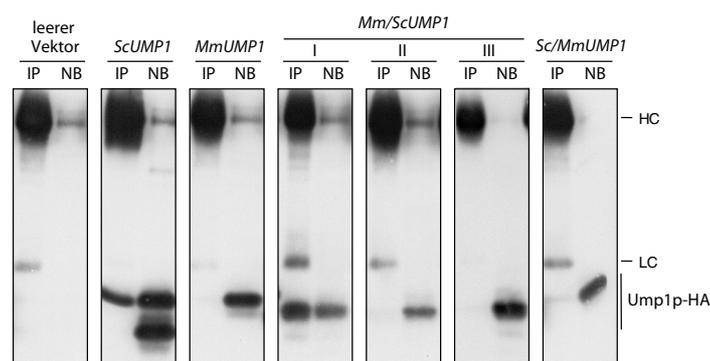
Die Überexpression eines bindenden, aber nicht korrekt funktionierenden Ump1-Proteins in der *ump1Δ*-Mutante, könnte zu einer weiteren Verschlechterung des Wachstumsvermögens führen, indem die Entstehung oder Reifung des Proteasoms komplett blockiert wird. Um dieses zu untersuchen, wurden die oben beschriebenen Transformanten auf Minimalmedium ohne Leucin ausgestrichen, damit ein Selektionsdruck auf die jeweiligen Plasmide gewährleistet war. Parallel erfolgte ein Ausstrich auf einer zweiten Agarplatte, welche zusätzlich 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  enthielt. Unter diesen Bedingungen wurde die Expression der unter Kontrolle des *CUP1*-Promotors stehenden *UMP1*-cDNAs erhöht. Die folgende Abb. 17 zeigt, daß nur die Zellen, welche die zuvor beschriebene Protein-Chimäre *Mm/ScUmp1-I* überexprimieren, einen im Vergleich zur *ump1Δ*-Mutante vermindertes Wachstum aufweisen. Die Überexpression der Ump1-Proteine aus Maus und



Die inhibitorische Wirkung der Chimäre *Mm/ScUmp1-I* kann darauf zurückzuführen sein, daß die hinteren zwei Drittel des Ump1-Proteins aus *S. cerevisiae* ausreichen, um seine Bindung an Proteasom-Vorläuferkomplexe zu gewährleisten. Gleichzeitig bringt offenbar der N-terminale Anteil dieses Proteins aus der Maus nicht die Eigenschaften für eine effiziente Assemblierung und Reifung des Hefe-Proteasoms mit sich. Eine Chimäre, welche hingegen nur die C-terminale Hälfte oder einen noch geringeren Teil des Proteins aus der Bäckerhefe besitzt, kann diese Bindung offenbar nicht ausführen. Dies könnte bedeuten, daß der Bereich des Ump1-Proteins aus Hefe, der diesen Chimären fehlt, für die Wechselwirkung mit den proteasomalen Untereinheiten entscheidend ist oder daß die Erhöhung des „Maus-Anteils“ in der Chimäre, den C-terminalen „Hefe-Anteil“ in eine für seine Bindung inkompatible Struktur bringt.

### 3.6 Nachweis eines chimären *Mm/ScUmp1p* in proteasomalen Komplexen

Die im vorherigen Abschnitt beobachtete Wachstums-inhibitorische Wirkung des *Mm/ScUmp1-I* deutete darauf hin, daß die C-terminale Sequenz des *ScUmp1*-Proteins einschließlich des HPLE-Motivs (Positionen 51 bis 54, vgl. Abb.13 bzw. Abb. 17) hinreichend für die Assemblierung in Proteasom-Vorläuferkomplexe in *S. cerevisiae* ist. Hingegen führte ein weiterer Austausch der *ScUmp1p*-Sequenz bis Position 85 gegen *MmUmp1*-Sequenz zu einem Verlust der Wachstumsinhibition. Dies wies auf einen für die Assemblierung in Vorläuferkomplexe erforderlichen Bereich zwischen den Positionen 55 und 85 des *ScUmp1*-Proteins hin. Koimmunpräzitations-Experimente mit Antikörpern gegen das 20S-Proteasom von *S. cerevisiae* bestätigten diese Interpretation (Abb.18). Nur das *ScUmp1p* und das *Mm/ScUmp1-I* kopräzitierten mit proteasomalen Komplexen, wohingegen das



**Abb. 18: Koimmunpräzitations-Test zur Detektion verschiedener Ump1-Proteine in proteasomalen Komplexen.** Zellen des *S.cerevisiae*-Stammes JD59 (*ump1Δ*) wurden mit leerem Vektor, den angegebenen plasmidcodierten *UMP1*-Genen sowie den für verschiedene für Ump1p-Chimären codierenden Genen transformiert. Extrakte aus diesen Transformanten wurden einer Immunpräzitation mit Antikörpern gegen das 20S-Proteasom von *S. cerevisiae* unterzogen. Die Präzipitate („IP“) wurden durch Western-Analyse unter Benutzung von Anti-HA-Antikörpern auf die Kopräzitation der Epitop-markierten Ump1-Proteine untersucht. Außerdem wurden parallel 20 % des nicht gebundenen Materials („NB“) aus dem Überstand analysiert. „HC“: schwere IgG-Kette; „LC“: leichte IgG-Kette. (siehe auch Abschnitt 2.31)

*MmUmp1p* und die anderen Chimären nicht oder nur in sehr geringem Maße in den Präzipitaten nachweisbar waren.

### 3.7 „Alanin-Scanning“-Mutagenese des Ump1-Proteins von *S. cerevisiae*

Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen war es, das *UMP1*-Gen aus *S. cerevisiae* zu mutagenisieren und solche Mutationen zu identifizieren, die zu einem partiellen Funktionsverlust des Proteasomenreifungsfaktors Ump1p führen. Das heißt, es waren besonders solche Veränderungen im Ump1-Protein von Interesse, die seine Interaktion mit den Proteasom-Vorläuferkomplexen nicht komplett unterbinden, sondern nachfolgende Schritte des Assemblierungs- und Reifungsprozesses inhibieren. Denkbar wäre z. B. eine Hemmung der Zusammensetzung zweier Halbproteasomen oder der Prozessierung der  $\beta$ -Untereinheiten (siehe Einleitung). Mutationen, die solche spezifischen Phänotypen verursachen, könnten Hinweise auf die Regionen im Ump1-Protein geben, welche an den für die verschiedenen Schritte im Reifungsprozeß erforderlichen Interaktionen beteiligt sind.

Ein etabliertes Verfahren um in einem Protein solche Aminosäurereste zu identifizieren, die an seiner Interaktion mit anderen Zellkomponenten beteiligt sind, ist das sogenannte „Charge to alanine scanning“ (Wertman *et al.*, 1992; McDonough *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1997; Hemmerich *et al.*, 1999). Durch zielgerichtete Mutagenese werden geladene Aminosäuren im Protein gegen die aliphatische Aminosäure Alanin ausgetauscht. Weil geladene Aminosäure-Seitenketten, die an der Proteinoberfläche lokalisiert sind, häufig Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln, kann die Wegnahme der Ladung an entsprechender Position eine Reduzierung oder Aufhebung dieser Interaktion bewirken. In einer Phänotyp-Analyse können dann die mutierten Versionen des Proteins, die einen solchen Effekt mit sich bringen, identifiziert werden.

Um ein „Charge to alanine scanning“ mit dem Ump1-Protein durchzuführen, wurde auf die Ergebnisse der Aminosäuresequenzvergleiche zurückgegriffen (Abschnitt 3.4). Weil Aminosäurereste, die für die Funktion eines Proteins wichtig sind, häufig starke Konservierung aufweisen, wurden für die Mutationsanalyse saure und basische Aminosäurereste ausgewählt, die über alle (oder nahezu alle) Spezies konserviert sind (in Abb. 13, Abschnitt 3.4 durch \* gekennzeichnet). Durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese wurden *UMP1*-Allele generiert, welche die Information für jeweils einen der gewünschten Aminosäureaustausche gegen Alanin tragen.

Im Zuge des Mutageneseverfahrens wurden außerdem zwei *UMP1*-Allele mit Mutationen erhalten, die aus einer fehlerhaften Synthesereaktionen im Mutageneseverfahren resultierten. Eines dieser beiden Allele besaß eine Mutation, die einen Aminosäureaustausch von Histidin gegen Arginin an Position 139 (H139R) bewirkte. Das andere Allel wies drei Mutationen auf, die zum Austausch von drei Aminosäureresten

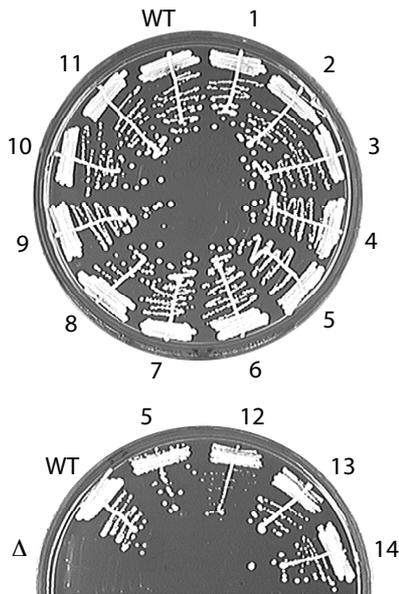
fürten (V26G, D31A, D108A). Alle in der Mutationsanalyse untersuchten Aminosäureaustausche sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt.



**Abb. 19: Zusammenfassung der durch zielgerichtete Mutagenese erzeugten Aminosäureaustausche im Ump1-Protein aus *S. cerevisiae*.** Die Pfeile geben an, welche Aminosäurereste im Ump1-Protein gegen den jeweils darüberstehenden Rest ausgetauscht wurden. Die farbige Unterlegung der Aminosäurereste erfolgte in Anlehnung an Abb. 13 (Abschnitt 3.4). Stark konservierte Aminosäurereste sind blau hinterlegt.

Die Mutagenese erfolgte mit dem in einen Hefvektor integrierten *UMP1*-Gen (pJH57). In diesem Plasmid steht das *UMP1*-Gen unter Kontrolle seines eigenen Promotors und ist ohne Unterbrechung des Leserahmens an zwei aufeinander folgende, für das HA-Epitop codierende Sequenzen fusioniert. Dies ermöglichte die episomale Expression der mutierten *UMP1*-Versionen nach Transformation des *ump1* $\Delta$ -Deletionsstammes JD134. Zunächst wurde untersucht, welchen Wachstumsphänotyp die verschiedenen Transformanten besaßen. Erstaunlicherweise zeigten alle Mutanten mit singulärem Aminosäureaustausch sowohl bei 30°C (Daten nicht gezeigt) als auch bei 37°C (Abb. 20) ein ähnliches Wachstum wie der mit dem Wildtyp-*UMP1*-Gen transformierte Kontrollstamm. Die Dreifachmutante zeigte hingegen bei 37°C ein im Vergleich zum Wildtyp vermindertes Wachstum (Abb. 20).

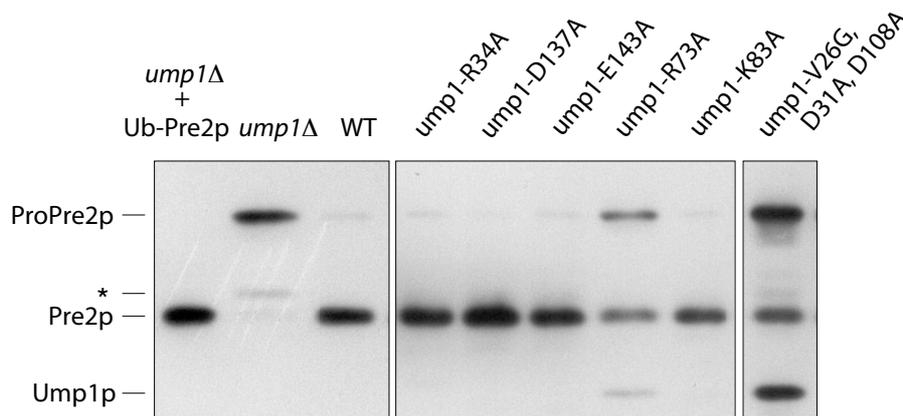
Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß die einzelnen Aminosäureaustausche keinen drastischen Defekt des Ump1-Proteins bei der Proteasomenreifung verursachen. Man konnte aber nicht direkt daraus folgern, daß die Ladung der ausgetauschten Reste für die Funktion des Reifungsfaktors keine Rolle spielen. Es war durchaus denkbar, daß in einigen Mutanten die Proteasomenreifung inhibiert war, ohne daß diese einen Wachstumsphänotyp der Zellen zur Folge hatte. Um einen solchen schwächeren Phänotyp zu untersuchen, wurde die Effizienz der Proteasomenreifung in den verschiedenen Mutanten analysiert. Mit Hilfe von Western-Analysen wurde daher die Prozessierung der Vorläuferform der proteasomalen Untereinheit Pre2p in den Mutanten untersucht.



**Abb. 20: Test auf Temperatursensitivität verschiedener *ump1*-Mutanten.** Der *ump1* $\Delta$ -Stamm JD134 wurde mit verschiedenen, plasmidcodierten *UMP1*-Allelen transformiert und Zellen der Transformanten auf Vollmedium bei 37°C für drei Tage inkubiert. Die *ump1*-Allele wurden durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese generiert, und codieren für Ump1-Proteine mit singulären Aminosäureaustauschen (Nummern 1-11, 13-16) bzw. für ein Ump1-Protein mit drei Aminosäureaustauschen (Nr.12). Zellen einer Transformante (Nr.5) sind auf beiden abgebildeten Agarplatten ausgestrichen.

WT: *UMP1*;  $\Delta$ : leerer Vektor; 1: *ump1*-D31A; 2: *ump1*-R34A; 3: *ump1*-E54A; 4: *ump1*-N59A; 5: *ump1*-R73A; 6: *ump1*-K83A; 7: *ump1*-E87A; 8: *ump1*-D108A; 9: *ump1*-E120A; 10: *ump1*-E143A; 11: *ump1*-H139R; 12: *ump1*-V26G,D31A,D108A; 13: *ump1*-Q64A; 14: *ump1*-D137A

Dazu wurden Zellextrakte der Transformanten hergestellt, in denen nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine, die mutierten HA-Epitop-markierten Ump1-Proteine sowie das Pre2-Protein mittels Immuno-Blot-Analyse detektiert wurden. Da der transformierte Stamm (JD134) ein chromosomales *PRE2*-Gen besaß, welches für ein (C-terminal) zweifach HA-Epitop-markiertes Pre2-Protein codiert, konnten in einer Analyse gleichzeitig mutiertes Ump1-Protein und Pre2-Protein untersucht werden.



**Abb. 21: Prozessierung der proteasomalen  $\beta$ -Untereinheit Pre2p in verschiedenen *ump1*-Mutanten.** Zellextrakte des Hefestammes JD134, die entweder kein *UMP1*-Gen, Wildtyp-*UMP1* oder mutierte Allele des *UMP1*-Gens exprimieren, wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Die immunologische Detektion der zweifach HA-Epitop-markierten Ump1- sowie Pre2-Proteine erfolgte unter Benutzung eines Maus-Anti-HA-Antikörpers. Die Laufhöhe der unprozessierten Vorläuferform (ProPre2p), der reifen Form (Pre2p), sowie eines Prozessierungsintermediates (\*) und des Ump1-Proteins sind angegeben. In den analysierten Extrakten (außer „*ump1* $\Delta$  + Ub-Pre2p“) konnten stärkere Signale von ProPre2p und Ump1p durch längere Expositionen der Immuno-Blots erhalten werden. In der linken Spur wurde zum Vergleich reifes Pre2p detektiert, welches durch *In-vivo*-Deubiquitinierung des Ubiquitin-Pre2-Fusionsprotein generiert wird. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein eingesetzt.

Während in den Zellextrakten der meisten untersuchten Mutanten eine dem Wildtyp entsprechende Menge an unprozessierter Vorläuferform des Pre2p sowie des reifen Pre2p detektiert wurden, zeigten zwei Mutanten eine vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Die Western-Analysen dieser beiden Mutanten sowie von fünf Mutanten (exemplarisch für solche ohne detektierten Phänotyp) sind in Abb. 21 wiedergegeben. Die das dreifach mutierte *UMP1*-Allel exprimierenden Zellen, welche wie zuvor gezeigt, auch einen Wachstumsdefekt äußerten, besitzen eine deutlich erhöhte Konzentration an unprozessiertem ProPre2-Vorläuferprotein. Die Mutante, die ein Ump1-Protein mit dem singulären Aminosäureaustausch R73A exprimierte, zeigte einen ähnlichen Effekt, allerdings in schwächerer Ausprägung. Zellen dieser Mutante zeigten zuvor auch kein merklich reduziertes Wachstum (Abb. 20). In beiden Mutanten ist gleichzeitig die Konzentration des Ump1-Proteins im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Da das Ump1-Protein normalerweise im Inneren des gereiften Proteasoms abgebaut wird, deuten diese Effekte auf einen geringeren Umsatz der mutierten Ump1-Proteine infolge einer ineffizienteren Proteasomenreifung hin. Dies könnte auf einen verringerten Einbau der Ump1-Proteine in die Vorläuferkomplexe, deren ineffiziente Assemblierung oder eine Inhibition anschließender Reifungsprozesse zurückzuführen sein. Weitere biochemische Untersuchungen müssen klären, welcher Reifungsschritt in den jeweiligen Mutanten betroffen ist (siehe Diskussion). Weil zwei der Mutationen (D31A sowie D108A), die in der Dreifach-Mutante vorhanden sind, alleine keinen Phänotyp verursachen, bleibt zu klären, ob der beobachtete Phänotyp auf die dritte Mutation (V26G) oder eine Kombination dieser Mutationen zurückzuführen ist .

### 3.8 Die „Propeptid-Hypothese“

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden die proteolytisch aktiven Untereinheiten eukaryotischer 20S-Proteasomen mit Propeptiden synthetisiert, die im Verlauf der Proteasomenreifung prozessiert werden. Die Untersuchungen in *S. cerevisiae* hatten gezeigt, daß das Propeptid der Pre2-Untereinheit aus Bäckerhefe eine essentielle Funktion in der Proteasomenreifung erfüllt, die wahrscheinlich auf einer Interaktion mit dem Proteasomenreifungsfaktor Ump1p beruht (Chen & Hochstrasser, 1996; Ramos *et al.*, 1998).

Wenn man nun die Primärstrukturen der Vorläuferproteine dieser  $\beta$ 5-Untereinheit (nach systematischer Bezeichnung) aus verschiedenen Spezies betrachtet, fällt auf, daß die reifen Anteile der Proteine stark konserviert sind, während die Propeptide erstaunlicherweise kaum Sequenzähnlichkeiten aufweisen (Abb. 22).

<i>S. cer.</i>	1	MQAIADSFVFNRLVKELQYDNEQNLESDFVTGASQFQRLAPSLTVPPPIA	
<i>K. lac.</i>	1	MQAIADDFSRSS--SVFTELND-EQTLRENFVLGDSQFKQLAPSLSMPPIS	
<i>S. pom.</i>	1	MNSIVSKYTQS-----TNNDPKKIIIEEGFTNRFDVVVP	
<i>D. mel.</i>	1	-MALAEICKISN-APYMRPNAWSSADVEEEQKGLMCNLANPYTLAAPPFE	
<i>M. mus.</i>	1	-MALASVLQRP-----MPVNQHGFGLGGADLLDLGPGS	
<i>H. sap.</i>	1	-MALASVLERP-----LPVNQRGFFGLGGRADLLDLGPGS	
<i>S. cer.</i>	51	SPQQFLRAHTDDSRNPDKIKIAHG	TTTLAFRFQGGIIVAVDSRATAG
<i>K. lac.</i>	48	TPQQFLRAHTDDSKNPDKIKIAHG	TTTLAFRFKGGIIVAVDSRATAG
<i>S. pom.</i>	37	QSSLYLRNLTDETKNKHCLIKMNHG	TTTLAFRYQHGIIVCVDSRASAG
<i>D. mel.</i>	49	NPLHNLNQIQANGDKTGVKINFDHG	TTTLGFKFKGGVLLAVDSRATGG
<i>M. mus.</i>	35	PGDGLSLAAPSWGVPPEEPRIEMLHG	TTTLAFKFLHGVIVAADSRTAG
<i>H. sap.</i>	35	LSDGLSLAAPGWGVPEEPGIEMLHG	TTTLAFKFRHGVIVAADSRTAG
		←-----	-----→
		Propeptide	reife Untereinheiten

**Abb. 22: Sequenzvergleich der Vorläuferproteine von  $\beta$ 5-Untereinheiten verschiedener Spezies.** Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Propeptide sowie der N-terminalen Regionen der reifen  $\beta$ 5-Untereinheiten aus den Hefen *S. cerevisiae* (*S. cer.*), *Kluyveromyces lactis* (*K. lac.*) und *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pom.*), aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*D. mel.*) sowie aus Maus (*M. mus.*) und Mensch (*H. sap.*). Aminosäurereste, die über alle oder nahezu alle Arten konserviert sind, sind blau unterlegt, während solche Reste, die unter den Hefen konserviert sind oder mit diesen übereinstimmen, orange unterlegt sind. Der Ursprung der beiden Pfeile gibt die Prozessierungsstelle der Vorläuferproteine an. Der Sequenzvergleich wurde unter Benutzung des Programms ClustalW1.8 durchgeführt. Die Informationen für die Aminosäuresequenzen wurden aus den Datenbanken unter Benutzung von BLAST oder im Falle des *K. lactis*-Proteins aus eigenen Sequenzdaten gewonnen (s. Abschnitt 2.16).

Dies war auch bei Sequenzvergleich der Vorläuferproteine der anderen proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des Proteasoms zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Des weiteren ist die Primärstruktur des Ump1-Proteins viel weniger konserviert als die der reifen  $\beta$ 5-Untereinheit (vgl. Abb. 13 in Abschnitt 3.4). Paarweise durchgeführte Sequenzvergleiche ergaben, daß 71 % bzw. 63% der Aminosäurereste der reifen  $\beta$ 5-Untereinheit aus

*S. cerevisiae* identisch mit denen der reifen  $\beta 5$ -Untereinheiten aus *S. pombe* und Mensch sind. Das Ump1-Protein aus *S. cerevisiae* besitzt hingegen nur zu 28 % bzw. 24 % identische Aminosäurereste mit dem homologen Protein aus *S. pombe* bzw. Mensch. Wie in Abschnitt 3.5 beschrieben, war nur das Ump1-Protein aus *K. lactis* in der Lage das Ump1p von *S. cerevisiae* funktionell zu ersetzen. Die Propeptide der  $\beta 5$ -Untereinheiten dieser Spezies zeigen auch als einzige deutliche Sequenzähnlichkeiten (Abb. 22).

Aus diesen Daten und der Beobachtung, daß das Propeptid von Pre2p nur in Anwesenheit des Ump1-Proteins für die Lebensfähigkeit der Hefezellen essentiell ist (siehe Einleitung, bzw. Abschnitt 3.9) wurde folgende „Propeptid-Hypothese“ abgeleitet. Die geringe Konservierung des Ump1-Proteins und der Propeptide proteasomaler Untereinheiten, z. B. von Pre2p ( $\beta 5$ ), beruht auf einer konvergenten evolutionären Entwicklung, die unabhängig von den reifen Anteilen der Untereinheiten erfolgte und durch die spezifische Interaktion von Ump1 mit den Propetiden bedingt wurde.

Diese Überlegungen weiterführend, wurden die Propetidsequenzen der  $\beta 5$ -Untereinheiten der „Housekeeping“-Proteasomen (X) aus Mensch und Maus mit denen der entsprechenden INF- $\gamma$ -induzierbaren Untereinheiten (LMP7) des Immuno-Proteasoms in einem Sequenzvergleich betrachtet (Abb. 23). Die Untereinheiten X aus Maus und Mensch sind auch bezüglich ihrer Propeptidsequenzen sehr konserviert. Gleiches gilt für die der LMP7-Vorläuferproteine. Erstaunlicherweise zeigen aber die Sequenzen der Propeptide von X- und LMP7-Untereinheiten innerhalb einer Spezies kaum Gemeinsamkeiten.

M. mus. LMP7	1	MALLDLCGAARGORPEWAALDAGSGGRSDPGHYSFSAQAPALALPRGM
H. sap. LMP7	1	MALLDVCRAPRGORPEVALPVAGSGRRSDRPDYSFMRSPALALPRGM
M. mus. X	1	MALASVLRPMPVNQHGFGLGGADLLDLG-----PGSP
H. sap. X	1	MALASVLERPLPVNQRGFFGLGGRADLLDLG-----PGSL
M. mus. LMP7	51	QPTAFLRSFGGDQERNVQIEMAHG TTTLAFKFOHGVIVAVDSRATAG
H. sap. LMP7	51	QPTEFFQSLGGDGERNVQIEMAHG TTTLAFKFOHGVIAAVDSRASAG
M. mus. X	38	GDGLSLAAPSWGVPPEEPRIEMLHG TTTLAFKFLHGVIVAADSRATAG
H. sap. X	38	SDGLSLAAPSWGVPPEEPGIEMLHG TTTLAFKFRHGVIVAADSRATAG

←----- Propeptide      reife Untereinheiten ----->

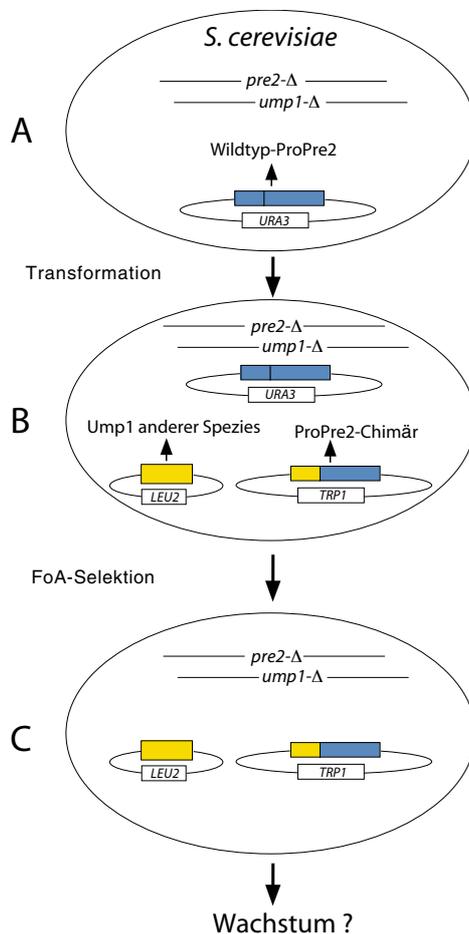
**Abb. 23: Sequenzvergleich der Vorläuferproteine der  $\beta 5$ -Untereinheiten X mit denen der  $\gamma$ -Interferon-induzierbaren Untereinheiten aus Maus und Mensch.** Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Propetide sowie der N-terminalen Regionen der reifen „Housekeeping“  $\beta 5$ -Untereinheiten (X) und den entsprechenden INF- $\gamma$ -induzierbaren Untereinheiten (LMP7) aus Maus (*M. mus.*) und Mensch (*H. sap.*). Aminosäurereste, die in allen Sequenzen identisch sind, sind blau, solche die unter den  $\beta 5$ -Untereinheiten übereinstimmen, violett und solche, die unter den INF- $\gamma$ -induzierbaren Untereinheiten übereinstimmen, hellrot unterlegt.

Aufgrund dieser auffälligen Eigenschaft kann man die zuvor beschriebene Hypothese weiterführen und postulieren, daß in Säugern ein zweiter, für Immuno-Proteasomen spezifischer Reifungsfaktor existiert. Um diese Hypothesen zu prüfen und Indizien für eine

spezifische Interaktion von Proteasomenreifungsfaktor und  $\beta$ 5-Propeptid zu finden, wurde eine Reihe verschiedener, in den folgenden Abschnitten beschriebener Studien durchgeführt.

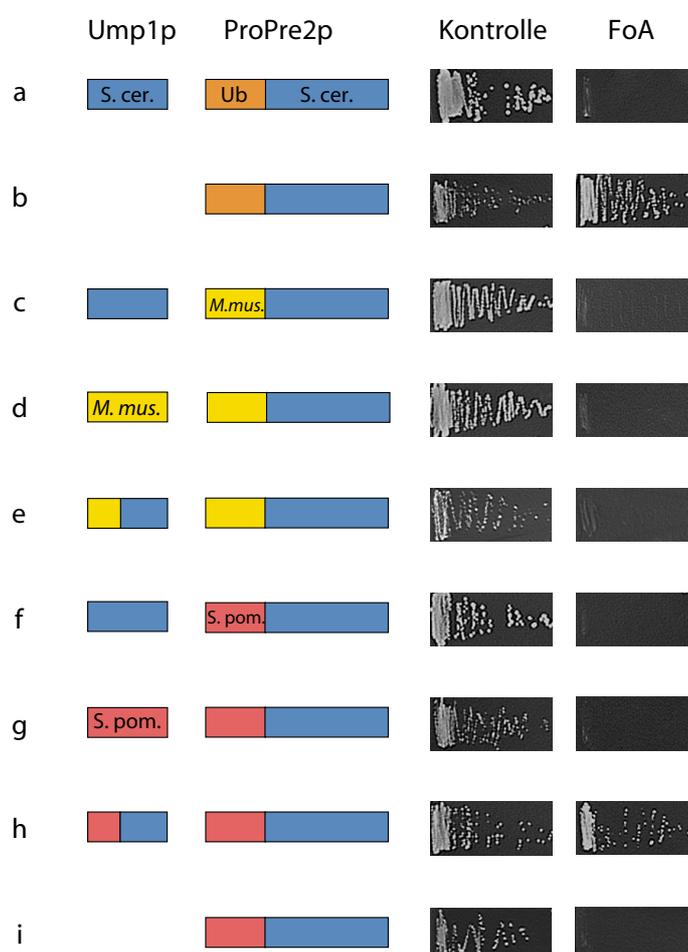
### 3.9 Untersuchungen zur spezifischen Interaktion von Ump1p und ProPre2p

Um die im vorigen Abschnitt beschriebenen Hypothesen zu untersuchen, wurden Nachweise für eine Spezies-spezifische Interaktion von Ump1-Protein und  $\beta$ 5-Propeptiden angestrebt. Dazu wurden Ump1-Proteine verschiedener Spezies oder Spezies-Chimären von Ump1p zusammen mit chimären Versionen von  $\beta$ 5-Vorläuferproteinen in der Bäckerhefe koexprimiert. Letztere bestanden aus dem der reifen Pre2-Untereinheit entsprechenden Teil des Pre2p von *S. cerevisiae*, welches N-terminal mit einem  $\beta$ 5-Propeptid aus einer anderen Spezies fusioniert worden war. Mit diesen plasmidcodierten Versionen wurde in Plasmid-Austausch-Experimenten untersucht, ob eine dieser chimären Pre2-Versionen (in Kombination mit einem bestimmten Ump1-Protein) das Wildtyp-Pre2-Protein funktionell ersetzen kann. Dazu wurden Pre2p- und Ump1p-Versionen in einem Hefestamm exprimiert (siehe Abb. 24), in dem die chromosomalen Loci für die Gene *PRE2* und *UMP1* deletiert waren. Dieser Stamm wurde am Leben gehalten durch die Anwesenheit des normalen *PRE2*-Gens auf einem *URA3*-markierten Plasmid (Stamm JD216 mit Plasmid pJD566).



**Abb. 24: Schematische Darstellung zum Prinzip der Plasmid-Austausch-Experimente.** A zeigt den Genotyp des Ausgangsstammes. Der Stamm ist für die Gene *UMP1* und *PRE2* chromosomal deletiert. Ein natürliches ProPre2-Protein wird von einem Plasmid mit *URA3*-Marker exprimiert. Nach Transformation mit zwei Plasmiden, die z. B. für ein Ump1-Protein einer anderen Spezies bzw. für eine Propeptid/Pre2-Protein-Chimäre mit Propeptid derselben Spezies codieren, wird der in B dargestellte Genotyp erhalten. Nach Überführung von Zellen dieser Transformanten auf FoA-haltiges Medium können Zellen nur wachsen, wenn die Kombination aus Ump1 und Propetid/Pre2-Chimäre das Wildtyp-ProPre2-Protein ersetzen kann, so daß der Verlust des für WT-ProPre2p codierenden Plasmides (*URA3*) zur FoA-Resistenz der Zellen führt (nähere Erläuterungen siehe Text).

Die Transformanten dieses Stammes wurden dann auf 5'-Fluororotat-(FoA)-haltigem Medium inkubiert. FoA wird in *URA3*<sup>+</sup>-Zellen durch das *URA3*-Genprodukt in das zytotoxische Fluororotidylat, einem Hemmer der Thymidylatsynthase, umgewandelt. Ein Wachstum von Zellen auf diesem Nährboden setzt somit den Verlust des *URA3*-Marker beinhaltenden Plasmides voraus und deutet dabei an, daß das Wildtyp-ProPre2-Protein durch das chimäre Pre2-Vorläuferprotein in Kombination mit dem exprimierten Ump1p ersetzt werden kann. Nach diesem Prinzip wurden die in der folgenden Abbildung dargestellten Kombinationen von Ump1-Proteinen (bzw. chimären Ump1p) und chimären ProPre2-Proteinen analysiert (Abb. 25).



**Abb. 25: Genetische Untersuchungen zur spezifischen Interaktion von Ump1-Protein und dem Propetid des Vorläuferproteins von Pre2 (ProPre2p).** Schematisch dargestellt sind die in Hefe exprimierten Kombinationen (a bis i) der Ump1-Proteine verschiedener Spezies bzw. Chimären derselben mit ProPre2-Protein-Varianten, welche entweder Propetide von homologen Vorläuferproteinen anderer Spezies oder kein Propetid besitzen. Letztere werden in der Zelle durch kotranslationale Abspaltung des N-terminal fusionierten Ubiquitins von den Ubiquitin-Pre2-Fusionsproteinen generiert (in Kombinationen a und b). Der Ausgangsstamm exprimiert zusätzlich ein Wildtyp-Pre2-Protein, welches von einem *URA3*-markierten Plasmid codiert wird. Das Wachstum der Zellen auf normalem Medium (Kontrolle) sowie nach Ausstrich auf FoA-haltigem Medium (FoA) ist hinter jeder Kombination dargestellt. (Nähere Erläuterungen siehe Text und Abb. 24.) Die dargestellten Plasmidkombinationen sind: a: pJD248/pJD577; b: pJDCEX2/pJD577; c: pJD248/pJD582-3; d: pJH32/pJD582-3; e: pJH33/pJD582-3; f: pJD248/pJD583; g: pJH36/pJD583; h: pJH41/pJD583; i: pJDCEX2/pJD583 (s. Abschn. 3.5 sowie 2.15.1 u. Tab.6 in Mat. & Meth.)

Von dem in Kombinationen a und b getesteten Ubiquitin-Pre2-Fusionsprotein wird das Ubiquitin kotranslational durch deubiquitinierende Enzyme abgespalten (siehe Einleitung), was zur Generierung des reifen Anteils des Pre2-Proteins führt. Diese Kombinationen verdeutlichten, daß die Deletion des Pre2-Propeptids in Gegenwart des Ump1-Proteins für die Hefezellen letal ist, während Zellen, denen das Ump1-Protein fehlt, auch das Propeptid entbehren können. Dieses Ergebnis wies auf eine für die Reifung von 20S-Proteasomen erforderliche Interaktion von Ump1p mit dem Propeptid der  $\beta$ -Untereinheit Pre2p hin.

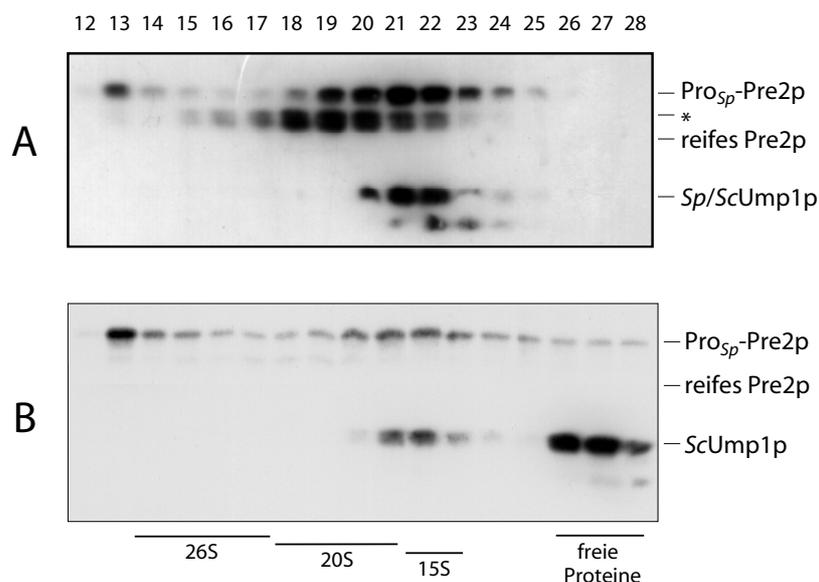
Exprimierte man ein Pre2-Fusionsprotein welches das Propeptid der entsprechenden Untereinheit aus der Maus besaß, zusammen mit dem Ump1-Protein aus *S. cerevisiae*, dem Ump1-Protein aus Maus oder mit der in Abschnitt 3.5 beschriebenen *Mm/ScUmp1p*-I-Chimäre (N-terminal 1/3 *MmUmp1p* mit C-terminal 2/3 *ScUmp1p*), konnten diese Zellen ein Wildtyp-Pre2-Protein nicht entbehren (Kombinationen c bis e, Abb. 25). Dies sprach dafür, daß diese Kombinationen keine funktionellen Kombinationen für die Proteasomenreifung bilden. Auch eine Pre2p-Chimäre mit dem Propetid aus dem entsprechenden Protein aus *S. pombe* in Kombination mit dem Ump1-Protein aus dieser Hefe oder aus *S. cerevisiae* bildeten keine kompatiblen Paare (f und g, Abb. 25). Wurde hingegen diese  $Pro_{S.pombe}$ -Pre2p-Chimäre zusammen mit einer *S. pombe/S. cerevisiae*-Ump1p-Chimäre exprimiert, konnten FoA-resistente Zellen erhalten werden (h, Abb. 25). Diese Kombination ließ also den Verlust des für das Wildtyp-Pre2p codierenden Plasmides zu, was auf eine für die Proteasomenreifung akzeptable Kombination von Ump1-Protein und Pre2-Vorläuferform hindeutete.

Das chimäre *Sp/ScUmp1p* war analog dem chimären *Mm/ScUmp1p* mit identischer Fusionsstelle konstruiert worden. Im Komplementationstest (vgl. Abschnitt 3.5) gingen aus *ump1 $\Delta$* -Zellen, die dieses Konstrukt exprimierten, bei 37°C keine Kolonien hervor (Daten nicht gezeigt). Andererseits konnte die  $Pro_{S.pombe}$ -Pre2p-Chimäre in Abwesenheit eines Ump1-Proteins das Wildtyp-Pre2p nicht ersetzen (h, Abb. 25). Diese Experimente zeigten somit, daß eines der beiden chimären Proteine alleine offenbar nicht für die Funktionalität ausreichend war. Daher sprach die Funktionalität der Kombination beider Chimären für eine spezifische Interaktion des *Sp/Sc-Ump1p* mit dem  $\beta$ 5-Propetid aus *S. pombe*.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Kombination von *Sp/ScUmp1p*-Chimäre und  $Pro_{Sp}$ -Pre2p-Chimäre eine korrekte, dem Wildtyp entsprechende Assemblierung und Reifung des 20S-Proteasoms vermittelt. Von den FoA-resistenten Zellen wurden daher Zellextrakte für eine Fraktionierung durch Gelfiltration hergestellt. Anschließend erfolgte die Analyse der einzelnen Fraktionen mittels Western-Blot-Verfahren und immunologischer Detektion der chimären Ump1- und Pre2-Proteine, die jeweils C-terminale HA-Epitopmarkierungen trugen. Parallel dazu wurde Zellextrakt von Zellen, die die  $Pro_{Sp}$ -Pre2p-Chimäre und das Ump1p aus *S. cerevisiae* (Kombination f in Abb. 25) exprimierten, in gleicher Weise analysiert. Diese Zellen enthielten zusätzlich das für das Wildtyp-Pre2-Protein codierende Plasmid, ohne das die Zellen nicht wachsen konnten. Das Ergebnis dieser

Analysen ist in der Abb. 26 illustriert. Die Extrakte der verschiedenen Zellen wurden durch Gelfiltration über eine Superose-6-Säule fraktioniert. Eine solche Gelfiltration führt zu einer charakteristischen Verteilung bestimmter Proteasomenreifungsstadien in den einzelnen Fraktionen (Ramos *et al.*, 1998). Anhand dieses Verteilungsmusters läßt sich bei spezifischer Detektion einer proteasomalen  $\beta$ -Untereinheit ihr Einbau bzw. ihre Prozessierung im Verlauf der Proteasomenreifung verfolgen.

Aus der in Abb. 26, A dargestellten immunologischen Detektion der Pro<sub>Sp</sub>-Pre2p-Formen sowie des chimären Sp/ScUmp1p konnte geschlossen werden, daß beide Proteine recht effizient in das Proteasom eingebaut werden. Das Sp/ScUmp1-Protein war in den typischen Fraktionen für Proteasom-Vorläuferkomplexe sowie frühen 20S-Proteasomenreifungsstadien nachweisbar. Infolge der Proteasomenreifung, wird es vom reifen 20S-Proteasom abgebaut und war daher in schweren Fraktionen nicht zu detektieren. Das chimäre Pro<sub>Sp</sub>-Pre2p wird in die 20S-Proteasom-Vorläuferkomplexe eingebaut und anschließend im 20S-Proteasom prozessiert. Allerdings verläuft diese Prozessierung offenbar annormal. Eine für die Größe des reifen, korrekt prozessierten Pre2-Proteins charakteristische Bande (Laufhöhe in Abb. 26 angedeutet) konnte nicht detektiert werden.



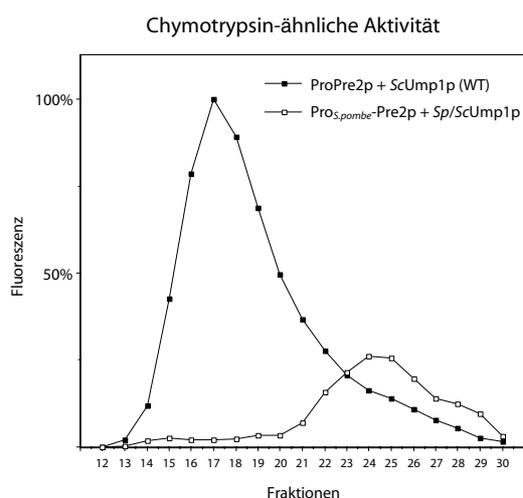
**Abb. 26: Western-Analyse von durch Gelfiltration fraktionierten Zellextrakten aus Hefen**, die entweder ein chimäres Pro<sub>Sp</sub>-Pre2-Vorläuferprotein (mit Propetid der homologen Proteasomuntereinheit aus *S. pombe*) zusammen mit dem chimären Sp/ScUmp1-Protein (A) oder ScUmp1-Protein (B) exprimieren. Die nach der Methode von Ramos *et al.* (1998) durchgeführte Gelfiltration über eine „Superose-6“-Säule führt zu einer charakteristischen Verteilung bestimmter Proteasomenreifungsstadien in den einzelnen Fraktionen. Die Fraktionen 14 bis 17 (mit schweren Zellkomponenten) enthalten das vollständig assemblierte 26S-Proteasom, die Fraktionen 18 bis 21 20S-Proteasomkomplexe, während in den Fraktionen 22 und 23 die Halbproteasom-Vorläuferkomplexe (~15S-Komplexe) nachgewiesen werden. Später eluierende Fraktionen enthalten Vorstufen der ~15S-Komplexe und freie nicht eingebaute Komponenten des Proteasoms. Die Laufhöhe des in den Fraktionen nicht detektierten korrekt prozessierten, reifen Pre2-Proteins ist angedeutet. Der Stern markiert die Laufhöhe eines Prozessierungsprodukts intermediärer Größe des Pro<sub>Sp</sub>-Pre2-Vorläuferproteins.

Gleichzeitig scheinen die dieses Prozessierungsprodukt enthaltenden Proteasomkomplexe im Vergleich zu reifen 26S-Proteasomkomplexen in deutlich höherer Konzentration in den Zellen vorzuliegen. Möglicherweise resultiert dies aus einer Akkumulation dieser Reifungsstadien aufgrund einer verzögerten Reifungskinetik.

Teil B der Abb. 26 illustriert vergleichend den Einbau des chimären Pro<sub>Sp</sub>-Pre2p in Gegenwart des ScUmp1-Proteins. Man bedenke aber, daß die Zellen gleichzeitig das plasmidcodierte Wildtyp-Pre2-Protein exprimierten, welches nicht immunologisch nachgewiesen wurde. Allerdings zeigte diese Untersuchung deutlich, daß das in Proteasomen eingebaute Pro<sub>Sp</sub>-Pre2-Protein kaum oder gar nicht prozessiert wird.

Das erstaunliche Ergebnis der zuvor beschriebenen Analyse der vermeindlich funktionellen Kombination war also, daß durch die immunologische Detektion keine reifen Pre2-Proteine in den Fraktionen nachgewiesen werden konnten. Schließlich konnten Zellen, die diese Proteinkombination exprimierten, ein Wildtyp-Pre2-Protein entbehren, was auf eine funktionelle Proteasomreifung in Gegenwart der chimären Proteine hindeutete.

Um zu prüfen, ob die detektierten prozessierten Pre2p-Formen proteolytische Aktivität zeigen, wurden die Fraktionen der Gelfiltration in einem enzymatischen Test analysiert. Bestimmt wurden die auf der Aktivität der reifen  $\beta$ -Untereinheit Pre2p beruhende Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (Einleitung 1.4.4). Als Referenz wurden die Fraktionen aus der Transformante analysiert, die das Pro<sub>Sp</sub>-Pre2-Protein, das ScUmp1p sowie das Wildtyp-Pre2-Protein exprimiert. Die in den Fraktionen dieses Stammes (mit Wildtyp-*PRE2*) gemessene Fluoreszenz (Abb. 27) ergab Maximalwerte in den Fraktion 17 und 18, welche die reifen 20S-Proteasomen enthalten (vgl. Abb. 26 und Abb. 27).



**Abb. 27: Chymotrypsin-ähnliche Aktivität in den durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen der Rohextrakte aus Hefen, die das chimäre Pro<sub>Sp</sub>-Pre2-Vorläuferprotein (mit Propetid der homologen Proteasomenuntereinheit aus *S. pombe*) zusammen mit dem chimären Sp/ScUmp1-Protein exprimieren. Analog wurde diese proteolytische Aktivität in den Fraktionen aus Hefezellextrakten bestimmt, welche Wildtyp-Pre2-Vorläuferprotein und Wildtyp ScUmp1-Protein exprimieren. Die höchste der in Fraktion 17 dieses Vergleichsstammes gemessene Aktivität wurde gleich 100% gesetzt.**

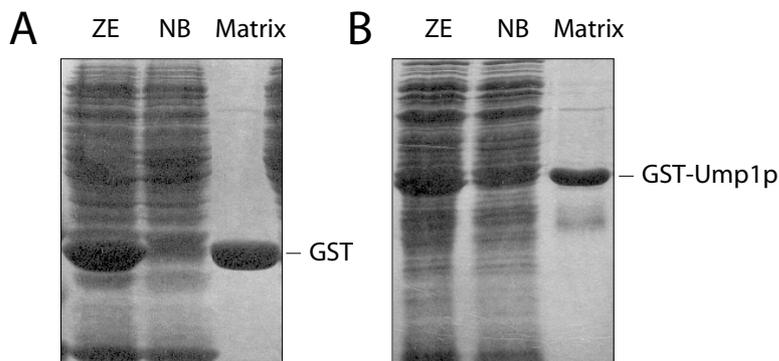
In den entsprechenden benachbarten Fraktionen konnte aus den Zellen, welche die Kombination aus Pro<sub>Sp</sub>-Pre2p-Chimäre und Sp/ScUmp1p-Chimäre exprimieren, nahezu keine chymotrypsin-ähnliche Aktivität gemessen werden. Es war daher davon auszugehen, daß in diesen Zellen, wie schon die Western-Analysen derselben Fraktionen andeuteten,

keinerlei aktive Pre2-Untereinheiten während der Proteasomenreifung generiert werden. Die Bedeutung dieses Befundes im Hinblick auf die Proteasomenreifung, sowie die in diesen Zellen detektierte Aktivität in den späten Fraktionen, werden in Abschnitt 4 diskutiert.

### **3.10 Biochemische Analysen zum Nachweis spezifischer Protein-Protein-Interaktionen des Proteasomenreifungsfaktors Ump1p**

Die Beobachtungen aus verschiedenen bisher geschilderten Experimenten deuteten auf eine spezifische Interaktion des Proteasomenreifungsfaktors mit den Propetiden der Vorläuferproteine proteasomaler Untereinheiten hin. Die Sequenzanalyse der Ump1-Proteine und der  $\beta$ 5-Vorläuferproteine verschiedener Spezies sowie die genetische Funktionsanalyse von chimären-Proteinen ermunterten dazu, einen weiteren Versuch zum Beweis dieser Interaktionen zu unternehmen. Am effektivsten, so war die Überlegung, wäre es ein System zu etablieren, mit dem die Interaktion des Ump1-Proteins mit verschiedenen proteasomalen Untereinheiten parallel untersucht werden kann und welches diese Interaktion auf direktem Weg biochemisch nachweist. Es wurde daher angestrebt, das Ump1-Protein spezifisch an eine Matrix zu binden. Es sollte dann zunächst untersucht werden, ob das Vorläuferprotein einer bestimmten proteasomalen Untereinheit aufgrund einer effizienten Bindung an das immobilisierte Ump1-Protein aus einem Zellextrakt isoliert werden kann. Sollte dies der Fall sein, sollte anschließend untersucht werden, welche Rolle das Propeptid für diese Interaktion spielt.

Dazu wurde zunächst ein Expressionvektor für die Expression eines Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase (GST) und dem Ump1-Protein der Bäckerhefe in *E. coli* konstruiert. Diese GST-Ump1p-Fusion wurde dann aus Extrakten von *E. coli*-Zellen durch Bindung an eine Glutathion-Sepharose-Matrix aufgereinigt. Als Kontrolle für die spätere Bindungsanalyse wurde analog mit in *E. coli* exprimiertem GST-Protein verfahren. Die Ergebnisse der Aufreinigungen dieser beiden Proteine durch spezifische Bindung an die Glutathion-Sepharose-Matrix ist in der folgenden Abb. 28 veranschaulicht. Dargestellt ist durch Coomassie-Färbung detektiertes Protein nach Auftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Die jeweils linke Spur zeigt das Protein der Zellextrakte aus *E. coli*, welches für die Bindung an Glutathion-Sepharose-Matrix eingesetzt wurde. In der jeweils mittleren Spur wurde nicht gebundenes Protein aufgetragen und in der rechten Spur das Protein, welches nach Waschen der Matrix durch Kochen abgelöst wurde. Die aufgetragenen Proben wurden aliquotiert und entsprechen der Proteinmenge, die für die Bindung an 5  $\mu$ l Glutathion-Sepharose-Matrix eingesetzt wurde bzw. die an 5  $\mu$ l Matrix gebunden hat.

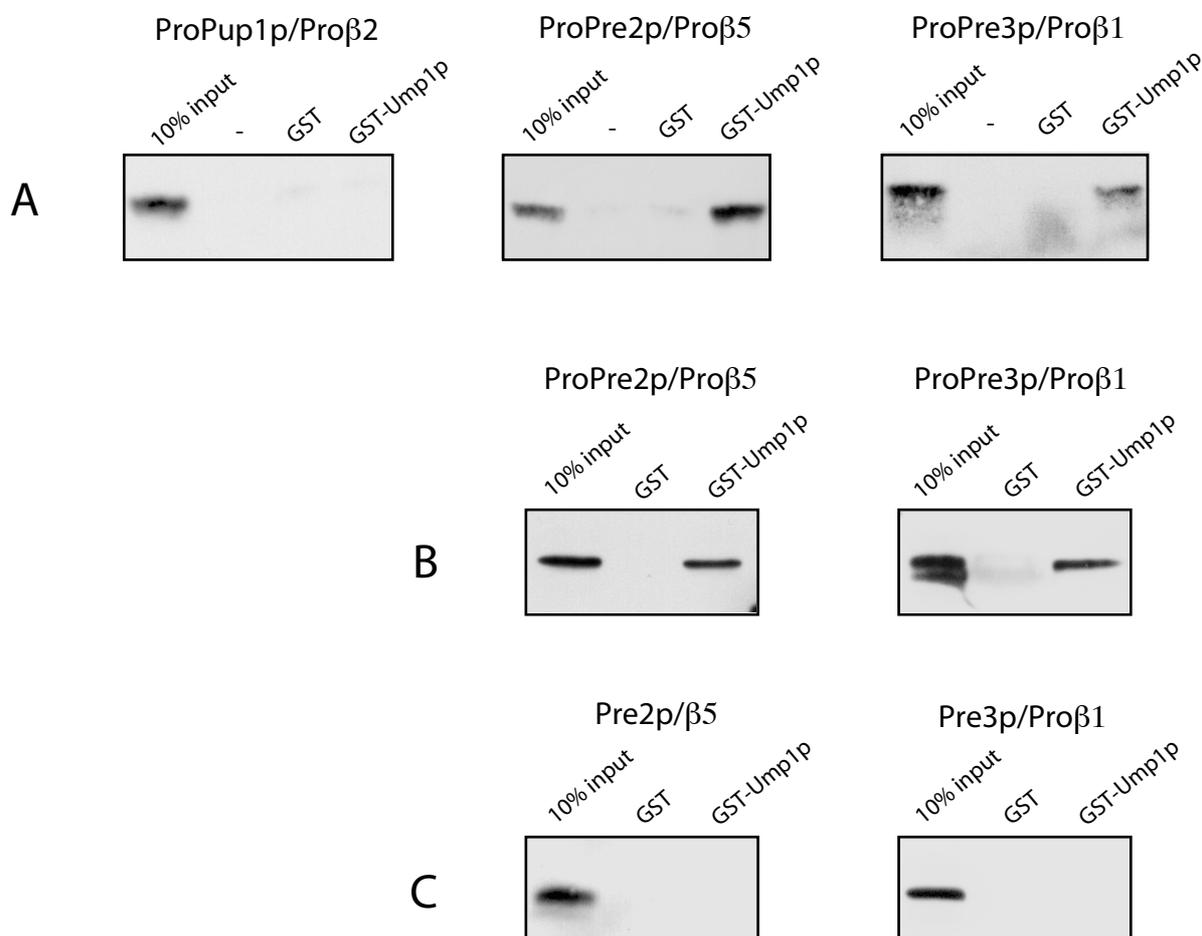


**Abb. 28: Analyse der Aufreinigung von GST-Protein (A) und GST-Ump1p-Fusionsprotein (B) durch Bindung an eine Glutathion-Sepharose-Matrix.** Gezeigt ist Coomassie-gefärbtes Protein nach Auftrennung durch SDS-PAGE. „ZE“: Zellextrakt aus GST-Protein- bzw. GST-Ump1p exprimierenden *E. coli*-Zellen; „DF“: nicht gebundenes Protein; „Matrix“: an die Matrix gebundenes Protein nach Waschen. Die aufgetragenen Mengen entsprechen der Proteinmenge, die zur Bindung an 5  $\mu$ l Matrix eingesetzt wurde bzw. die an 5  $\mu$ l Matrix gebunden hatte.

Jeweils 10  $\mu$ l der mit GST-Protein bzw. GST-Ump1-Fusionsprotein beladenen Glutathion-Sepharose wurden nun für die im folgenden beschriebenen Bindungsanalysen eingesetzt. Die beladene Glutathion-Sepharose wurde zunächst zur Herstellung von „Mini-Säulen“ in 200  $\mu$ l fassende, mit Glaswolle präparierte, Pipettenspitzen gefüllt. Anschließend erfolgte eine Beladung der Säulen mit Zellextrakten aus Hefestämmen, die jeweils ein Vorläuferprotein der drei aktiven proteasomalen Untereinheiten in hohem Maße exprimieren und gleichzeitig kein Ump1-Protein enthalten. Die Hefestämme resultierten aus Transformationen des Hefestammes JD59 (*ump1 $\Delta$* ) mit Hochkopienzahl-Plasmiden, die für HA-Epitop-markierte ProPre2-, ProPre3- bzw. ProPup1-Proteine codieren (Abschnitt 2.35.1). Nach Durchfluß der Hefezelleextrakte und Waschen des Säulenmaterials wurde die Matrix aus den Spitzen gedrückt und in Western-Analysen untersucht. Wenn sich dabei das Vorläuferprotein einer proteasomalen Untereinheit in der Probe aus mit GST-Ump1-Protein beladenen Säulen nachweisen ließe und nicht in den Proben aus der mit GST beladenen Säule, wäre das ein Beweis für eine Aufreinigung der Untereinheit aufgrund einer spezifischen Interaktion mit dem Ump1-Protein. Für diese Folgerung mußte allerdings noch sichergestellt sein, daß diese Aufreinigung nicht auf einer unspezifischen Bindung an freie Bindungsplätze der Matrix beruhte. Denn es war vorstellbar, daß die mit GST-Protein beladene Säule vollständig mit GST-Protein abgesättigt war, während die Säule mit dem GST-Ump1-Protein, aufgrund einer geringeren Affinität des Fusionsproteins, freie Bindungsstellen aufwies. Aus diesem Grund wurde in parallelen Ansätzen eine entsprechende Menge Hefezelleextrakt auch auf eine Mini-Säule gegeben, welche zuvor nicht mit GST oder GST-Fusionsprotein beladen wurde.

Die Ergebnisse der beschriebenen Protein-Protein-Bindungsanalysen sind in Abb. 29, A zusammengefaßt. Sie verdeutlicht, daß über die mit GST-Ump1p beladenen Säulen Vorläuferproteine von Pre2 und Pre3p aus den Zellextrakten aufgereinigt wurden, während das Vorläuferprotein von Pup1 nicht durch Bindung an diese Säule aus dem Hefextrakt isoliert werden konnte. Weil die unbeladene Matrix sowie die mit GST beladene

Matrix unter denselben Bedingungen keine Pre2- bzw. Pre3-Untereinheiten gebunden hatte, konnte geschlossen werden, daß die Aufreinigung der Vorläuferproteine ProPre2p und ProPre3p auf einer spezifischen Interaktion mit dem Ump1-Protein beruhte.



**Abb. 29: Aufreinigung der Vorläuferproteine proteasomaler Untereinheiten durch Bindung an immobilisiertes GST-Ump1-Fusionsprotein.** Dargestellt sind immunologische Detektionen der Vorläuferproteine (A und B) sowie der reifen Proteine (C) von Pup1p, Pre2p und Pre3p aus *S. cerevisiae* durch Western-Analyse. In der jeweils linken Spur wurde 10 % des jeweilig eingesetzten Hefezell-extraktes analysiert, welches auf verschiedene Säulen geladen wurde. Das nach Waschen der Säulen an die Matrix gebundene Protein wurde abgelöst und in den übrigen Spuren aufgetragen. Sie enthalten das abgelöste Protein von Glutathion-Sepharose-Säulen ohne daran gebundenes Protein (-), mit gebundenem GST-Protein (GST) und mit gebundenem GST-Ump1-Fusionsprotein (GST-Ump1). In B wurden filtrierte Hefezell-extrakte eingesetzt, die frei von Proteasomen-Vorläuferkomplexen waren. In C wurden Zellextrakte verwendet, welche erhöhte Konzentrationen an reifem Pre2- bzw. Pre3-Protein besitzen. Die Detektion der C-terminal zweifach HA-Epitop-markierten Proteine erfolgte unter Benutzung von Anti-HA-Antikörpern. Nähere Erläuterungen siehe Text. (Die neuen systematischen Bezeichnungen der proteasomalen Untereinheiten sind hinter den Querstrichen angegeben).

Nach diesem Ergebnis, stellte sich noch die Frage, ob die erfolgreiche Aufreinigung der beiden Vorläuferproteine tatsächlich auf einer direkten Interaktion mit dem Reifungsfaktor Ump1p basierte. Möglich war auch, daß das Ergebnis aus einer indirekten

Interaktion resultierte. Es konnte bereits gezeigt werden, daß im Verlauf der Proteasomassemblierung Vorläuferkomplexe entstehen, die ganz bestimmte proteasomale Untereinheiten enthalten und andere nicht (Nandi *et al.*, 1997). Würde ein in der Hefe entstehender putativer Vorläuferkomplex die Vorläuferproteine von Pre2p und Pre3p, aber nicht von Pup1p beinhalten und über eine andere oder mehrere Untereinheit(en) mit dem Ump1-Protein interagieren, ergäbe dies möglicherweise dasselbe Ergebnis in der Western-Analyse. Gesucht wurde deshalb nach einer einfachen Methode, die es ermöglichte komplex-gebundene Untereinheiten von dem Bindungsexperiment auszuschließen. Die wie zuvor hergestellten Hefezellextrakte wurden daher per Zentrifugation durch eine Membran filtriert, die keine Proteine mit Molekulargewichten von größer oder gleich 100 kDa passieren läßt. Die freien Vorläuferproteine von Pre2p bzw. Pre3p besitzen ein errechnetes Molekulargewicht von 32 kDa bzw. 24 kDa, während bisher identifizierte Proteasom-Vorläuferkomplexe (aufgrund der Präsenz eines kompletten Ringes aus  $\alpha$ -Untereinheiten) Molekulargewichte von mehr als 200 kDa besitzen. Es war somit gewährleistet, daß durch die Filtration der Hefezellextrakte Filtrate erhalten wurden, die frei von Proteasom-Vorläuferkomplex-gebundenen  $\beta$ -Untereinheiten waren. Mit diesen wurde das zuvor beschriebene Experiment erneut durchgeführt. Die Western-Analyse in Abb. 29, B zeigt, daß sich die im Filtrat vorliegenden Vorläuferformen von Pre2p und Pre3p identisch mit denen in Zellextrakten verhalten.

Dieser Befund wies darauf hin, daß das Ump1-Protein direkt an die Vorläuferformen von Pre2p und Pre3p bindet. Als nächstes sollte dann untersucht werden, welche Rolle die Propeptide bei diesen beobachteten Interaktionen spielen.

Wie in der Einleitung beschrieben, geschieht die Prozessierung der Vorläuferproteine der aktiven proteasomalen  $\beta$ -Untereinheiten infolge der Zusammensetzung zweier Halbproteasomen zum 20S-Proteasom. In Wildtyp-Hefezellen dürften daher kaum freie Formen der reifen  $\beta$ -Untereinheiten vorkommen. Um für eine analoge Bindungsanalyse Hefezellextrakte herstellen zu können, welche die reifen Pre2- und Pre3-Untereinheiten in freier Form und in erhöhter Konzentrationen beinhalten, wurden neue Hochkopienzahl-Plasmide konstruiert. Diese codieren für Fusionsproteine aus einem Ubiquitin-Molekül und dem reifen Anteil des Pre2- bzw. Pre3-Proteins (ebenfalls mit HA-Epitopen C-terminal markiert). In mit diesen Plasmiden transformierten Hefen werden die Ubiquitineinheiten von den Fusionsproteinen kotranslational durch deubiquitinierende Enzyme abgespalten, was zur Freisetzung der reifen Untereinheiten führt.

Mit Extrakten dieser Transformanten des Hefestammes JD59 wurde die zuvor beschriebene Bindungsanalyse wiederholt. Das interessante Ergebnis der abschließenden Western-Analyse ist im Teil C der Abb. 29 dargestellt. Trotz mehrfacher Wiederholung des Experimentes unter variierten Bedingungen und der Benutzung von positiven Kontrollen konnte keine Bindung der reifen Pre2- und Pre3-Proteine an das Ump1-Protein nachgewiesen werden. Daraus wurde gefolgert, daß das Propetid dieser beiden

Vorläuferproteine proteasomaler Untereinheiten für eine Bindung an den Reifungsfaktor essentiell ist.

### **3.11 Untersuchung der $\gamma$ -Interferon-abhängigen Regulation des *UMP1*-Gens in Säugierzellen**

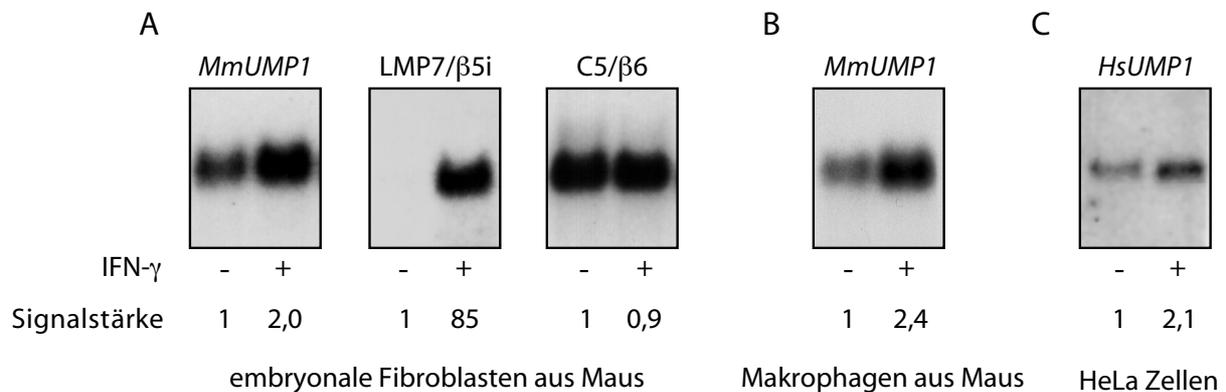
Ausgehend von der in Abschnitt 3.8 erläuterten Hypothese wurde der Fragestellung nachgegangen, ob es in Säugierzellen zwei Reifungsfaktoren gibt, von denen der Eine spezifisch die Assemblierung und Reifung der normalen „Housekeeping“-Proteasomen und der Zweite die der 20S-Immuno-Proteasomen vermittelt. Inzwischen sind insgesamt mehr als 300 unabhängig isolierte cDNA-Sequenzen der *UMP1*-Homologen aus Maus, Ratte und Mensch in den Datenbanken gespeichert, die alle auf dasselbe Gen der jeweiligen Spezies zurückzuführen sind. Wie in Abb. 13 des Abschnitts 3.4 gezeigt, sind die Proteine, für die diese cDNAs in Maus, Ratte und Mensch codieren, nahezu identisch. Zudem konnten in den Datenbanken keine Sequenzen gefunden werden, die auf ein mit diesen verwandtes Gen aus Säugern hindeuten. Weil die Wahrscheinlichkeit der Isolierung von cDNAs konstitutiv exprimierter Gene höher ist, als für solche Gene, die nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen angeschaltet werden, könnte man vermuten, daß die in Säugern identifizierten *UMP1*-Genprodukte die Reifung der konstitutiven „Housekeeping“-Proteasomen vermitteln. Das Gen für einen putativen spezifischen Reifungsfaktor des Immuno-Proteasoms wird möglicherweise fakultativ, z. B. bei Aktivierung der entsprechenden Immunantwort der Zelle exprimiert. Daher könnte die entsprechende cDNA in den bislang generierten cDNA-Banken unterrepräsentiert oder gar nicht vorhanden sein.

Denkbar wäre aber auch, daß das Genprodukt der identifizierten *UMP1*-Gene aus Säugern für die Reifung beider Proteasomentypen zuständig ist. Die im folgenden beschriebenen Analysen sollten zunächst klären, ob die identifizierten *UMP1*-Gene aus Maus und Mensch in ihrer Expression durch  $\gamma$ -Interferon (INF- $\gamma$ ) reguliert werden. Sollte dies der Fall sein, wäre das ein plausibles Argument dafür, daß diese *UMP1*-Genprodukte auch an der Reifung des Immuno-Proteasoms beteiligt sind.

#### **3.11.1 Analyse der Transkription der *UMP1*-Gene von Maus und Mensch in Abhängigkeit von INF- $\gamma$ -Stimulierung**

Um zunächst zu untersuchen, ob die Transkription des *UMP1*-Gens in Säugern in Abhängigkeit einer INF- $\gamma$ -Stimulierung reguliert wird, wurden verschiedene Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Von U. Boehm (aus dem Labor von J. Howard, Inst. f. Genetik der Universität Köln) zur Verfügung gestellte Nylon-Membranen enthielten jeweils 10  $\mu$ g aufgetrennte Gesamt-RNA aus Säugierzellen, welche mit und ohne Zusatz von 1000 U/ml

INF- $\gamma$  kultiviert worden waren (Boehm *et al.*, 1998). Insgesamt wurden drei verschiedene Membranen in unabhängigen Analysen eingesetzt, eine Membran mit transferierter RNA aus menschlichen HeLa-Zellen, eine mit RNA einer Makrophagen-Zelllinie (ANA-1) aus Maus und eine weitere mit RNA aus embryonalen Fibroblasten aus Maus (Abb. 30).



**Abb. 30: Transkription der *UMP1*-Gene in Zellen aus Maus und Mensch in Abhängigkeit von Stimulierung durch  $\gamma$ -Interferon (INF- $\gamma$ ).** Northern-Blot-Analysen zur Bestimmung der *UMP1*-Transkriptmengen in der Gesamt-RNA von embryonalen Fibroblasten (A) sowie Makrophagen (B) aus Maus und menschlichen HeLa-Zellen (C) infolge einer Stimulierung (+) der Zellen mit 1000 U/ml INF- $\gamma$  für 24 h. Die RNA aus embryonalen Fibroblasten der Maus (A) wurde in drei separaten Experimenten mit markierter *UMP1*-DNA aus Maus (*MmUMP1*), mit markierter DNA codierend für die INF- $\gamma$  induzierbaren Proteasomenuntereinheit LMP7 ( $\beta$ 5i) und mit markierter DNA, codierend für die konstitutiv exprimierte Proteasomenuntereinheit C5 ( $\beta$ 6) hybridisiert. Die RNA aus HeLa-Zellen wurde mit markierter *UMP1*-DNA aus Mensch (*HsUMP1*) hybridisiert. Die Ergebnisse aus der Quantifizierung der Signale sind als relative Werte angegeben, wobei die Signalstärke bei der RNA aus nicht induzierten Zellen gleich 1 gesetzt wurde. Als Sonden wurden mittels PCR amplifizierte,  $^{32}$ P-markierte cDNAs eingesetzt (siehe Abschnitte 2.20 und 2.21).

Nach Hybridisierung der transferierten RNA mit den *UMP1*-Sonden wurde die gebundene Radioaktivität quantifiziert. Die Membran mit der embryonalen Fibroblasten-RNA wurde nach Entfernen der hybridisierten Sonden einer Analyse mit weiteren Proben unterzogen (Abb. 30, A). Zum Nachweis einer effizienten INF- $\gamma$ -Induktion der Zellen und zum Vergleich erfolgte eine Hybridisierung mit markierter LMP7-DNA. Eine weitere Hybridisierung wurde durchgeführt um zu ermitteln, ob die INF- $\gamma$ -Stimulierung insgesamt zu einer erhöhten Expression proteasomaler Gene führt. Dies geschah mit markierter DNA, welche für die konstitutiv exprimierte Proteasomenuntereinheit C5/ $\beta$ 6 aus Maus codiert. Diese Untereinheit ist sowohl Bestandteil der „Housekeeping“- als auch der Immuno-Proteasomen.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Northern-Analysen, daß die *UMP1*-Gene in Maus und Mensch einer Induktion durch INF- $\gamma$  unterliegen. Die Quantifizierung der Signale ergab eine zweifache Zunahme der *UMP1*-Transkriptmengen in den embryonalen Fibroblasten der Maus durch INF- $\gamma$ -Stimulierung. Die Transkriptmenge der für das Immuno-Proteasom spezifischen Untereinheit LMP7 stieg dagegen um den Faktor 85, während die

Transkriptmenge der konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit C5 (beider Proteasomentypen) unverändert war.

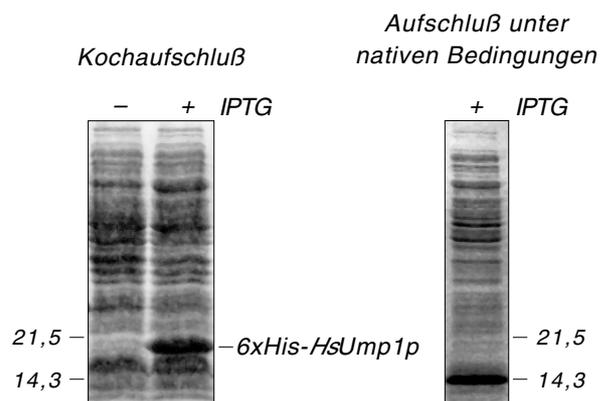
Diese erstaunlichen Befunde sprachen zunächst dafür, daß die Genprodukte der identifizierten *UMP1*-Homologen aus Säugern möglicherweise die Assemblierung und Reifung beider Proteasomentypen vermitteln. Dies stand im Widerspruch zu den aus der zuvor erläuterten „Propeptid-Hypothese“ abgeleiteten Überlegungen. Zu klären war allerdings noch, ob die erhöhten Transkriptmengen der Säuger-*UMP1*-Gene in INF- $\gamma$ -induzierten Säugerzellen auch zu einer entsprechend erhöhten zellulären Konzentration des Proteasomenreifungsfaktors führen. Zur Bestimmung derselben und für weitere biochemische und immunlogische Untersuchungen zum Ump1-Protein in Säugerzellen wurden spezifische Antikörper gegen das humane Ump1-Protein hergestellt.

### **3.11.2 Aufreinigung des menschlichen Ump1-Proteins zur Erzeugung polyklonaler Anti-HsUmp1-Antikörper**

Um die Gewinnung großer Mengen des Ump1-Proteins zu ermöglichen, wurde eine Version dieses Proteins in *E. coli* exprimiert, die am N-Terminus mit einem Affinitäts-Epitop aus sechs Histidin-Resten (6xHis) markiert war. Diese Modifikation erlaubte die Aufreinigung des menschlichen Ump1-Proteins unter Benutzung einer Ni<sup>2+</sup>-NTA („Nitrilo-Tri-Acetic Acid“)-Matrix.

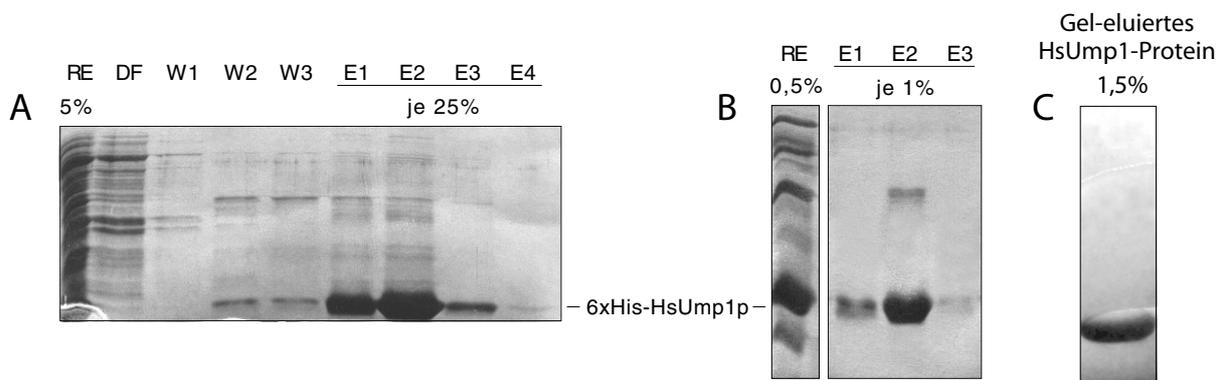
Um die Expression des 6xHis-HsUmp1p zu überprüfen, wurden die *E. coli*-Zellen (nach Induktion durch 1 mM IPTG für 1,5 h) in Laemmli-Probenpuffer gekocht und ein Aliquot des Überstandes durch gelelektrophoretische Trennung und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 31). Das detektierte 6xHis-HsUmp1-Derivat besitzt ein apparentes Molekulargewicht von ca. 20 kDa, während theoretisch ein Molekulargewicht von 18,0 kDa errechnet wurde. Eine Abschätzung durch Vergleich mit dem Molekulargewichts-Standard ergab unter den verwendeten Expressionsbedingungen eine Menge von etwa 10  $\mu$ g 6xHis-HsUmp1p pro OD<sub>600</sub>-Einheit *E. coli*-Zellen.

Anschließend erfolgten verschiedene Zellaufschlüsse unter nativen Bedingungen. Eine den Lysaten des Kochaufschlusses entsprechende Analyse dieser Zellextrakte ließ keine Detektion des 6xHis-HsUmp1-Proteins zu (siehe Abb. 31). Daraus wurde geschlossen, daß das Protein unter Benutzung des beschriebenen Expressionssystems unlöslich ist. Da für eine Gewinnung polyklonaler Antikörper das Protein nicht nativ aufgereinigt werden muß, wurde beschlossen, eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen durchzuführen.



**Abb. 31: Expression und Löslichkeit des 6xHis-markierten menschlichen Ump1-Proteins in *E. coli*-Zellen.** SDS-PAGE und Coomassie-Färbung von Extrakten aus *E. coli*-Zellen, welche 6xHis-markiertes menschliches Ump1-Protein (6xHis-HsUmp1p) exprimieren. Links: durch Kochaufschluß gewonnene Zellextrakte vor und nach Induktion der Zellen mit IPTG. Rechts: Zellextrakt aus Aufschluß unter nativen Bedingungen von IPTG-induzierten Zellen (nähere Erläuterungen siehe Text und 2.34.2).

Anschließend wurde überprüft, wie effizient das 6xHis-HsUmp1p-Derivat an das verwendete Säulenmaterial bindet und unter welchen Bedingungen Waschung und Elution durchgeführt werden können. Das Ergebnis eines solchen Aufreinigungsverfahrens über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix-Säule ist in Abb. 32,A illustriert. Die Bedingungen wurden durch Variation der pH-Werte der verwendeten Puffer optimiert (vgl. Abschnitt 2.34.3), was zu einer effizienteren Aufreinigung und Konzentration des Proteins führte. Das Ergebnis der optimierten Aufreinigung des 6xHis-HsUmp1-Proteins in großem Maßstab, ist in Abb. 32,B veranschaulicht.



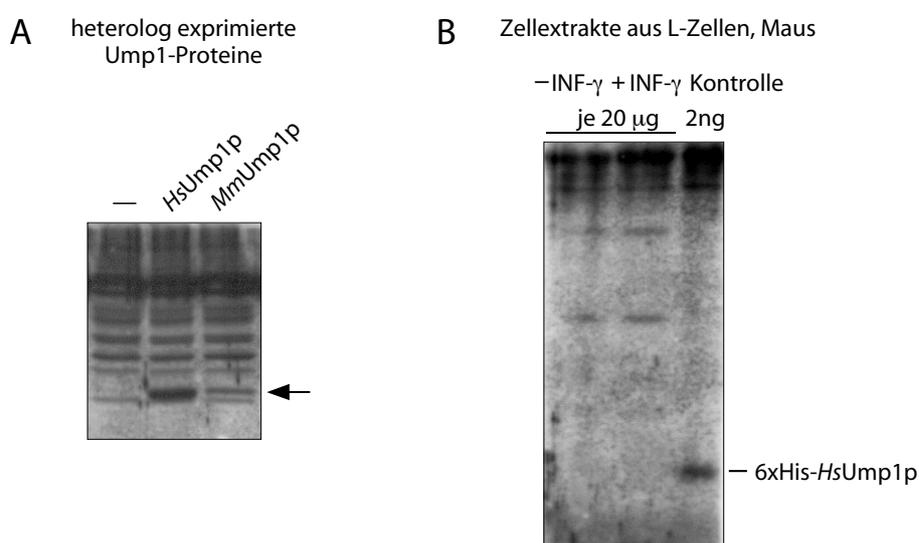
**Abb. 32: Aufreinigung des menschlichen Ump1-Proteins.** **A:** Aufreinigung des 6-fach Histidin-markierten menschlichen Ump1-Proteins (6xHis-HsUmp1p) über eine mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gefüllte Säule im Pilotmaßstab. Gezeigt ist das Ergebnis einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung von Aliquots des Zellextrakts (RE) der *E. coli*-Zellen und der verschiedenen Fraktionen des Säulendurchflusses (DF: Durchfluß des Proteins im Bindungspuffer, W1-W3: Fraktionen aus Waschschritten (pH 8,0 bzw. 6,5 bzw. 6,3) E1-E4: Elutionsfraktionen (pH4,5)). **B:** Ergebnis der optimierten Aufreinigung des 6xHis-HsUmp1-Proteins, welches für die weitere Aufreinigung in großem Maßstab benutzt wurde, analysiert wie in A, RE: Zellextrakt der *E. coli*-Zellen, E1-E3: Elutionsfraktionen, nähere Erläuterungen siehe 2.34.3. **C:** Das Material aus Eluat 2 (gezeigt in Teil B) wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und das HsUmp1-Protein aus dem Gel durch Elektroelution isoliert. Gezeigt ist dieses Eluat nach einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. (Die Prozentangaben beschreiben den Anteil der durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysierten Menge an der Gesamtmenge der Rohextrakte bzw. Eluate)

Das über die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix-Säule aufgereinigte Protein (aus Elutionsschritt 2, siehe Abb. 32, B) wurde anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Bande des 6xHis-HsUmp1-Proteins aus dem Gel ausgeschnitten. Durch Elektro-Elution erfolgte dann die

Isolierung des Proteins aus dem Gelstück. Das Eluat von 2 ml enthielt nach einer Konzentrationsbestimmung ca. 1,2 mg Protein.

Ca. 1 mg des aufgereinigten Proteins wurden schließlich für eine Immunisierung von zwei Kaninchen eingesetzt. Mit den aus dem Blut der Kaninchen gewonnenen Antiseren wurden daraufhin einige Western-Analysen durchgeführt.

Es sollte zunächst überprüft werden, ob mit den ungereinigten Antiseren eine effiziente Detektion von Ump1-Proteinen aus Mensch und Maus möglich ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen verdeutlicht Abb. 33. Sie zeigt die Western-Analysen unter Verwendung des Antiserums aus Kaninchen 1 (Mit dem Antiserum von Kaninchen 2 wurden schlechtere Ergebnisse erzielt). Es stellte sich heraus, daß bei heterologer Überexpression der Ump1-Proteine von Maus und Mensch in der Bäckerhefe (Transformanten des *ump1Δ*-Deletionstamms JD59 mit Hochkopienzahl-Plasmiden JH30 bzw. JH32, vgl. 3.5) die beiden Säugerproteine immunologisch nachgewiesen werden konnten (Abb. 33, A). Allerdings wurden dabei erhebliche unspezifische Hintergrundsignale erzeugt. Folglich konnte in einer Western-Analyse von Zellextrakten aus L-Zellen (Fibroblasten-Zelllinie) der Maus (zur Verfügung gestellt von U. Boehm) kein Ump1-Protein detektiert werden (Abb. 33, B).



**Abb. 33: Test der immunologischen Detektion der Ump1-Proteine von Maus und Mensch unter Benutzung des Antiserums aus Kaninchen nach Immunisierung mit aufgereinigtem HsUmp1.** Teil **A** zeigt die Detektion der heterolog exprimierten Ump1-Proteine aus Maus und Mensch im Zellextrakt von *S. cerevisiae* in einer Western-Blot-Analyse. Links wurde Zellextrakt aus dem mit leerem Vektor transformierten *ump1Δ*-Hefestammes JD59 aufgetragen, daneben Rohextrakte desselben Stammes, der mit für das *HsUmp1p* bzw. *MmUmp1p* codierenden Expressionsplasmiden transformiert worden war (pJH30, pJH32). Der Pfeil deutet auf durch die Ump1-Proteine erzeugten Signale. **B:** Versuch der immunologischen Detektion des *MmUmp1p*-Proteins in Zellextrakten von L-Zellen der Maus, angefertigt ohne und nach Induktion der Zellen mit  $\gamma$ -Interferon (INF $\gamma$ ). In der rechten Spur wurde aufgereinigtes sechsfach Histidin-markiertes *HsUmp1p*-Protein aufgetragen welches zur Immunisierung des Kaninchens verwendet wurde. Die Menge des analysierten Proteins ist über den Spuren angegeben

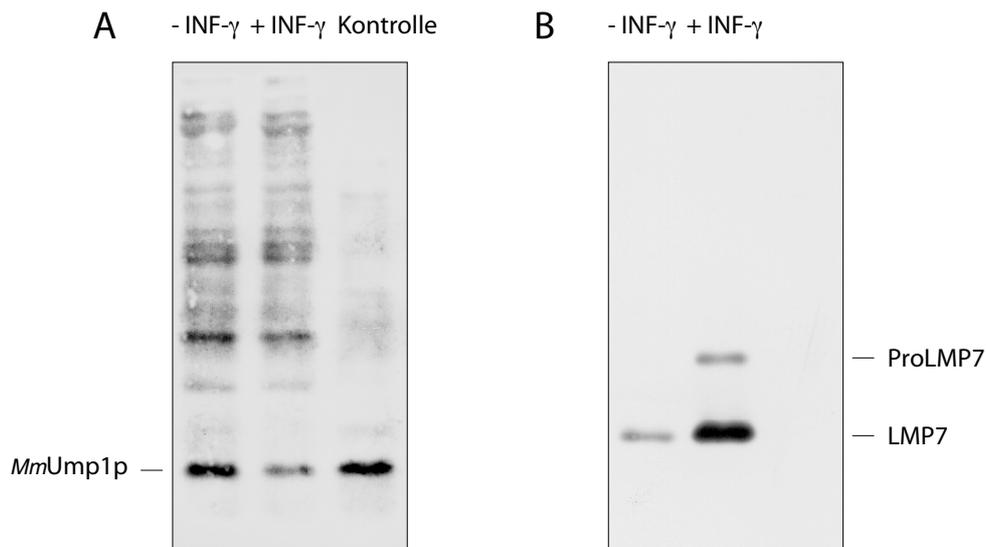
Längere Expositionen der Western-Blots brachten aufgrund des starken Hintergrundes auf der gesamten Membran keine auswertbaren Signale hervor. Jedoch erzeugte eine relativ geringe Menge aufgereinigten 6xHis-Ump1-Proteins („Kontrolle“, Abb. 33,B) ein signifikantes Signal. Daraus wurde geschlossen, daß die Menge des Ump1-Proteins in den analysierten Zellextrakten der Mauszellen weniger als 0,1 ‰ des Gesamtproteins ausmachte und damit unterhalb der spezifischen Nachweisgrenze des Antiserums lag. Aus diesem Grund erfolgte eine Affinitätsreinigung der anti-HsUmp1-Antikörper aus dem Antiserum von Kaninchen 1 (Abschnitt 2.35).

Unter Benutzung der aufgereinigten Antikörper konnten, wegen der damit verbundenen Reduktion der Kreuzreaktionen, in folgenden Western-Analysen größere Proteinmengen eingesetzt und längere Expositionen der Blots durchgeführt werden. Dies führte schließlich zu einer spezifischen Detektion des Ump1-Proteins in Zellextrakten aus Mauszellen (siehe unten).

### **3.11.3 Änderung der intrazellulären Konzentration des Ump1-Proteins in Mauszellen nach einer Stimulierung durch INF- $\gamma$**

In Abschnitt 3.11.1 wurde gezeigt, daß die Transkriptmenge der *UMP1*-Gene in Säugern nach einer Induktion mit INF- $\gamma$  ca. zweifach ansteigt. Unter Benutzung der affinitätsgereinigten Anti-Ump1-Antikörper sollte nun untersucht werden, ob auch die Konzentration des Ump1-Proteins in Säugerzellen durch INF- $\gamma$ -Stimulierung erhöht wird.

Die folgende Abbildung 34 zeigt die immunologische Detektion des Ump1-Proteins in Zellextrakten aus L-Zellen der Maus. Dabei wurden jeweils 150  $\mu$ g Gesamtprotein aus Zellextrakten von Zellen analysiert, die ohne Zugabe von INF- $\gamma$  kultiviert wurden, bzw. die für 48 h mit 1000 U/ml INF- $\gamma$  induziert worden waren. Als Nachweis für eine effiziente Stimulierung der Zellen erfolgte eine Detektion der INF- $\gamma$ -induzierbaren proteasomalen Untereinheit LMP7 in denselben Zellextrakten (Abb. 34,B).



**Abb. 34: Immunologische Detektion des *MmUmp1*-Proteins sowie der INF- $\gamma$ -induzierbaren proteasomalen Untereinheit LMP7 in Zellextrakten aus L-Zellen der Maus. A** zeigt die immunologische Detektion des Ump1-Proteins aus Maus (*MmUmp1*) in Zellextrakten, mit und ohne Stimulierung der Zellen mit 1000 U/ml  $\gamma$ -Interferon (INF- $\gamma$ ). Die Detektion erfolgte unter Benutzung des aus dem Kaninchenantiserum affinitätsgereinigten Anti-HsUmp1-Antikörpers. In der rechten Spur (Kontrolle) wurde Zellextrakt des *ump1 $\Delta$* -Hefestammes aufgetragen, welcher plasmidcodiertes *MmUmp1*-Protein exprimiert. **B:** Immunologische Detektion der INF- $\gamma$ -induzierbaren proteasomalen Untereinheit LMP7 unter Benutzung der Membran des Immunoblots aus A nach Entfernung der zuvor gebundenen Antikörper. Detektiert wurden LMP7-Vorläuferprotein (ProLMP7) sowie reifes, prozessiertes Protein (LMP7).

Das Ergebnis der Western-Analyse zeigt, daß in dem Zellextrakt aus den INF- $\gamma$ -induzierten Zellen deutlich weniger Ump1-Protein nachgewiesen wurde als im Extrakt aus nicht induzierten Zellen. Dies bedeutet, daß die intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration des Ump1-Proteins infolge der Stimulierung mit INF- $\gamma$  trotz erhöhter Transkriptmenge (vgl. Abschnitt 3.11.1) vermindert ist. Die Interpretation dieser Befunde, besonders im Hinblick auf eine Funktion des detektierten Ump1-Proteins bei der Reifung beider Proteasomentypen wird in Abschnitt 4 diskutiert.

## 4 DISKUSSION

In eukaryotischen Zellen wird der Großteil der Proteine des Zytosols und des Zellkerns durch das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut. Die zentrale Protease ist dabei ein hochmolekularer, selbstkompartimentierender Proteinkomplex, das 26S-Proteasom. Dieses baut Substratproteine, die zuvor durch das selektive Anhängen von Ubiquitinketten modifiziert wurden, zu kurzen Peptidketten ab. Die dafür verantwortliche proteolytische Aktivität ist im Innern des Kernkomplexes des 26S-Proteasoms lokalisiert, den man als 20S-Proteasom bezeichnet. Das Interesse an dieser multikatalytischen Protease ist aufgrund der Entdeckung seiner vielseitigen Beteiligung an wesentlichen regulatorischen Mechanismen der Zelle stetig gestiegen. Dies hatte zur Folge, daß man erhebliche Fortschritte in der Aufklärung der strukturellen Prinzipien und enzymatischen Mechanismen des 20S-Proteasoms machte. Die Ergebnisse dieser Studien charakterisierten das Proteasom als einen Prototyp einer neuen Familie von Proteasen, den N-terminalen Hydrolasen, und machten es zum Paradigma für makromolekulare selbstkompartimentierende Proteasen. Über die Mechanismen der Assemblierung und Reifung des komplex zusammengesetzten eukaryotischen 20S-Proteasoms ist hingegen wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Erkenntnisse über die Bedeutung und Funktion des von R. J. Dohmen in der Bäckerhefe identifizierten Gens *UMP1* (ubiquitin mediated proteolysis) zu sammeln. Es wurde vermutet, daß das *UMP1*-Gen von *S. cerevisiae* für ein Protein codiert, welches eine wichtige Rolle in der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse spielt. Im Verlauf dieser Arbeit führten in der Arbeitsgruppe Dohmen durchgeführte Studien zur Aufklärung der generellen Funktion des Ump1-Proteins (Ramos *et al.*, 1998). Das 148 Aminosäuren lange Protein ist an der Assemblierung und Reifung des 20S-Proteasoms der Bäckerhefe beteiligt und wurde daher auch als Proteasomenreifungsfaktor bezeichnet (Einleitung, Abb. 4). Weitere in dieser Arbeit beschriebene Untersuchungen sollten seine Funktionsweise näher analysieren und klären, ob die Bedeutung dieses Proteins über seine Existenz im eukaryotischen Modellorganismus *S. cerevisiae* hinausreicht.

### 4.1 Die *ump1* $\Delta$ -Deletionsmutante

Die ursprünglich isolierte *ump1-1*-Mutante der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurde aufgrund ihres Defekts in der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse bestimmter artifizierlicher Substrate identifiziert. Durch Komplementation dieses Phänotyps wurde das *UMP1*-Gen mit einem ORF von 447 bp isoliert (Ramos *et al.*, 1998). Der erste Teil dieser Arbeit befaßte sich mit der Charakterisierung einer Mutante, die für dieses Gen deletiert ist.

Es konnte gezeigt werden, daß in der *ump1* $\Delta$ -Mutante verschiedene Testsubstrate der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse aufgrund einer drastischen Stabilisierung

angereichert werden (Abb. 6 u. Abb. 7). Diese Substrate werden unter Beteiligung verschiedener Enzyme des Ubiquitin-Systems ubiquitiniert und infolgedessen durch das Proteasom abgebaut. Es lag daher die Vermutung nahe, daß die *ump1Δ*-Mutante einen generellen Defekt in der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse aufweist und nicht in einem bestimmten Abbauweg blockiert ist. Weitere Untersuchungen zur Anreicherung anderer Substrate der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse (Gcn4p, Cup9p) in *ump1Δ*-Zellen bestärkten diese Vermutung (Abb. 8). Darüber hinaus zeigte die *ump1Δ*-Mutante eine Hypersensitivität gegenüber verschiedenen Streßbedingungen, wie Wachstum bei erhöhter Temperatur (37°C) und auf Medien mit dem Aminosäure-Analogon Canavanin oder Schwermetall-Ionen (Cadmium, Abb. 9). Es ist bekannt, daß viele falsch gefaltete oder andersartig geschädigte Proteine vom Ubiquitin-System der Zelle erkannt und infolge von Ubiquitinierung durch das Proteasom abgebaut werden. So konnte für eine Reihe verschiedener Hefe-Mutanten mit Defekten in der Proteasom-abhängigen Proteolyse eine Hypersensitivität gegenüber den genannten Streßbedingungen nachgewiesen werden (Seufert *et al.*, 1990; Hilt *et al.*, 1993; Jungmann *et al.*, 1993). Während Hitzestreß und der Einbau des Arginin-Analogons Canavanin in Proteine zur verstärkten Entstehung falsch gefalteter Proteine in der Zelle führt, ist die proteinschädigende Wirkung des Schwermetalls Cadmium noch unklar. Es wird angenommen, daß dieses oxidative Schädigungen bei Proteinen hervorruft (Arendt und Hochstrasser, 1997).

Die pleiotropen Defekte der *ump1Δ*-Mutante wiesen auf eine Funktion des Ump1-Proteins in einem späten Schritt der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse hin. Ein weiteres Argument für diese Vermutung war, daß die aus dem *UMP1*-Gen abgeleitete Aminosäuresequenz keinerlei Sequenzähnlichkeiten mit bis dato identifizierten Enzymen des Ubiquitin-konjugierenden Systems aufwies. Darüber hinaus waren auch keine Ähnlichkeiten zu den Untereinheiten des 26S-Proteasoms erkennbar. Allerdings war davon auszugehen, daß es möglicherweise noch unbekannte zelluläre Faktoren gibt, die durch Interaktion mit Komponenten des Proteasoms, eventuell auch in einer regulatorischen Weise, an der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse beteiligt sind. Letztlich erwies sich die Hypothese, daß das Ump1-Protein in einem späten Schritt, nämlich dem Proteinabbau durch das Proteasom involviert ist, als richtig.

#### **4.2 Die Homologen des Ump1-Proteins aus verschiedenen Spezies**

Zu Beginn der Arbeit gab es keine Hinweise auf die Existenz von zum *UMP1*-Gen homologen Genen in anderen Organismen. Die Analyse von Genom- bzw. Proteom-Datenbanken durch computergestützte Sequenzvergleiche, sowohl mit der Nukleotidsequenz des *UMP1*-Gens, als auch mit der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz blieb anfangs ohne Erfolg. Es drängte sich daher die Frage auf, ob überhaupt zum *UMP1*-Gen homologe Gene in anderen Spezies existieren. Deshalb wurde

der Versuch unternommen, zunächst ein vermeindliches *UMP1*-Homolog aus anderen Hefespezies zu identifizieren, um später mit den zusätzlich gewonnenen Sequenzinformationen in den Datenbanken weitere Homologe, möglicherweise auch aus höheren Eukaryoten, zu identifizieren.

Unter Benutzung der codierenden DNA des *UMP1*-Gens aus *S. cerevisiae* als Sonde konnten durch Hybridisierung mit genomischer DNA der Hefe *Kluyveromyces lactis* ein *UMP1*-Gen („*KIUMP1*“) dieser Hefe identifiziert und schließlich isoliert werden. Die aus dem *KIUMP1*-ORF abgeleitete Aminosäuresequenz wies mit der des Ump1p aus *S. cerevisiae* zu 61% identische Aminosäurereste auf (Abb.12). Mit Hilfe der beiden *UMP1*-Sequenzen konnte daraufhin in den Datenbanken eine kurze Nukleotidsequenz von 195 bp Länge identifiziert werden, die als „partielle codierende Sequenz einer unbekanntes mRNA“ aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* deklariert war. Das 5'-Ende des darin enthaltenen ORFs zeigte, übersetzt in Aminosäuresequenz, in einem Sequenzvergleich mit den beiden Ump1-Proteinen an 25 von 57 Positionen identische Aminosäurereste mit einem der beiden Ump1p-Sequenzen. Mit Hilfe dieser Sequenz konnte eine den gesamten ORF (387 bp) beinhaltende cDNA aus *S. pombe* kloniert werden. Diese codiert für ein Protein, welches über seine gesamte Länge auffällige Sequenzähnlichkeit mit den Ump1-Proteinen aus *S. cerevisiae* und *K. lactis* aufweist (Abb. 12).

Mit Hilfe der aus den Hefen isolierten *UMP1*-Sequenzen wurden daraufhin regelmäßig die Datenbanken nach vermeindlichen Homologen aus höheren Eukaryoten durchsucht. Aufgrund der permanenten Erweiterung der Datenbanken, konnten im Laufe der Zeit die codierenden Sequenzen der *UMP1*-Gene aus den drei Säugern Maus, Ratte und Mensch, dem Zebrafisch (*Danio rerio*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), sowie aus den Pflanzen Schwarzfichte (*Picea mariana*) und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) identifiziert werden. Neben der interessanten Erkenntnis, daß die Existenz eines *UMP1*-Gens offenbar kein Charakteristikum niederer Eukaryoten darstellt, wurden die Informationen aus diesen Daten als Basis für weitere Untersuchungen zur Funktion des Proteasomenreifungsfaktors Ump1p genutzt.

Ein computergestützter Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller zur Verfügung stehender *UMP1*-Sequenzen (Abb. 13) verdeutlichte, daß das Ump1-Protein von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist. So sind 24% der Aminosäurereste des Ump1-Proteins der Bäckerhefe mit denen des Ump1-Proteins aus dem am höchsten entwickelten Eukaryoten Mensch identisch. Auffallend war, daß kaum Bereiche mit unmittelbaren Folgen von konservierten Aminosäureresten existieren. Einzige Ausnahme ist eine Folge von vier stark konservierten Aminosäureresten (im Ump1p aus *S. cerevisiae* Positionen 51-54) aus Histidin, Prolin, Leucin und Glutaminsäure (HPL), welche aber keine Ähnlichkeit mit bekannten Sequenzmotiven besitzt. Die Bedeutung einiger der relativ gleichmäßig über das Ump1p verteilten, stark konservierten Aminosäurereste wurde im Rahmen dieser Arbeit durch gezielte Mutagenese untersucht (siehe unten bzw. Abschnitt 3.6). Des weiteren

wurden die codierenden DNAs der *UMP1*-Gene aus den Säugern Mensch und Maus mittels PCR aus cDNA-Banken dieser Spezies amplifiziert, kloniert und für weitere Untersuchungen benutzt. Das konservierte HPLE-Motiv sowie zwei andere stark konservierte Stellen (ME, Positionen 86-87 sowie DIL, Positionen 108-110) dienten als Fusionsstellen bei der Herstellung verschiedener chimärer Ump1p-Varianten (siehe unten).

### 4.3 Sind Ump1-Proteine verschiedener Spezies funktionell konserviert?

Die codierenden Sequenzen der *UMP1*-Gene aus den Hefen *K. lactis* und *S. pombe* sowie aus den Säugern Maus und Mensch wurden kloniert und in der *ump1Δ*-Mutante exprimiert. Die auf Aufhebung des Wachstumsdefekts der Mutante beruhende Komplementationsstudie ergab, daß nur das Ump1-Protein aus der Hefe *K. lactis* das Ump1-Protein von *S. cerevisiae* funktionell ersetzen kann (Abb. 16). Aufgrund des hohen Grades an Übereinstimmungen der Primärstrukturen dieser beiden Proteine und des hohen Verwandtschaftsgrades dieser beiden Spezies (Wolfe und Shields, 1997) war dies wenig überraschend. Neben den Säuger-Proteinen besitzt auch das Ump1-Protein aus *S. pombe* offenbar nicht die strukturellen Eigenschaften, um in der Bäckerhefe eine effiziente Proteasomenreifung zu vermitteln. Das Ump1-Protein aus *S. cerevisiae* weist nur jeweils zu 24% identische Aminosäurereste mit den Ump1-Proteinen aus den Säugern Maus und Mensch auf. Ein paarweise durchgeführter Sequenzvergleich der Ump1-Proteine aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* ergab auch für diese beiden Hefe-Spezies einen erstaunlich niedrigen Wert von nur 28%. Angesichts dieser niedrigen Sequenzähnlichkeit war es nicht verwunderlich, daß keine funktionelle Austauschbarkeit festzustellen war. Unter der Annahme, daß die gefundenen Ump1-Homologen der anderen Spezies ebenfalls Proteasomenreifungsfaktoren sind, mag ihre niedrige Sequenzähnlichkeit angesichts der starken Konservierung der 3D-Struktur und Primärsequenz der Proteasomen-Untereinheiten (Coux *et al.*, 1994) zunächst überraschen. Diese *a priori* verblüffende Beobachtung kann jedoch mit Hilfe der „Propeptid-Hypothese“ plausibel erklärt werden (siehe unten).

Um zu testen, ob sich bestimmte Teile des Ump1-Proteins von *S. cerevisiae* funktionell durch die entsprechenden Teile der homologen Proteine anderer Spezies ersetzen lassen, wurden chimäre Ump1-Proteine in der *ump1Δ*-Mutante exprimiert. Diese bestanden aus dem N-terminalen Drittel des Ump1-Proteins aus Maus und den C-terminalen zwei Dritteln des Ump1p aus *S. cerevisiae* (*Mm/ScUmp1p-I*) oder umgekehrt (*Sc/MmUmp1p*). Auch diese Chimären konnten das Ump1p der Bäckerhefe nicht funktionell ersetzen (Abb. 16). Allerdings resultierte aus der Überexpression der erstgenannten Chimäre (*Mm/ScUmp1p-I*) eine Wachstumsinhibierung der *ump1Δ*-Mutante. Zwei weitere *Mm/ScUmp1p*-Chimäre (-II und -III) mit größeren N-terminalen Anteilen aus dem *MmUmp1p*-Protein zeigten diesen toxischen Effekt hingegen nicht (Abb. 17). Diese Beobachtung wurde auf der Basis der im folgenden beschriebenen Modellvorstellung interpretiert.

Aus den ersten biochemischen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Dohmen wurde ein Modell zur Funktion des Ump1-Proteins bei der Reifung des 20S-Proteasoms abgeleitet, wonach das Ump1-Protein vermutlich über Interaktion mit den Vorläuferformen der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten an die Proteasom-Vorläuferkomplexe (Halbproteasomen) bindet (siehe Einleitung, Abb. 4). Infolge der Zusammensetzung zweier Halbproteasomen kommt es zu Veränderungen in der Anordnung von Ump1p und den Propeptiden der  $\beta$ -Untereinheiten, was zu einer autokatalytischen Prozessierung der Propeptide führt.

Die toxische Wirkung des chimären *Mm/ScUmp1p-I* kann im Einklang mit der Modellvorstellung dadurch erklärt werden, daß das chimäre Protein an die Halbproteasomen bindet, aber die nachfolgenden Prozessierungsschritte inhibiert und somit die Reifung von aktiven Proteasomen blockiert. Aus der Zusammensetzung der getesteten chimären Ump1p-Versionen kann demnach geschlossen werden, daß die C-terminalen zwei Drittel des *ScUmp1*-Proteins für eine effiziente Bindung an die Halbproteasomen ausreichend sind, das N-terminale Drittel des *MmUmp1p* aber nicht die strukturellen Eigenschaften für die nachfolgenden Reifungsschritte erfüllt. Die chimären Ump1p-Versionen, welche hingegen nur die C-terminale Hälfte oder das C-terminale Drittel des *ScUmp1p* besitzen (*Mm/ScUmp1-I* bzw. *Mm/ScUmp1-II*), können diese Bindung nicht mehr ausführen. Daraus kann geschlossen werden, daß der Bereich des Ump1-Proteins aus Hefe, der diesen Chimären fehlt, für die Wechselwirkung mit den proteasomalen Untereinheiten erforderlich ist. Eine alternative Erklärung wäre, daß die Erhöhung des „Maus-Anteils“ in der Chimäre den C-terminalen „Hefe-Anteil“ in eine für seine Bindung inkompatible Struktur bringt. Die zuerst erläuterte Interpretation konnte durch folgenden Befund untermauert werden. Das chimäre *Mm/ScUmp1p-I*, das auch zur Inhibition des Wachstums führte, konnte mit proteasomalen Komplexen koimmunpräzipitiert werden. Mit den anderen genannten chimären Varianten war dies hingegen nicht möglich (Abb. 18). Insgesamt lassen diese Befunde den Schluß zu, daß die C-terminalen 2/3 des *ScUmp1p* (Positionen 51-148), beginnend mit dem HPLE-Motiv, für den Einbau in proteasomale Komplexe ausreichend sind. Der Verlust dieser Eigenschaft durch weitere Verkürzung des *ScUmp1p*-Anteils (*Mm/ScUmp1-II* u. -III) deutet an, daß der Bereich von Positionen 55 bis 85 für den Einbau notwendig ist. Die N-terminale Domäne (Positionen 1-50) ist offenbar für einen korrekten Verlauf weiterer Schritte der Proteasomenreifung verantwortlich.

Ähnliche Befunde wurden im Rahmen einer Zusammenarbeit mit L. Burri und F. Lévy (Ludwig Institute for Cancer Research, Epalinges, Schweiz) für das humane Ump1p erhalten. Auch hier reichten die C-terminalen 2/3 für die Assoziation des *HsUmp1p* mit proteasomalen Komplexen in Retikulozytenextrakten aus. Die Deletion von wenigen Aminosäureresten zwischen den Positionen 55 bis 85 bewirkte eine Aufhebung dieser Assoziation. Diese Arbeiten belegten zudem, daß die Säuger-Homologen des Ump1p tatsächlich auch Proteasomenreifungsfaktoren sind, die in Vorläuferkomplexen detektiert werden, hingegen in den reifen Proteasomen nicht vorkommen (Burri, Höckendorff, Boehm,

Klamp, Dohmen und Lévy, zur Veröffentlichung eingereicht). Daraus konnte geschlossen werden, daß das in der Bäckerhefe identifizierte Ump1p den Prototyp eines eukaryotischen Proteasomenreifungsfaktors darstellt, der von der Hefe bis zum Menschen in seiner Funktion konserviert ist.

#### **4.4 Weitere Ansätze zur Analyse der Struktur-Funktionsbeziehung des Ump1-Proteins aus *S. cerevisiae***

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalyse sollten Erkenntnisse über die detaillierte Funktion des Ump1-Proteins gewonnen werden. Von Interesse war die Generierung von *UMP1*-Allelen, die einen partiellen funktionellen Defekt dieses Proteins bei seiner Vermittlung der Proteasomenreifung verursachen. Die Charakterisierung solcher Mutanten, bei denen der Proteasomenreifungsprozeß an einem bestimmten Punkt inhibiert ist, könnte zur Klärung des Mechanismus und der Abfolge der einzelnen Reifungsschritte beitragen. Durch Analyse der in den Mutanten angehäuften Zwischenstufen könnte die Zusammensetzung der Reifungszwischenstadien und der Zustand ihrer Komponenten untersucht werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus einer späteren Röntgenkristallstruktur-Aufklärung des Ump1p gäben die entsprechenden Mutationen Hinweise auf die Regionen im Ump1-Protein, die an den für bestimmte Schritte des Reifungsprozesses erforderlichen Interaktionen beteiligt sind.

Sind die in der Mutagenese erzeugten *UMP1*-Allele durch eine einzige „Missense“-Mutation gekennzeichnet, ist damit direkt der für den Phänotyp verantwortliche Aminosäurerest identifiziert. Es wurde daher ein zielgerichtetes Mutageneseverfahren nach dem Prinzip des „Charge to Alanine Scanning“ durchgeführt (Wertman *et al.*, 1992; McDonough *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1997; Hemmerich *et al.*, 1999). Durch zielgerichtete Mutagenese werden dabei saure oder basische Aminosäurereste des Proteins gegen den aliphatischen Alaninrest ausgetauscht. Bei dieser Strategie werden geladene Aminosäurereste deshalb ausgewählt, weil sie meist an der Proteinoberfläche lokalisiert und häufig an Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt sind. Die Eliminierung der Ladung führt daher oft zu einer Verminderung oder Aufhebung der Interaktion des Proteins mit seinem Bindungspartner.

Bei der Auswahl der Aminosäurepositionen, die durch die zielgerichtete Mutagenese ausgetauscht werden sollten, wurde auf die Ergebnisse der Sequenzvergleiche (Abb. 13) zurückgegriffen. Aminosäurereste, welche für die Struktur oder Funktion eines Proteins wichtig sind, weisen häufig eine starke Konservierung auf. Deshalb wurden insgesamt zwölf geladene Aminosäurereste ausgesucht, die von der Hefe bis zu den Säugern konserviert sind, und gegen Alanin ausgetauscht (Abb.19).

Elf dieser gezielt erzeugten *ump1*-Allele, sowie ein durch fehlerhafte Synthese im Mutageneseverfahren zufällig generiertes Allel (*ump1*-H139R) codierten überraschender-

weise für offenbar vollkommen intakte Ump1-Proteine. Sie komplementierten den Wachstumsdefekt der *ump1* $\Delta$ -Mutante bei 37° C. Darüber hinaus zeigte eine zur Detektion von schwächeren Phänotypen durchgeführte Western-Analyse, daß in den entsprechenden Mutanten eine vom Wildtyp nicht unterscheidbare Prozessierung der proteasomalen  $\beta$ -Untereinheit Pre2p gewährleistet war. Diese kann als Maß für die Effizienz der Proteasomenreifung betrachtet werden (Ramos et al., 1998).

Eines der generierten *ump1*-Allele (*ump1*-R73A) sowie ein zweites, ebenfalls durch fehlerhafte Synthese im Mutageneseverfahren erhaltenes Allel verursachten hingegen vom Wildtyp unterscheidbare Phänotypen. Letztgenanntes Allel enthielt neben der erwünschten Mutation noch zwei weitere Punktmutationen, die zu weiteren Aminosäureaustauschen führen. Die Mutante *ump1*-R73A zeigte zwar im Gegensatz zu der Dreifach-Mutante ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstum (Abb. 20), jedoch wurde durch die zuvor beschriebene Western-Analyse folgendes detektiert (Abb.21). Die *ump1*-R73A Mutante wies eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Menge an reifem Pre2-Protein bei gleichzeitig erhöhten Mengen der Pre2-Vorläuferform sowie des mutierten Ump1-Proteins auf. Bei der zufällig erhaltenen Dreifachmutante, die auch einen Wachstumsdefekt zeigte, war dieser Effekt um ein Vielfaches drastischer. Das Auftreten erhöhter Mengen an Ump1-Protein in diesen Mutanten kann auf zweierlei Art interpretiert werden. Entweder führt die verminderte Anlagerung der mutierten Ump1-Proteine an die Proteasom-Vorläuferkomplexe zu einer erhöhten Menge an intrazellulärem, ungebundenem Reifungsfaktor Ump1p, oder der an die Aktivierung der proteolytischen Untereinheiten anschließende Abbau der Ump1-Proteine ist vermindert.

Weitere biochemische Untersuchungen dieser Mutanten müssen klären, worauf diese Phänotypen zurückzuführen sind. Dabei könnte mit Hilfe von Zellfraktionierungen das Auftreten und die Verteilung der in den Mutanten entstehenden Proteasomen-Reifungsstadien analysiert werden. Des weiteren muß ermittelt werden, welche der beiden zusätzlichen Mutationen in der Dreifach-Mutante für den Phänotyp verantwortlich ist, oder ob nur eine Kombination der Mutationen diesen Effekt bewirkt. Das Allel *ump1*-R73A bewirkt interessanterweise einen Aminosäureaustausch in einem Bereich (Positionen 55-85, für den gezeigt wurde, daß er für die Assemblierung des Ump1-Proteins in Proteasom-Vorläuferkomplexe notwendig ist (siehe oben).

Zusammenfassend kann gefolgert werden, daß die einzelne Eliminierung der Ladung von elf untersuchten konservierten Aminosäureresten die Funktion des Ump1-Proteins nicht merklich beeinflusst. Dies bedeutet, daß diese Reste offensichtlich einzeln betrachtet keine essentielle Rolle bei der Ausbildung der Struktur des Ump1-Proteins spielen. Was die Funktion dieser elf Aminosäurereste bezüglich der Interaktion mit anderen Proteinen angeht, bleibt offen. Entweder sind die ausgetauschten Aminosäurereste an der Interaktion mit Bindungspartnern des Ump1-Protein nicht beteiligt, oder es sind generell kooperative Wechselwirkungen mehrerer geladener Aminosäurereste in solche Bindungen

involviert, so daß die Wegnahme von nur einer Ladung keine drastische Konsequenz für die Funktion des Proteins hat.

Des weiteren besteht die Möglichkeit, daß solche Interaktionen auch auf den Wechselwirkungen hydrophober Aminosäureseitenketten beruhen. Obwohl bei löslichen Proteinen hydrophobe Aminosäurereste meist im Innern des nativen Proteins lokalisiert sind, ist in Anbetracht der Ergebnisse für eine zukünftige Ausweitung dieser Studien in Erwägung zu ziehen, die Mutation von konservierten hydrophoben Resten zu untersuchen.

Zukünftige Mutationsanalysen, bei denen entweder mehrere geladene Reste gleichzeitig ausgetauscht werden, Austausch mit Ladungsumkehr vorgenommen werden oder bei denen konservierte hydrophobe Reste ausgetauscht werden, könnten möglicherweise mit höherer Ausbeute zur Isolierung interessanter Mutanten führen.

Darüberhinaus rücken nach den Erkenntnissen aus dieser Arbeit auch die weniger stark konservierten Aminosäurereste ins Blickfeld. Der Grund dafür ist, daß die Sequenzen der Propeptide, z. B. von Pre2p ( $\beta 5$ ), und Ump1p jeweils nur vergleichsweise geringe Konservierung aufweisen (siehe unten). Wegen der wesentlichen Bedeutung der Interaktion von Ump1p mit diesem Propeptid, deutet dies darauf hin, daß sich beide Sequenzen konvergent, scheinbar unabhängig von den reifen Anteilen dieser Untereinheiten und drastischer als diese in der Evolution verändert haben. Nach dieser „Propeptid-Hypothese“ ist daher durchaus wahrscheinlich, daß spezifisch für eine gegebene Spezies weniger stark konservierte Aminosäurereste im Ump1-Protein entscheidend für seine Interaktion mit den dort vorliegenden Propeptiden sind.

Im Rahmen einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Diplomarbeit wurden durch zufällige Mutagenese des *UMP1*-Gens verschiedene *ump1*-Mutanten erhalten. Unter den Mutanten mit starken Phänotypveränderungen wurden tatsächlich überwiegend solche gefunden, die nur zwischen den Hefespezies konservierte Reste betrafen (z. B. W60R, W119R). Lediglich die Mutation G147D betraf einen über alle Spezies konservierten Rest (O. Feyen, R. J. Dohmen, persönliche Mitteilung). Welche Schritte der Proteasomenreifung in diesen Mutanten betroffen sind, wurde noch nicht untersucht.

Die Ausweitung beider Strategien in zukünftigen Studien sollte Hinweise auf die Bedeutung weiterer Aminosäurereste oder Domänen des Ump1p geben, die entweder speziesübergreifend oder speziespezifisch für die Interaktion mit bestimmten Domänen der  $\beta$ -Untereinheiten verantwortlich sind. Umgekehrt könnte eine zusätzliche Strategie darin bestehen, Mutationen in die Propeptidsequenzen der  $\beta$ -Untereinheiten einzuführen und nach solchen zu suchen, die zu Defekten in der Ump1p-vermittelten Proteasomenreifung führen.

#### 4.5 Vermittelt das Ump1-Protein die Reifung eukaryotischer 20S-Proteasomen über Interaktionen mit den Propeptiden der proteolytischen Untereinheiten?

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten untersuchen, ob die Funktion des Proteasomenreifungsfaktors Ump1p auf Interaktionen des Proteins mit den Propeptiden der Vorläuferproteine der aktiven Untereinheiten des 20S-Proteasoms beruht. Einen bedeutenden Hinweis auf eine solche Eigenschaft des Ump1-Proteins lieferte die in Abb. 25 verdeutlichte Beobachtung. Hefezellen, denen das Propeptid von Pre2p fehlt, sind nicht lebensfähig. Diese Letalität wird jedoch aufgehoben, wenn die Zellen gleichzeitig kein Ump1-Protein exprimieren.

Es wurde daher mit Hilfe von Plasmid-Austausch-Experimenten gezeigt, daß die für die Lebensfähigkeit der Zellen erforderliche Proteasomenassemblierung und -reifung durch eine spezifische Interaktion von Ump1-Protein mit dem Propeptid der Pre2p-Untereinheit bestimmt wird (Abb. 25). Hefen, die ein Pre2-Vorläuferprotein mit dem Propeptid aus der Hefe *S.pombe* oder aus der Maus synthetisieren, zeigten in Kombination mit dem *S.cerevisiae* Wildtyp-Ump1-Protein kein Wachstum. Dies verdeutlichte zunächst, daß das Propeptid des Pre2-Proteins nicht einfach gegen das Propeptid eines homologen Proteins anderer Spezies ausgetauscht werden kann. Dies war auch nicht möglich, wenn ein entsprechendes Ump1-Protein derselben Spezies koexprimiert wurde. Die einzige nicht letale Kombination war eine Pro<sub>*S.pombe*</sub>-Pre2p-Chimäre mit einer *Sp/Sc*Ump1-Chimäre, die aus dem N-terminalen Drittel des *Sp*Ump1p und den C-terminalen zwei Dritteln des *Sc*Ump1p bestand (analog konstruiert wie die in Abschnitt 4.3 diskutierte Chimäre *Mm/Sc*Ump1-I).

Anschließende biochemische Untersuchungen zeigten, daß die Koexpression dieser Chimären mit einem effizienten Einbau der Proteine in das 20S-Proteasom einherging (Abb. 26). Dabei wurde die Pro<sub>*S.pombe*</sub>-Pre2p-Chimäre im Verlauf der Proteasomenreifung effizient prozessiert. Allerdings fand diese Prozessierung nicht an der authentischen Stelle statt, da sonst eine vollständige Abspaltung des Propeptids die proteolytische Aktivierung des Pre2-Proteins zur Folge gehabt hätte. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Pre2p-Untereinheit ergab hingegen, daß die assemblierten Proteasomen nahezu keine chymotrypsin-ähnliche Aktivität aufwiesen (Abb. 27).

Zwar ging mit der Assemblierung der untersuchten Chimären-Kombination in das 20S-Proteasom keine korrekte autokatalytische Prozessierung der Pre2-Untereinheit einher. Sie ermöglichte aber offenbar eine Verkürzung des Propeptids und damit nachfolgende Schritte der Proteasomenreifung. Die Proteolyseleistung der generierten Proteasomen erfüllte trotz fehlender chymotrypsin-ähnlicher Aktivität die zellphysiologisch relevanten Aufgaben, was sich in der Koloniebildung der entsprechenden Hefen widerspiegelte. Daß Zellen den Ausfall der chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms akzeptieren können, ist von der Analyse bestimmter Mutanten mit fehlender katalytischer Aktivität der Pre2p-Untereinheit her bekannt (Chen und Hochstrasser, 1996; Jäger *et al.*, 1999). In diesem

Zusammenhang ist die Frage interessant, wie die Zellen diesen spezifischen Peptidase-Aktivitätsverlust kompensieren könnten. Oftmals ist in solchen Mutanten die Aktivität der anderen proteolytischen Untereinheiten erhöht (Chen und Hochstrasser, 1996; Jäger *et al.*, 1999), was durch erhöhte Proteasomensynthese zu erklären ist. Betrachtet man in diesen Zusammenhang die Abb. 27, so fällt auf, daß in den späten Fraktionen (23-26) aus den die Chimären exprimierenden Zellen eine chymotrypsin-ähnliche Aktivität auftritt, welche in den Wildtypzellen in dieser Form nicht nachgewiesen wurde. Vielleicht gehört diese Aktivität zu einem vergleichsweise kleinen, induzierbaren Proteasekomplex in *S. cerevisiae*, der noch auf seine Entdeckung wartet. Analog wurde beispielsweise in Säugerzellen die Induktion einer Peptidase (TPPII) nach Inhibition der proteasomalen Aktivität beobachtet (Geier *et al.*, 1999).

Daß es sich bei der Verkürzung der Pro<sub>*S. pombe*</sub>-Pre2p-Chimäre nicht um ein Prozessierungs-Artefakt handeln muß, wird durch Ergebnisse von Analysen zur Reifung der  $\beta$ -Untereinheiten von Säugerproteasomen belegt (Schmidtke *et al.*, 1996). Die Charakterisierung von definierten Prozessierungsintermediaten bestimmter  $\beta$ -Untereinheiten führte zu einem Modell, nach dem manche Propeptide in einem Zweischritt-Mechanismus prozessiert werden. Nach dieser Vorstellung werden die Propeptide zunächst vermutlich in *trans* von einer bereits aktiven Untereinheit verkürzt und im zweiten Schritt autokatalytisch vollständig abgespalten. Möglicherweise ist dieser letzte Schritt bei der Prozessierung der Pro<sub>*S. pombe*</sub>-Pre2p-Chimäre blockiert.

Trotz der nicht authentischen Prozessierung der Pro<sub>*S. pombe*</sub>-Pre2p-Chimäre deuteten die Ergebnisse aus den zuvor beschriebenen Studien auf eine spezifische Interaktion von Ump1-Protein und ProPre2-Protein hin, für welche das Propeptid offenbar eine wichtige Rolle spielt. Die Kombination aus Pro<sub>*S. pombe*</sub>-Pre2p-Chimäre und *Sp/ScUmp1p* gewährleistet den effizienten Einbau des Pre2-Proteins in das 20S-Proteasom, aber keine authentische Prozessierung des Propeptids und somit keine Aktivierung der Pre2-Untereinheit. Aus der Komposition der beiden Chimären kann gefolgert werden, daß der *ScUmp1p*-Anteil in der *Sp/ScUmp1p*-Chimäre für die Bindung an Proteasom-Vorläuferkomplexe hinreichend ist. Dies bestätigt die mit dem *Mm/ScUmp1*-Chimären erzielten Ergebnisse. Die erfolgreiche Kombination der *Sp/Sc*-Chimären des ProPre2p und des *Ump1p* deuten nun darüber hinaus darauf hin, daß ein N-terminaler Bereich des *Ump1*-Proteins die Interaktion mit dem Propeptid des Pre2-Proteins vermittelt und damit die nachfolgenden Reifungsschritte des Proteasoms ermöglicht.

#### **4.6 Biochemischer Nachweis der Propeptid-abhängigen Interaktion von $\beta$ -Untereinheiten und Ump1p**

Mit Hilfe von biochemischen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob eine unmittelbare spezifische Interaktion von *Ump1*-Protein und proteolytisch aktiven Untereinheiten direkt

nachweisbar ist (Abschnitt 3.10). Das an Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierte Ump1-Protein aus *S. cerevisiae* wurde an eine Glutathion-Sephadex-Säulenmatrix gebunden. Mit Hilfe des immobilisierten Ump1-Proteins konnte zunächst eine spezifische Bindung der Vorläuferformen der proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten Pre2p (ProPre2p) und Pre3p (ProPre3p) aus Zellextrakten der Bäckerhefe demonstriert werden (Abb. 29, A). Eine Bindung der Vorläuferform der dritten aktiven  $\beta$ -Untereinheit Pup1p war dagegen unter denselben Versuchsbedingungen nicht nachweisbar.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden diese Tests mit Filtraten der Zellextrakte durchgeführt, die nur niedermolekulare Proteine enthielten. Auf diese Weise wurde somit verifiziert, daß die Interaktion mit ProPre2p oder ProPre3p nicht auf der Bindung von *in vivo* assemblierten Proteasom-Vorläuferkomplexen beruhte (Abb. 29, B).

Wurden allerdings nur jeweils die reifen Anteile der Pre2- bzw. Pre3-Proteine in der Hefe exprimiert, konnten diese nicht durch eine Bindung an das Ump1-Protein aus den Zellextrakten isoliert werden (Abb. 29, C). Diese Ergebnisse deuteten somit auf eine spezifische Bindung des Ump1-Proteins an die freien Vorläuferformen der proteasomalen Untereinheiten Pre2p und Pre3p hin, wobei in beiden Fällen die Anwesenheit der Propeptide für die Interaktion erforderlich ist.

Man kann diese Befunde folgendermaßen interpretieren. Möglicherweise sind die Propeptide für die Faltung der reifen Anteile der Untereinheiten erforderlich, so daß ihr Fehlen eine für die Bindung von Ump1p weniger kompatible Struktur der Proteine zur Folge hat. Eine solche *in vivo* Funktion der Propeptide, als intramolekulare Chaperone die Faltung der Vorläuferproteine eukaryotischer  $\beta$ -Untereinheiten zu vermitteln, wird auch in der Literatur diskutiert (Chen und Hochstrasser, 1996; Schmidt *et al.*, 1999). Andererseits belegten Mutationsanalysen, daß die proteolytisch aktiven proteasomalen Untereinheiten auch ohne ihr Propetid ins 20S-Proteasom eingebaut werden, was darauf schließen läßt, daß dabei native und unter bestimmten genetischen Voraussetzungen auch enzymatisch aktive Proteine generiert werden (Arendt und Hochstrasser, 1999). Eine weitere Möglichkeit, die Befunde aus der biochemischen Interaktionsanalyse zu erklären, ist eine ausschließliche Bindung der Propeptide an das Ump1-Protein. Dagegen spricht, daß eine in der Hefe exprimierte Fusion des Propeptids von Pre2p mit dem reifen Anteil der homologen  $\beta$ 5-Untereinheit des Menschen nicht über eine Bindung an das ScUmp1-Protein aufgereinigt werden konnte (Ergebnis nicht gezeigt). Die Gegenwart des Propeptids ist also wahrscheinlich nicht hinreichend, um diese Bindung an das Ump1p zu gewährleisten. Möglicherweise sind für die spezifische Interaktion von Ump1p und Vorläuferformen der  $\beta$ -Untereinheiten strukturelle Anordnungen von Propeptid und reifem Proteinanteil erforderlich. Ob diese Vorstellung auf die *In-vivo*-Funktion des Ump1-Proteins bei der Vermittlung der Assemblierung sowie Reifung des 20S-Proteasoms übertragen werden kann, müssen weitere Untersuchungen klären.

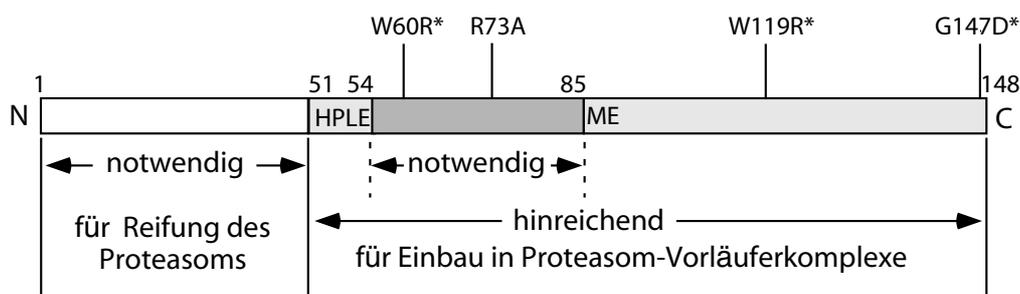
Ob das Ausbleiben der *In-vitro*-Bindung der Pup1p-Vorläuferform (der dritten aktiven  $\beta$ -Untereinheit) eine fehlende Interaktion zum Ump1-Protein *in vivo* widerspiegelt oder experimentell bedingt ist, kann nicht beantwortet werden. Beispielsweise könnte dies auf die Fusion des Ump1p mit GST und damit auf die Veränderung des N-Terminus von Ump1p zurückzuführen sein. Es ist aber vorstellbar, daß die Untereinheit Pup1p bzw. ihr Propeptid in der Ump1p-vermittelten Proteasomenreifung eine Sonderstellung einnimmt.

Die Beobachtung, daß die freien Vorläuferformen von ProPre2p und ProPre3p an Ump1p *in vitro* binden, weist auf die Möglichkeit hin, daß diesen Interaktionen bereits eine Bedeutung in frühen Stadien der Assemblierung von Vorläuferkomplexen zukommen. (Allerdings findet ein Einbau dieser Untereinheiten auch in Abwesenheit von Ump1p in der *ump1* $\Delta$ -Mutante statt.) Denkbar wäre, daß Ump1p den Einbau von  $\beta$ -Untereinheiten in die proteasomalen Vorläuferkomplexe koordiniert. Diese Überlegung ist von besonderem Interesse im Zusammenhang mit der Frage, wie der Einbau der drei IFN- $\gamma$ -induzierten Untereinheiten, anstelle der enstprechenden konstitutiv exprimierten, in das Immuno-Proteasom koordiniert wird (siehe unten).

#### 4.7 Funktionelle Bereiche des Ump1-Proteins

Die in den zurückliegenden Abschnitten diskutierten Befunde erlauben eine Unterteilung des Ump1p in funktionelle Bereiche (Abb. 35). Die mit den verschiedenen Chimären erhaltenen Resultate haben gezeigt, daß die C-terminalen zwei Drittel des Proteins (Aminosäurepositionen 51 bis 148 des *S. cerevisiae* Ump1p) den Einbau des Reifungsfaktors in Proteasom-Vorläuferkomplexe erlauben. Diese Interpretation deckt sich mit Resultaten aus einer biochemischen Charakterisierung von Proteasom-Vorläuferkomplexen (Ramos et al., 1998). In diesen Halbproteasomen waren ca. zwei Drittel des C-Terminus von Ump1p vor Proteolyse durch Trypsin geschützt. Gleichzeitig wurden sowohl die N-terminale Region des Ump1p, als auch das Propeptid der Pre2-Untereinheit durch Trypsin-Behandlung abgespalten. Letztere Beobachtung deckt sich mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, wonach dem N-terminalen Drittel des Ump1p (Aminosäurepositionen 1-50) für die Reifung der  $\beta$ -Untereinheiten eine wichtige Rolle zukommt. Diese resultiert vermutlich aus direkter sequenzspezifischer Interaktion mit den Propeptiden.

Für die C-terminale Domäne konnte gezeigt werden, daß der Bereich von Position 55 bis 85 für die Assemblierung des Ump1 in proteasomale Vorläuferkomplexe notwendig ist. In diesem Bereich befinden sich auch zwei der vier in dieser Arbeit und von O. Feyen isolierten Mutationen (siehe oben), die zu einem partiellen bzw. vollständigen Verlust der Ump1p-Funktion führen. Die beiden anderen Mutationen befinden sich in der weiter C-terminal liegenden Region.



**Abb. 35: Erkenntnisse über die Struktur-Funktionsbeziehung des *S. cerevisiae* Ump1p**

Grau unterlegte Bereiche sind ausreichend für den Einbau des Proteins in Vorläuferkomplexe. Der dunkelgrau unterlegte Bereich ist dafür notwendig. Konservierte Aminosäuresequenzen (HPLE und ME), die bei der Konstruktion von Chimären als Fusionsstellen dienten, sind hervorgehoben. Oben sind die Positionen verschiedener besprochener Mutationen gezeigt. Die von O. Feyen erzeugten Mutationen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

#### 4.8 Existieren in Säugern zwei Typen von Proteasomreifungsfaktoren oder vermittelt das Ump1-Protein auch die Reifung von Immuno-Proteasomen?

Die Ergebnisse der in Abb. 22 dargestellten Sequenzvergleiche der Vorläuferproteine von proteasomalen  $\beta$ 5-Untereinheiten (Homologe zum Pre2p von *S. cerevisiae*) aus verschiedenen Spezies waren Anlaß für die Aufstellung der „Propeptid-Hypothese“. Sie verdeutlichten, daß die reifen Anteile der  $\beta$ 5-Untereinheiten über alle Spezies hinweg stark konserviert sind (mit mindestens 63 % identischen Aminosäureresten), während die Propeptide entfernt verwandter Arten kaum Sequenzähnlichkeiten aufweisen, wenn man vom Bereich der Prozessierungsstelle absieht. Im Vergleich dazu ist die Primärstruktur des Ump1-Proteins nicht annähernd so konserviert, wie die der reifen  $\beta$ 5-Untereinheiten. Beispielsweise sind nur 28 % bzw. 24 % der Aminosäurereste des Ump1-Proteins aus *S. cerevisiae* mit denen des Ump1-Proteins aus *S. pombe* bzw. Mensch identisch. Die relativ schwache Konservierung des Ump1-Proteins und die kaum bestehende Sequenzähnlichkeit der  $\beta$ 5-Propeptide verschiedener Spezies, bei gleichzeitiger starker Konservierung der reifen Anteile der  $\beta$ 5-Untereinheiten, kann darauf zurückgeführt werden, daß die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten entwicklungsgeschichtlich älteren Ursprungs sind. So finden sich bereits in Archaeobakterien Proteasomenuntereinheiten mit deutlicher Sequenzähnlichkeit zu den eukaryotischen Untereinheiten (Zwickl *et al.*, 1999). Hingegen sind für einzelne Untereinheiten spezifische Propeptide sowie Proteasomreifungsfaktoren vom Typ des Ump1p offenbar Entwicklungen der Eukaryoten. Somit hatten zu der Ursprungszeit solcher Propetide und Reifungsfaktoren die reifen Anteile der Untereinheiten bereits eine entwicklungsgeschichtlich lange Optimierung durchlaufen, die nur noch geringe Veränderungen ihrer Strukturen erlaubte. Hingegen ist die stärkere Veränderung der Propeptide und Reifungsfaktoren im Verlauf der Entwicklung von niederen zu höheren

Eukaroyten, offenbar unabhängig davon erfolgt und im wesentlichen durch ihre bilaterale Interaktion bestimmt.

Erklären läßt sich mit dieser Propeptid-Hypothese auch, daß nur das Ump1-Protein aus *K. lactis* sein homologes Protein in *S. cerevisiae* funktionell ersetzen kann (Abb. 16). Die Propeptide der  $\beta$ 5-Untereinheiten dieser beiden Spezies besitzen gleichzeitig als einzige deutliche Übereinstimmungen bezüglich ihrer Aminosäuresequenzen (Abb. 22) und waren darüber hinaus sogar funktionell austauschbar (Daten nicht gezeigt).

Basierend auf dieser Hypothese führte die vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen der  $\beta$ 5-Untereinheiten aus den Säugern Maus und Mensch zu einer weiterführenden Vermutung. Säuger besitzen neben den drei proteolytisch aktiven, normalen („Housekeeping“)  $\beta$ -Untereinheiten drei weitere zu diesen homologe Untereinheiten (siehe Einleitung, Abschnitt 1.4.2). Sie werden infolge einer Stimulierung der Zellen mit dem Zytokin  $\gamma$ -Interferon (INF- $\gamma$ ) exprimiert und anstelle der drei normalen Untereinheiten in neu assemblierende 20S-Proteasomen eingebaut. Das dadurch entstehende Immuno-Proteasom zeichnet sich durch eine veränderte proteolytische Aktivität aus, die offenbar auf die Generierung von Antigen-Peptiden in der Immunantwort infizierter Zellen spezialisiert ist (siehe Einleitung). Die INF- $\gamma$ -induzierbaren  $\beta$ -Untereinheiten werden wie ihre homologen Gegenstücke als Vorläuferproteine synthetisiert und ebenfalls bei der Proteasomenreifung infolge einer Propeptidprozessierung aktiviert.

Der Sequenzvergleich der Vorläuferproteine der „Housekeeping“  $\beta$ 5-Untereinheiten (X/ $\beta$ 5) sowie der INF- $\gamma$ -induzierbaren  $\beta$ 5-Untereinheiten (LMP7/ $\beta$ 5i) aus Maus und Mensch sind in Abb. 23 dargestellt. Vergleicht man die Propeptidsequenzen der homologen Untereinheiten X aus Maus und Mensch, zeigen diese signifikante Übereinstimmungen. Gleiches gilt für die beiden Propeptide der INF- $\gamma$ -induzierbaren LMP7-Untereinheiten aus Maus und Mensch. Die Primärstrukturen der Propeptide von X- und LMP7-Untereinheiten aus einer Art zeigen hingegen erstaunlicherweise kaum Sequenzähnlichkeiten. Diese überraschende Beobachtung konnte auch bei Sequenzvergleich der anderen aktiven  $\beta$ -Untereinheiten aus Maus und Mensch gemacht werden. Für die  $\beta$ 5-Untereinheiten X und LMP7 konnte kürzlich in Mauszellen gezeigt werden, daß ein Austausch ihrer Propeptide zu einer entsprechenden Umkehr der Assemblierungseigenschaften in Bezug auf das „Housekeeping“- bzw. Immuno-Proteasom führte (Kingsbury *et al.*, 2000). Diese Resultate bestätigten die Annahme, daß die Propeptide eine wesentliche Information zur korrekten Assemblierung dieser Untereinheiten tragen. Unter Berücksichtigung der zuvor beschriebenen Hypothese und der beobachteten Interaktionen zwischen Propeptiden und Ump1 drängte sich die Vermutung auf, daß in Säugern ein zweiter, für Immuno-Proteasomen spezifischer Reifungsfaktor, existiert.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Expression der klonierten *UMP1*-Gene in Säugerzellen in Abhängigkeit von einer Stimulierung durch INF- $\gamma$  untersucht. Eine Regulation des *UMP1*-Gens durch INF- $\gamma$  könnte Hinweise darauf geben, ob dessen

Genprodukt auch in Immuno-Proteasomen zu erwarten ist. Die biochemischen Tests hatten bereits ergeben, daß es in „Housekeeping“-20S-Proteasomen nachweisbar ist (Zusammenarbeit mit L. Burri und F. Lévy, persönliche Mitteilung).

Northern-Analysen zeigten, daß in Makrophagen sowie embryonalen Fibroblasten aus Maus und in human HeLa-Zellen die Transkriptmenge der *UMP1*-Gene infolge einer Stimulierung der Zellen mit  $\text{INF-}\gamma$  um den Faktor 2 bis 2,4 erhöht ist (Abb. 30). Gleichzeitig war die Menge an C5-Transkript infolge der  $\text{INF-}\gamma$ -Stimulierung unverändert geblieben. Durch letzteren Befund konnte somit ausgeschlossen werden, daß die Zunahme der *UMP1*-Transkriptmenge auf einer dabei gleichzeitig erhöhten Induktion der Proteasomensynthese in  $\text{INF-}\gamma$ -stimulierten Zellen beruht.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die *UMP1*-Transkriptmenge in den untersuchten Säugerzellen infolge einer  $\text{INF-}\gamma$ -Induktion ansteigt, stellte sich zwangsläufig die Frage, ob dies auch einen Anstieg der intrazellulären Konzentration an Ump1-Protein zur Folge hat. Durch Western-Blot-Analysen unter Benutzung des aus Antiserum gereinigten Anti-HsUmp1-Antikörpers (Abschn. 3.11.2) wurde das Ump1-Protein in Zellextrakten aus L-Zellen der Maus detektiert. Die Ergebnisse zeigten, daß die Gleichgewichtskonzentration des Ump1-Proteins infolge der  $\text{INF-}\gamma$ -Stimulierung der Zellen nicht entsprechend der *UMP1*-Transkriptmenge ansteigt, sondern sogar deutlich reduziert ist (Abb. 34). Dieser Befund kann auf verschiedene Weisen interpretiert werden. Eine einfache Erklärung ist, daß die durch  $\text{INF-}\gamma$ -Induktion verursachte Zunahme der *UMP1*-Transkriptmenge aufgrund posttranskriptionaler Regulation nicht zu einer entsprechenden Erhöhung der Ump1-Proteinsyntheserate führt. Alternativ könnte die detektierte Zunahme der Transkriptmenge auf der  $\text{INF-}\gamma$ -Induktion eines zweiten, mit dem *UMP1* verwandten Transkripts derselben Größe beruhen, dessen Proteinprodukt hingegen von den Anti-HsUmp1-Antikörpern ineffizienter oder gar nicht nachgewiesen wird.

Eine weitere Erklärung wäre, daß die Synthese des Ump1-Proteins infolge der  $\text{INF-}\gamma$ -Induktion erhöht ist, aber eine veränderte Kinetik bezüglich des Einbaus des Ump1-Proteins in die Proteasom-Vorläuferkomplexe letztlich zu einer Reduzierung der intrazellulären Gleichgewichtskonzentration des Ump1-Proteins führt. Diese Vorstellung stünde im Einklang mit folgender Modellvorstellung. Das analysierte *UMP1*-Gen codiert für einen Proteasomenreifungsfaktor, der an der Assemblierung beider Proteasomentypen beteiligt ist. Gleichzeitig stellt die Ump1p-Synthese einen zeitlimitierenden Faktor in der Assemblierung der Immuno-Proteasomen dar. Infolge der  $\text{INF-}\gamma$ -Stimulierung wird mehr Ump1-Protein synthetisiert, um eine schnelle *De-novo*-Synthese der Immuno-Proteasomen für die Immunantwort der Zelle zu gewährleisten. Eine erhöhte Assemblierungskinetik der Proteasomen würde gleichzeitig zu einem beschleunigten Abbau des Ump1-Proteins durch die neu generierten Proteasomen und somit einer geringeren intrazellulären Gleichgewichtskonzentration des Ump1p führen. Dieses Modell könnte durch eine

Untersuchung der Ump1p-Abbauraten in INF- $\gamma$ -stimulierten und nicht stimulierten Zellen in Form einer „Pulse Chase“-Analyse überprüft werden.

Auch wenn diese Ergebnisse zunächst im Widerspruch zur aufgestellten Propeptid-Hypothese stehen mögen, die für die Existenz von zwei verschiedenen Reifungsfaktoren spricht, kann man die Hypothese durch eine weiterführende Vorstellung aufrecht halten. Möglicherweise besitzt das Ump1-Protein in den Vorläuferkomplexen der beiden verschiedenen Proteasomentypen unterschiedliche Konformationen oder unterschiedliche sterische Anordnungen zu den Propeptiden der  $\beta$ -Untereinheiten. Dabei werden die Reifungsprozesse der beiden Proteasomen durch distinkte Interaktionen der Propeptide mit verschiedenen Regionen desselben Ump1-Proteins vermittelt. Diese Interaktionen könnten so ausgeprägt sein, daß beispielsweise die Bindung der ersten  $\beta$ -Untereinheit nur die weitere Bindung von  $\beta$ -Untereinheiten des gleichen Typs („Houskeeping“ oder INF- $\gamma$ -induziert) ermöglicht. Auf diese Weise könnte der koordinierte Einbau von Untereinheiten entweder des einen oder des anderen Typs, wie er von Griffin *et al.* (1998) postuliert wird, auch mit nur einem Ump1p-Reifungsfaktor realisiert werden.

#### 4.9 Ausblick

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, daß Proteasomenreifungsfaktoren vom Typ des Ump1p von der Hefe bis zum Menschen konserviert sind, und daß offenbar ihre Interaktion mit Propeptiden der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten eine wichtige Funktion bei der Vermittlung der Reifungsprozesse der 20S-Proteasomen darstellt. Eine erste Zuordnung von funktionellen Bereichen des Ump1-Proteins wurde dabei in dieser Arbeit erzielt.

In der Zukunft bedarf es weiterer Anstrengungen, die Rolle des Ump1-Proteins bei der Reifung eukaryotischer Proteasomen im Detail aufzuklären. Die vollständige Funktions/Strukturanalyse dieses Proteins wird wahrscheinlich entscheidende Fortschritte im Verständnis der Mechanismen erbringen, die diesen komplizierten Prozeß begleiten. Man bedenke, daß die meisten bisherigen Untersuchungen zur Assemblierung und Reifung eukaryotischer 20S-Proteasomen jenseits der Kenntnis dieses für diesen Prozeß bedeutsamen Reifungsfaktors lagen. Folglich fand dieses Protein bei bisherigen Modellvorstellungen keine Berücksichtigung, so daß sich die abgeleiteten Modellvorstellungen nachträglich als fehlerhaft oder unzureichend erwiesen haben (Chen und Hochstrasser, 1996; Schmidtke *et al.*, 1996; Nandi *et al.*, 1997; Schmidt und Kloetzel, 1997; Schmidt *et al.*, 1997).

Die im Vergleich zu prokaryotischen Proteasomen komplexere Zusammensetzung der eukaryotischen 20S-Proteasomen ging wahrscheinlich mit der Entwicklung des Reifungsfaktors Ump1p und individueller Primärstrukturen der Propeptide verschiedener  $\beta$ -Untereinheiten einher. Kompliziertere biologische Mechanismen verlangen meist auch die Gegenwart von regulatorischen Faktoren. Dies erklärt, warum bislang kein Ump1p-

Homologes in Prokaryoten identifiziert werden konnte. Die Identifizierung und Aufklärung der Funktion von Ump1p-Homologen in Säugern wird sicherlich die Bedeutung dieses Proteins erhöhen, insbesondere wenn sich herausstellen sollte, daß dieses Protein auch die Reifung der Immuno-Proteasomen vermittelt. Wenn auch erste Ergebnisse, die aus den Untersuchungen dieser Arbeit gewonnen wurden, genau darauf hindeuten, steht der finale Beweis noch aus. Präparationen von frühen 20S-Immuno-Proteasomkomplexen oder von deren Vorläuferkomplexen mit anschließender spezifischer Detektion des darin enthaltenden Ump1-Proteins könnten diese Frage endgültig beantworten. Die Benutzung der in dieser Arbeit hergestellten spezifischen Antikörper gegen das Ump1-Protein des Menschen könnte das dafür erforderliche biologische Reagenz liefern.

In jüngerer Zeit haben spezifische Inhibitoren proteasomaler Aktivität ein zunehmendes Interesse gefunden, da man sich von ihnen eine therapeutische Wirkung z. B. als Zytostatika in der Krebstherapie erhofft (Lee und Goldberg, 1998). Die bislang beschriebenen Inhibitoren beruhen auf einer Blockierung der aktiven Zentren.

In Zukunft sind vielleicht auch Therapeutika denkbar, die auf der Inhibition der Ump1p-vermittelten Proteasomenreifung basieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßte sich mit der Funktion von Proteasomenreifungsfaktoren vom Typ des Ump1-Proteins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Assemblierung und Reifung der 20S-Proteasomen. Nach Befunden vorliegender Untersuchungen assembliert das Ump1-Protein in Proteasom-Vorläuferkomplexe (Halbproteasomen). Assemblieren diese zum 20S-Proteasom, kommt es vermutlich zu sich gegenseitig bedingenden strukturellen Veränderungen in der Anordnung von Ump1p und den Propeptiden der  $\beta$ -Untereinheiten, wodurch die autokatalytischen Prozessierungen der Propeptide mit anschließendem Abbau des Ump1p induziert werden.

Der erste Teil dieser Arbeit befaßte sich mit der Charakterisierung der *ump1 $\Delta$* -Mutante der Bäckerhefe. Es konnte gezeigt werden, daß diese Mutante einen Defekt in einem späten Schritt der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse aufweist. Diese Befunde bildeten die Basis für parallel in der Arbeitsgruppe durchgeführte Analysen, die zur Identifikation des Ump1-Proteins als Proteasomenreifungsfaktor führten.

Weil es zu Beginn dieser Arbeit keine Hinweise auf die Existenz von für Proteasomenreifungsfaktoren codierenden Genen in anderen Organismen gab, wurden zunächst zum *UMP1* homologe Gene aus den Hefen *Kluyveromyces lactis* und *Schizosaccharomyces pombe* kloniert. Mit Hilfe der aus diesen Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen konnten in den Datenbanken homologe *UMP1*-Gene verschiedener Eukaryoten identifiziert werden. Diese und andere Daten zeigten, daß das Ump1-Protein von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist. Komplementationsstudien ergaben aber, daß lediglich das Ump1p aus *K. lactis* sein Homologes in *S. cerevisiae* funktionell ersetzen konnte, wohingegen die Homologen aus *S. pombe*, Maus und Mensch dazu nicht in der Lage waren.

Des weiteren wurde beobachtet, daß die recht schwache Konservierung des Ump1-Proteins im Gegensatz zu der starken Konservierung der reifen aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des Proteasoms steht, jedoch mit der stark divergenten Primärstruktur ihrer Propeptide einhergeht. Nach der von solchen Befunden abgeleiteten „Propetidhypothese“ lassen sich diese Eigenschaften auf eine konvergente Evolution von Ump1 und den Propeptiden zurückführen, die auf einer speziesspezifischen funktionellen Interaktion beruht. Diese Hypothese konnte durch verschiedene Ergebnisse untermauert werden. Es wurde gezeigt, daß die gleichzeitige Expression eines chimären *Sp/ScUmp1*-Proteins (mit Teilen aus *S. pombe* und *S. cerevisiae*) mit einem chimären Vorläuferprotein des Pre2p, welches das Propeptid der entsprechenden Untereinheit aus *S. pombe* trägt, eine für die Reifung der Proteasomen akzeptable Kombination darstellt. Die Kombination eines Wildtyp-Ump1-Proteins der beiden Spezies mit der chimären Pre2p-Version brachte hingegen keine lebensfähigen Zellen hervor. Die dadurch angedeutete spezifische Interaktion von Ump1p

mit  $\beta$ -Untereinheiten konnte *in vitro* für Pre2p und Pre3p nachgewiesen werden, wobei die Propetide für diese Bindung essentiell waren.

Versuche mit verschiedenen chimären Ump1-Proteinen zeigten, daß die C-terminalen 2/3 für einen Einbau in Proteasom-Vorläuferkomplexe ausreichen, und daß dafür ein Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 55 und 85 essentiell ist. Der N-Terminus (Positionen 1-50) ist dagegen für die weiteren Schritte der Proteasomenreifung, vermutlich über die Interaktion mit den Propeptiden, erforderlich.

Im Rahmen einer Zusammenarbeit konnte gezeigt werden, daß die identifizierten Säugerhomologen des Ump1p ebenfalls Bestandteil von Proteasom-Vorläuferkomplexen sind. Die Transkriptmenge der Säuger-*UMP1*-Gene steigt um den Faktor zwei nach Stimulierung durch  $\gamma$ -Interferon, was auf eine Beteiligung dieses Reifungsfaktors auch an der Biogenese der Immuno-Proteasomen hindeutet.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1994) Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem (Tokyo)*, **115**, 257-269.
- Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Shimbara, N., Takashina, M., Kristensen, P., Hendil, K.B., Tanaka, K. and Ichihara, A. (1994) Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon-gamma for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. *FEBS Lett*, **343**, 85-88.
- Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D. and Hochstrasser, M. (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *Embo J*, **16**, 4826-4838.
- Arendt, C.S. and Hochstrasser, M. (1997) Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7156-7161.
- Arendt, C.S. and Hochstrasser, M. (1999) Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *Embo J*, **18**, 3575-3585.
- Arfin, S.M. and Bradshaw, R.A. (1988) Cotranslational processing and protein turnover in eukaryotic cells. *Biochemistry*, **27**, 7979-7984.
- Arnason, T. and Ellison, M.J. (1994) Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol*, **14**, 7876-7883.
- Baboshina, O.V. and Haas, A.L. (1996) Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem*, **271**, 2823-2831.
- Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, **234**, 179-186.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1989) A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev*, **3**, 1689-1698.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, **14**, 649-683.
- Bartel, B., Wunning, I. and Varshavsky, A. (1990) The recognition component of the N-end rule pathway. *Embo J*, **9**, 3179-3189.
- Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L. and Pfeifer, G. (1988) Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett*, **241**, 239-245.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-380.
- Beninga, J., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1998) Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem*, **273**, 18734-18742.
- Biederer, T., Volkwein, C. and Sommer, T. (1997) Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface [see comments]. *Science*, **278**, 1806-1809.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. and Huber, R. (1999) The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **28**, 295-317.
- Boehm, U., Guethlein, L., Klamp, T., Ozbek, K., Schaub, A., Futterer, A., Pfeffer, K. and Howard, J.C. (1998) Two families of GTPases dominate the complex cellular response to IFN- gamma. *J Immunol*, **161**, 6715-6723.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R. and Murzin, A.G. (1995) A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation [published erratum appears in Nature 1995 Dec 7;378(6557):644]. *Nature*, **378**, 416-419.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity [In Process Citation]. *Nat Cell Biol*, **1**, 221-226.

- Bregman, D.B., Du, L., van der Zee, S. and Warren, S.L. (1995) Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains. *J Cell Biol*, **129**, 287-298.
- Brown, J.L. and Roberts, W.K. (1976) Evidence that approximately eighty per cent of the soluble proteins from Ehrlich ascites cells are Nalpa-acetylated. *J Biol Chem*, **251**, 1009-1014.
- Byrd, C., Turner, G.C. and Varshavsky, A. (1998) The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor. *Embo J*, **17**, 269-277.
- Chen, P. and Hochstrasser, M. (1996) Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell*, **86**, 961-972.
- Chen, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S. and Hochstrasser, M. (1993) Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. *Cell*, **74**, 357-369.
- Chen, Z.J., Parent, L. and Maniatis, T. (1996) Site-specific phosphorylation of I kappa B Alpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, **84**, 853-862.
- Cheng, C.H., Geng, J.P. and Castellino, F.J. (1997) The functions of the first epidermal growth factor homology region of human protein C as revealed by a charge-to-alanine scanning mutagenesis investigation. *Biol Chem*, **378**, 1491-1500.
- Coux, O., Nothwang, H.G., Silva Pereira, I., Recillas Targa, F., Bey, F. and Scherrer, K. (1994) Phylogenic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol Gen Genet*, **245**, 769-780.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, **65**, 801-847.
- Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med*, **76**, 6-12.
- de Groot, R.J., Rumenapf, T., Kuhn, R.J., Strauss, E.G. and Strauss, J.H. (1991) Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8967-8971.
- De Mot, R., Nagy, I., Walz, J. and Baumeister, W. (1999) Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends Microbiol*, **7**, 88-92.
- DeMartino, G.N., Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., Proske, R.J., Chu-Ping, M., Afendis, S.J., Swafield, J.C. and Slaughter, C.A. (1994) PA700, an ATP-dependant actuator of the 20S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20878-20884.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickard, C. and Rechsteiner, M. (1994) A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7059-7061.
- Dick, T.P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P.M., Kuehn, L., Koszinowski, U.H., Stevanovic, S., Schild, H. and Rammensee, H.G. (1996) Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*, **86**, 253-262.
- Ditzel, L., Huber, R., Mann, K., Heinemeyer, W., Wolf, D.H. and Groll, M. (1998) Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J Mol Biol*, **279**, 1187-1191.
- Ditzel, L., Stock, D. and Lowe, J. (1997) Structural investigation of proteasome inhibition. *Biol Chem*, **378**, 239-247.
- Dohmen, R.J., Madura, K., Bartel, B. and Varshavsky, A. (1991a) The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7351-7355.
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W., Honer, C.B. and Hollenberg, C.P. (1991b) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast*, **7**, 691-692.
- Driscoll, J., Brown, M.G., Finley, D. and Monaco, J.J. (1993) MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome [see comments]. *Nature*, **365**, 262-264.
- Dubiel, W., Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1995) Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. *Mol Biol Rep*, **21**, 27-34.
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1992) Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem*, **267**, 22369-22377.

- Durcacz, B., Beach, D., Hayles, J., Nurse, P. (1985) The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: structure of the *cdc2* region. *MGG* **201**, 543-545
- Enekel, C., Lehmann, H., Kipper, J., Guckel, R., Hilt, W. and Wolf, D.H. (1994) PRE3, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked LMP2 (RING12) gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity. *FEBS Lett*, **341**, 193-196.
- Fehling, H.J., Swat, W., Laplace, C., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, U. and von Boehmer, H. (1994) MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science*, **265**, 1234-1237.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*, **137**, 266-267.
- Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B. and Deshaies, R.J. (1997) A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p [see comments]. *Cell*, **91**, 221-230.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J. and Schreiber, S.L. (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, **268**, 726-731.
- Fenton, W.A. and Horwich, A.L. (1997) GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci*, **6**, 743-760.
- Finley, D. and Chau, V. (1991) Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol*, **7**, 25-69.
- Finley, D., Ciechanover, A. and Varshavsky, A. (1984) Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*, **37**, 43-55.
- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A. and Kloetzel, P.M. (1994) 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol*, **236**, 975-981.
- Früh, K., Gossen, M., Wang, K., Bujard, H., Peterson, P.A. and Yang, Y. (1994) Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *Embo J*, **13**, 3236-3244.
- Fu, H., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D. and Vierstra, R.D. (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.
- Gaczynska, M., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1993) Role of proteasomes in antigen presentation. *Enzyme Protein*, **47**, 354-369.
- Galan, J.M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C. and Haguenaer-Tsapis, R. (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem*, **271**, 10946-10952.
- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K. and Niedermann, G. (1999) A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science*, **283**, 978-981.
- Gerards, W.L., Enzlin, J., Haner, M., Hendriks, I.L., Aebi, U., Bloemendal, H. and Boelens, W. (1997) The human alpha-type proteasomal subunit HsC8 forms a double ringlike structure, but does not assemble into proteasome-like particles with the beta-type subunits HsDelta or HsBPROS26. *J Biol Chem*, **272**, 10080-10086.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A. and Finley, D. (1998a) 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.H., Rubin, D.M., Fried, V.A. and Finley, D. (1998b) The regulatory particle of the Saccharomyces cerevisiae proteasome. *Mol Cell Biol*, **18**, 3149-3162.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1999) Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep*, **26**, 21-28.

- Goldberg, A.L. and Rock, K.L. (1992) Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature*, **357**, 375-379.
- Gonda, D.K., Bachmair, A., Wunning, I., Tobias, J.W., Lane, W.S. and Varshavsky, A. (1989) Universality and structure of the N-end rule. *J Biol Chem*, **264**, 16700-16712.
- Gottesman, S., Wickner, S. and Maurizi, M.R. (1997) Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev*, **11**, 815-823.
- Gray, C.W., Slaughter, C.A. and DeMartino, G.N. (1994) PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol*, **236**, 7-15.
- Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U. and Kloetzel, P.M. (1996) Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol Today*, **17**, 429-435.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.
- Haas, A.L. and Rose, I.A. (1982) The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem*, **257**, 10329-10337.
- Hanahan, D. (1985) *Techniques of transformation of E. coli*. IRL Press Oxford, Oxford.
- Haracska, L. and Udvardy, A. (1995) Cloning and sequencing a non-ATPase subunit of the regulatory complex of the Drosophila 26S protease. *Eur J Biochem*, **231**, 720-725.
- Hatfield, P.M. and Vierstra, R.D. (1992) Multiple forms of ubiquitin-activating enzyme E1 from wheat. Identification of an essential cysteine by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem*, **267**, 14799-14803.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. and Wolf, D.H. (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*, **272**, 25200-25209.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. and Wolf, D.H. (1993) PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, **268**, 5115-5120.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D.H. (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J*, **10**, 555-562.
- Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Freedman, R., Grunberger, D., Krstenansky, J., Lee, S., McCarley, D., Mulkins, M., Wong, B., Pease, J., Mizoue, L., Mirzadegan, T., Polsky, I., Thompson, K., Handel, T.M. and Jarnagin, K. (1999) Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry*, **38**, 13013-13025.
- Hendil, K.B., Khan, S. and Tanaka, K. (1998) Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J*, **332**, 749-754.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem*, **61**, 761-807.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hicke, L. (1999) Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol*, **9**, 107-112.
- Hicke, L. and Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, **84**, 277-287.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M. and Wolf, D.H. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, **273**, 1725-1728.
- Hilt, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T. and Wolf, D.H. (1993) The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, **268**, 3479-3486.
- Hilt, W. and Wolf, D.H. (1995) Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol Biol Rep*, **21**, 3-10.

- Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G. and Blanquet, S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8247-8251.
- Hochstrasser, M. (1995) Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 215-223.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, **30**, 405-439.
- Hochstrasser, M. and Varshavsky, A. (1990) In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor. *Cell*, **61**, 697-708.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Hoffman, L. and Rechsteiner, M. (1994) Activation of the multicatalytic protease: the 11S regulator and 20S ATPase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16890-16895.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. and Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5249.
- Jäger, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D.H. and Heinemeyer, W. (1999) Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol*, **291**, 997-1013.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*, **23**, 403-405.
- Jentsch, S., McGrath, J.P. and Varshavsky, A. (1987) The DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin conjugating enzyme. *Nature*, **329**, 131-134.
- Johnson, E.S., Bartel, B., Seufert, W., Varshavsky, A. (1992) Ubiquitin as a degradation signal. *EMBO J.*, **11**, 497-505.
- Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, **270**, 17442-17456.
- Johnson, P.R., Swanson, R., Rakhilina, L. and Hochstrasser, M. (1998) Degradation signal masking by heterodimerization of MATalpha2 and MATa1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, **94**, 217-227.
- Juang, Y.L., Huang, J., Peters, J.M., McLaughlin, M.E., Tai, C.Y. and Pellman, D. (1997) APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. *Science*, **275**, 1311-1314.
- Jungmann, J., Reins, H.A., Schobert, C. and Jentsch, S. (1993) Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature*, **361**, 369-371.
- King, R.W., Glotzer, M. and Kirschner, M.W. (1996) Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell*, **7**, 1343-1357.
- Kingsbury, D.J., Griffin, T.A. and Colbert, R.A. (2000) Novel Propeptide Function in 20S Proteasome Assembly Influences {beta} Subunit Composition. *J Biol Chem*.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Castillo, V. and Goldberg, A.L. (1999) Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell*, **4**, 395-402.
- Kloetzel, P.M., Soza, A. and Stohwasser, R. (1999) The role of the proteasome system and the proteasome activator PA28 complex in the cellular immune response. *Biol Chem*, **380**, 293-297.
- Kölling, R. and Losko, S. (1997) The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. *Embo J*, **16**, 2251-2261.
- Koopmann, J.O., Hammerling, G.J. and Momburg, F. (1997) Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol*, **9**, 80-88.
- Kopp, F., Dahlmann, B. and Hendil, K.B. (1993) Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J Mol Biol*, **229**, 14-19.
- Kopp, F., Hendil, K.B., Dahlmann, B., Kristensen, P., Sobek, A. and Uerkvitz, W. (1997) Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2939-2944.

- Kopp, F., Kristensen, P., Hendil, K.B., Johnsen, A., Sobek, A. and Dahlmann, B. (1995) The human proteasome subunit HsN3 is located in the inner rings of the complex dimer. *J Mol Biol*, **248**, 264-272.
- Kopp, F., Steiner, R., Dahlmann, B., Kuehn, L. and Reinauer, H. (1986) Size and shape of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*, **872**, 253-260.
- Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R.G. and Fink, G.R. (1994) Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *Embo J*, **13**, 6021-6030.
- Kunkel, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 488-492.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. and Zakour, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol*, **154**, 367-382.
- Lam, Y.A., Xu, W., DeMartino, G.N. and Cohen, R.E. (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, **385**, 737-740.
- Lanker, S., Valdivieso, M.H. and Wittenberg, C. (1996) Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science*, **271**, 1597-1601.
- Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, **8**, 397-403.
- Lin, L., DeMartino, G.N. and Greene, W.C. (1998) Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell*, **92**, 819-828.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution [see comments]. *Science*, **268**, 533-539.
- Madura, K. and Varshavsky, A. (1994) Degradation of G alpha by the N-end rule pathway. *Science*, **265**, 1454-1458.
- Mason, R.W. (1996) Lysosomal metabolism of proteins. *Subcell Biochem*, **27**, 159-190.
- McDonough, M., Sangan, P. and Gonda, D.K. (1995) Characterization of novel yeast RAD6 (UBC2) ubiquitin-conjugating enzyme mutants constructed by charge-to-alanine scanning mutagenesis. *J Bacteriol*, **177**, 580-585.
- McGrath, J.P., Jentsch, S. and Varshavsky, A. (1991) UBA1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J*, **10**, 227-236.
- Michalek, M.T., Grant, E.P., Gramm, C., Goldberg, A.L. and Rock, K.L. (1993) A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature*, **363**, 552-554.
- Mortimore, G.E., Miotto, G., Venerando, R. and Kadowaki, M. (1996) Autophagy. *Subcell Biochem*, **27**, 93-135.
- Nandi, D., Jiang, H.B. and Monaco, J.J. (1996) Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol*, **156**, 2361-2364.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B. and Monaco, J.J. (1997) Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *Embo J*, **16**, 5363-5375.
- Okazaki, K., Nishizawa, M., Furuno, N., Yasuda, H. and Sagata, N. (1992) Differential occurrence of CSF-like activity and transforming activity of Mos during the cell cycle in fibroblasts. *Embo J*, **11**, 2447-2456.
- Orford, K., Crockett, C., Jensen, J.P., Weissman, A.M. and Byers, S.W. (1997) Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem*, **272**, 24735-24738.
- Orlowski, M. (1990) The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*, **29**, 10289-10297.
- Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J. and Varshavsky, A. (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *Embo J*, **6**, 1429-1439.
- Papa, F.R., Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (1999) Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell*, **10**, 741-756.
- Peters, J.M. (1998) SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 759-768.

- Plempner, R.K. and Wolf, D.H. (1999) Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol Biol Rep*, **26**, 125-130.
- Pühler, G., Weinkauff, S., Bachmann, L., Müller, S., Engel, A., Hegerl, R. and Baumeister, W. (1992) Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *Embo J*, **11**, 1607-1616.
- Ramos, P.C., Höckendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A. and Dohmen, R.J. (1998) Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell*, **92**, 489-499.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**, 267-271.
- Richmond, C., Gorbea, C. and Rechsteiner, M. (1997) Specific interactions between ATPase subunits of the 26 S protease. *J Biol Chem*, **272**, 13403-13411.
- Rivett, A.J. (1989) The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J Biol Chem*, **264**, 12215-12219.
- Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I- presented peptides. *Annu Rev Immunol*, **17**, 739-779.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. and Goldberg, A.L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, **78**, 761-771.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.
- Rubin, D.M. and Finley, D. (1995) Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr Biol*, **5**, 854-858.
- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S. and Finley, D. (1998) Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *Embo J*, **17**, 4909-4919.
- Sadis, S., Atienza, C., Jr. and Finley, D. (1995) Synthetic signals for ubiquitin-dependent proteolysis. *Mol Cell Biol*, **15**, 4086-4094.
- Salama, S.R., Hendricks, K.B. and Thorner, J. (1994) G1 cyclin degradation: the PEST motif of yeast Cln2 is necessary, but not sufficient, for rapid protein turnover. *Mol Cell Biol*, **14**, 7953-7966.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. and Howley, P.M. (1993) The HPV-16E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**, 495-505.
- Scheffner, M., Nuber, U. and Huibregtse, J.M. (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, **373**, 81-83.
- Schmidt, M. and Kloetzel, P.M. (1997) Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme. *Faseb J*, **11**, 1235-1243.
- Schmidt, M., Schmidtke, G. and Kloetzel, P.M. (1997) Structure and structure formation of the 20S proteasome. *Mol Biol Rep*, **24**, 103-112.
- Schmidt, M., Zantopf, D., Kraft, R., Kostka, S., Preissner, R. and Kloetzel, P.M. (1999) Sequence information within proteasomal prosequences mediates efficient integration of beta-subunits into the 20 S proteasome complex. *J Mol Biol*, **288**, 117-128.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Lowe, J., Huber, R., Kloetzel, P.M. and Schmidt, M. (1996) Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta- subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *Embo J*, **15**, 6887-6898.
- Schmidtke, G., Schmidt, M. and Kloetzel, P.M. (1997) Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Mol Biol*, **268**, 95-106.
- Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. and Baumeister, W. (1995) Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, **268**, 579-582.

- Seufert, W. and Jentsch, S. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *Embo J*, **9**, 543-550.
- Shimbara, N., Nakajima, H., Tanahashi, N., Ogawa, K., Niwa, S., Uenaka, A., Nakayama, E. and Tanaka, K. (1997) Double-cleavage production of the CTL epitope by proteasomes and PA28: role of the flanking region. *Genes Cells*, **2**, 785-800.
- Shinde, U. and Inouye, M. (1994) The structural and functional organization of intramolecular chaperones: the N-terminal propeptides which mediate protein folding. *J Biochem (Tokyo)*, **115**, 629-636.
- Sibille, C., Gould, K.G., Willard-Gallo, K., Thomson, S., Rivett, A.J., Powis, S., Butcher, G.W. and De Baetselier, P. (1995) LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr Biol*, **5**, 923-930.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex [see comments]. *Cell*, **91**, 209-219.
- Skowyra, D., Koepp, D.M., Kamura, T., Conrad, M.N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1999) Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1 [see comments]. *Science*, **284**, 662-665.
- Slingerland, J. and Pagano, M. (1998) Regulation of the cell cycle by the ubiquitin pathway. *Results Probl Cell Differ*, **22**, 133-147.
- Springael, J.Y. and Andre, B. (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **9**, 1253-1263.
- Strous, G.J., van Kerkhof, P., Govers, R., Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1996) The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *Embo J*, **15**, 3806-3812.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V. and Hershko, A. (1995) The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell*, **6**, 185-197.
- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R. and Baumeister, W. (1995) The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol*, **5**, 766-774.
- Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G. and Varshavsky, A. (1991) The N-end rule in bacteria. *Science*, **254**, 1374-1377.
- Traenckner, E. and Baeuerle, P.A. (1995) Appearance of apparently ubiquitin-conjugated I $\kappa$ B- $\alpha$  during its phosphorylation-induced degradation in intact cells. *J Cell Sci*, **19**, 79-84.
- Tyers, M. and Willems, A.R. (1999) One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases [comment]. *Science*, **284**, 601, 603-604.
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. and Vierstra, R.D. (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. (1991) Naming a targeting signal [letter]. *Cell*, **64**, 13-15.
- Vierstra, R.D. (1993) Protein degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **44**, 385-410.
- Wertman, K.F., Drubin, D.G. and Botstein, D. (1992) Systematic mutational analysis of the yeast ACT1 gene. *Genetics*, **132**, 337-350.
- Wolfe, K.H. and Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, **387**, 708-713.
- Yaglom, J., Linskens, M.H., Sadis, S., Rubin, D.M., Futcher, B. and Finley, D. (1995) p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol Cell Biol*, **15**, 731-741.
- Yamano, H., Gannon, J. and Hunt, T. (1996) The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J*, **15**, 5268-5279.
- Yang, Y., Fruh, K., Ahn, K. and Peterson, P.A. (1995) In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem*, **270**, 27687-27694.

- Yu, H., King, R.W., Peters, J.M. and Kirschner, M.W. (1996) Identification of a novel ubiquitin-conjugating enzyme involved in mitotic cyclin degradation. *Curr Biol*, **6**, 455-466.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K. and Seufert, W. (1998) Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science*, **282**, 1721-1724.
- Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol*, **100**, 468-500.
- Zühl, F., Seemuller, E., Golbik, R. and Baumeister, W. (1997) Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome. *FEBS Lett*, **418**, 189-194.
- Zwickl, P., Grziwa, A., Puhler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F. and Baumeister, W. (1992) Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry*, **31**, 964-972.
- Zwickl, P., Kleinz, J. and Baumeister, W. (1994) Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol*, **1**, 765-770.
- Zwickl, P., Ng, D., Woo, K.M., Klenk, H.P. and Goldberg, A.L. (1999a) An archaeobacterial ATPase, homologous to ATPases in the eukaryotic 26 S proteasome, activates protein breakdown by 20 S proteasomes. *J Biol Chem*, **274**, 26008-26014.
- Zwickl, P., Voges, D. and Baumeister, W. (1999b) The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1501-1511.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<sup>32</sup> P	radioaktives Phosphorisotop	N <sub>2</sub>	Stickstoff
<sup>35</sup> S	radioaktives Schwefelisotop	NaCl	Natriumchlorid
Abb.	Abbildung	NaOH	Natriumhydroxid
APS	Ammoniumpersulfat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Natriumhydroxyolphosphat
Arg	Arginin	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydroxyolphosphat
ARS	Autonom replizierende Sequenz	NEM	N-Ethylmaleimid
ATP	Adenosintriphosphat	NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
bp	Basenpaare	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
BSA	Rinderserumalbumin	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
bzw.	beziehungsweise	ORF	offenes Leseraster
β-Gal	β-Galaktosidase	PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
ca.	circa	PCR	Polymerasekettenreaktion
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid	PEG	Polyethylenglykol
CEN	Centromersequenz	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ci	Curie	PVDF	Polyvinylidenfluorid
Cu	Kupfer	RNA	Ribonukleinsäure
Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kupfersulfat	RT	Raumtemperatur
CPRG	Chlorphenolrot-β-D-Galaktopyranosid	s.	siehe
d.h.	das heißt	SDS	Natriumdodecylsulfat
DIG	Digoxygenin	sek	Sekunde
DMF	Dimethylformamid	TCA	Trichloressigsäure
DMSO	Dimethylsulfonamid	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
DTT	Dithiothreitol	U	Einheit der Enzymaktivität
dXTP	Desoxyribonukleotid	u.a.	unter anderem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	Ub	Ubiquitin
EtBr	Ethidiumbromid	UE	Untereinheit
g	Erdbeschleunigung	vgl.	vergleiche
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure	Vol.	Volumen
HA	Hämagglutinin	WT	Wildtyp
HCl	Chlorwasserstoff	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
IgG	Immunglobulin G		
KAc	Kaliumacetat		
KCl	Kaliumchlorid		
kDa	Kilodalton		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydroxyolphosphat		
LiAc	Lithiumacetat		
LiCl	Lithiumchlorid		
β-ME	β-Mercaptoethanol		
Met	Methionin		
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid		
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat		
min	Minute		
Mn	Mangan		

## 8 ANHANG

*K. lactis UMP1* mit flankierender Sequenz (Nukleotide der codierenden Sequenz sind fett dargestellt):

```

ATTTTAGTATTTTAAATGAGAATTTGAATTGGCGATTTTCAGTTAGATGAGGAAAATGTGTCAGCGGGAACAATACA
GGATGAAATAGCCTCAATAGGCCTTCTACGGAATTGACAATACGCTAGTTGATGGGCATTGAACCTGTAAGATAAC
CCTAGTAATTTACAGTGCTAGGCTACAGTGATGTATTAACATGGAAAAGAACAAAACCCGCACACCACACACTAAA
CACACTCATTCTCTTTCTATTGCCATAAAAATAAGTTAAAAGTGGAAATCATTCCAAATAGTTTAAGCATTATGGA
CATACAAACCACAGGGAAATAACTTTATAACAGACAGTAGAGTAATTCATAGGGTCTAACACACTGAATACAGTAG
ACAGTAACTAAATCCCAGGTAAACATAATACTGTCATAAGAACCATATCCAAGAATGCCAATGAATATCGTTCCAA
GTCCAGATTTCAAGTCTGCTGTTGCCACCGATAAGGGTTGCGAGCACCAATCGAATGCAGTAGCAAGTTTACCAGA
TGTATTCGGTGAACAAGTCGGTGGCCGCCCTCTGAACACTCAACTTAATGACAGACATCCATTAGAGTCGCGTGTA
CGCAACTGGGACGAGACCCAGCACAAAAGGCAATTGGAAACAATATAGACAGATTTTTCGGTGTTGCCGAACCAATGA
AGAGGGTCATGGAACTGAACTAGTACAAAAACACAGACTTCAATCCTCTAAATCAATCCAACCTGCATAAAGATGT
TTAATGAACAAAAGAAGCGTCCATTGACTGGGAGGACGTTTATCCAACCTCCGATTTCCGAAGTGGAAATGATGGTA
GCAGACGATGTACACACCAAGATAGAAAAGAGAATGGGGATTTAAACAATTCTTATGTTTCTATGTTTCTTCATTT
CATAGTCCATCTCACTGCAAACTACACAATTCTGTAAACGTCCATCGTATGTATTTTAATTTAGTCCATAAGAA
GTTTTACATTGACTATATACGAATTGATACTGTTTCTAAGTGGTAACACGCCAATTTCAATAAAAAAAAAAGCAA
AATGGGTATCTACCTTGCAAAAAGGTAAGATATGAATGTAACATGCCATTTGCATCTACACCGTCTTGTTTCTCA
TAACTTACCCCTAAGCTT

```

*S. pombe UMP1* (Nukleotide des Introns sind klein geschrieben):

```

ATGAAGATTGTTCCCTGACGTGCAACCAGCTGCTGAAGTATCTGGAAACTTCAAAGTCTCAGTTTTAGAGCCCAGCA
TTCCAGCTGTACACCGTGTGAAAATAAACATCCTCTAGAAAAGTCGATTAAAGAATTGGGAGGCTCAACAGCAACA
AATTCGCCTTGATAGCATGCGTAGAATTTACGGTTTGCATGAGCCTGTGCGTCGTGAAATGGAACAGAAACTCGCT
TCACAGgtaggttattaatgtatagactaatatagtgtatatttacttattggtgcacttatatcttccccctct
tttttttcttttagttttactgactcaagcatagAGTCTCGTCCTTTGGCTTTAGGAGGATCTGCAAACTTTCAT
TTAGATATTTCTTGCCAATCGTGAGGCTGTCTTAGACGAAACCGACATATATGCTGCCCTATTCTTTGGAAATGA
CTTATCAAAATGAAATGGCCATTAGATATGGTCTCTAA

```

„Accession Numbers“ der *UMP1*-cDNA-Sequenzen

*H. sapiens*: AA452723

*M. musculus*: AA403417

*R. norvegicus*: AW434033; AI069944

*D. rerio*: AW184602

*D. melanogaster*: AC004759

*A. thaliana*: Z37686; A1996955

*P. mariana*: AF051205

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Dissertation wurde in vorgelegter oder ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, Juni 2000

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Cornelis. P. Hollenberg danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Interesse an dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. E. Knust danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. J. Dohmen für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, sowie für die wertvollen Diskussionen und experimentellen Anregungen.

U. Boehm, J. C. Howard, L. Burri und F. Lévy danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit.

Ralf Röhrich danke ich für die Hilfe bei der Benutzung des Bio-Imaging Analysers, Mark Hiller und Hans-Peter Schmitz für die Unterstützung bei der Bewältigung von Problemen mit Soft-und Hardware.

Anja Lorberg und Ruth Engels danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dohmen, Ingrid Schwienhorst, Isabel Fuchs, Markus London, Birgit Keck, Mike Farwick und Johannes Boehm bedanke ich mich für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie das angenehme Arbeitsklima.

Besonderer Dank gilt Paula C. Ramos für die Einführung in die faszinierende Welt der Biochemie und für unzählige Diskussionen fachlicher sowie freundschaftlicher und philosophischer Natur. Ganz besonders danke ich Oliver Feyen, der durch sein sonniges Gemüt manchen Arbeitstag zum Erlebnis machte und mir zum Freund wurde.

Mein größter Dank gilt Tabea, die immer für mich da war, mich in schwierigen Zeiten unterstützt und aufgemuntert hat und so manchen Abend geduldig auf mich gewartet hat. Danke, daß es Dich gibt !