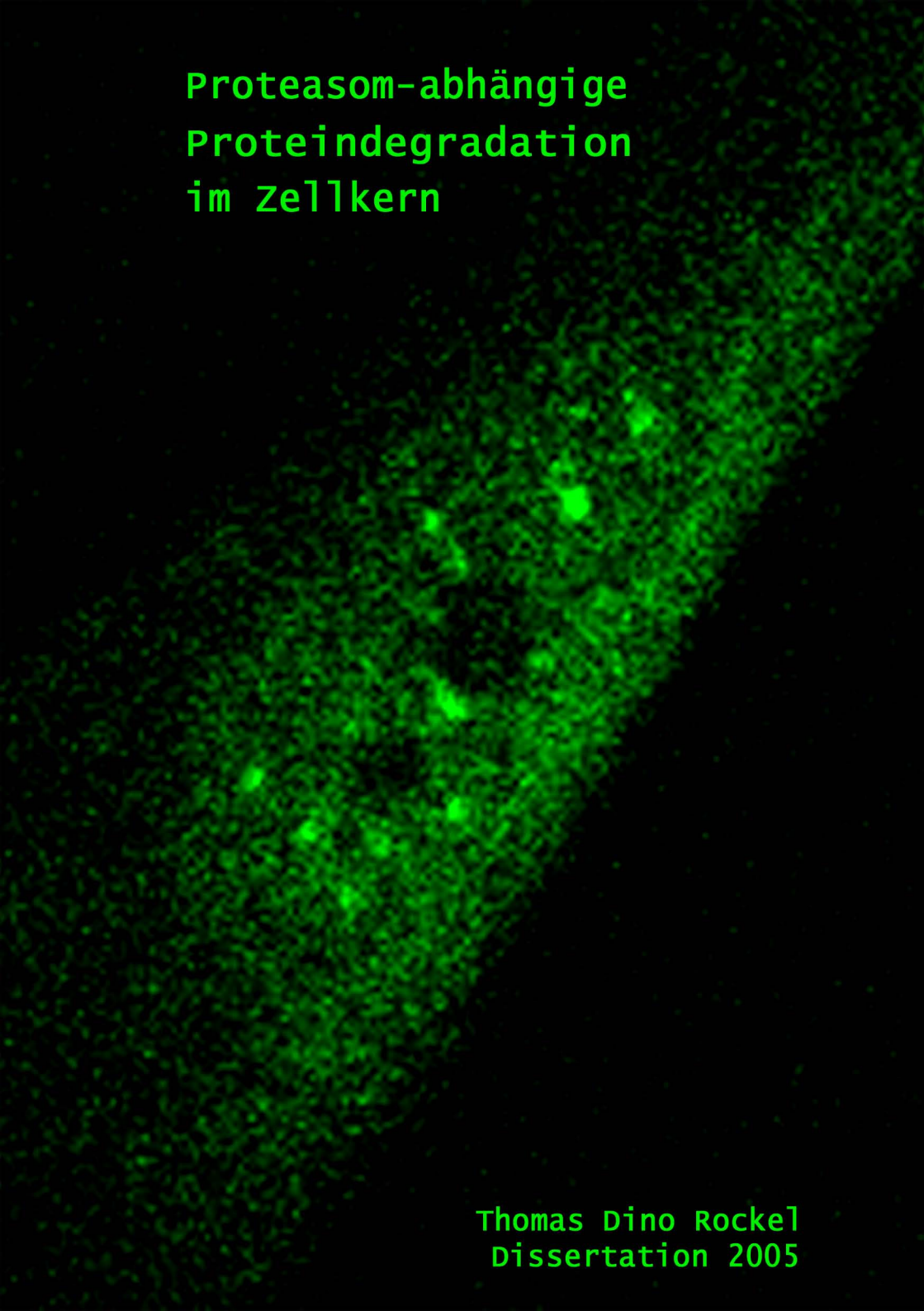
Proteasom-abhängige Proteindegradation im Zellkern



Thomas Dino Rockel
Dissertation 2005

Deckblatt vorn:
Aufnahme einer humanen Fibroblastenzelle mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Der Zelle wurde gequenchtes Proteolysesubstrat mikroinjiziert; grüne Fluoreszenzsignale zeigen Orte intrazellulärer Proteindegradation.

Deckblatt hinten:
Aufnahmen humaner Epithelzellen während der Zellteilung. Die DNA der Zellen wurde mit einem fl uoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht. Die Bilder zeigen unterschiedliche Organisationsformen des Erbguts während der Phasen der Zellteilung.
Von links nach rechts: Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase, Cytokinese.

PROTEASOM-ABHÄNGIGE PROTEINDEGRADATION IM ZELLKERN

Inaugural – Dissertation

Zur Erlangung der Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Thomas Dino Rockel

aus Wiesbaden

Düsseldorf, März 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: PD Dr. Anna von Mikecz

Korreferent: Prof. Joachim F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juni 2005

In Erinnerung an meine Mutter
Ursula Rockel
(24. März 1944 – 26. Dezember 1991)

I ZUSAMMENFASSUNG 7

II EINLEITUNG 9
II.1 Der Nucleus 9
II.1.1 Subnucleäre Strukturen 10
II.2 Intrazelluläre Proteolyse 19
II.3 Das Ubiquitin-Proteasomen-System 23
II.3.1 Ubiquitin 27
II.3.2 Proteasom 30
II.3.3 Lokalisation von Proteasomen 37
II.3.4 Nucleoplasmatische Proteasomen 39
II.3.5 Proteasominhibitoren 42
II.3.6 Proteasomale Proteolyse 43

III WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG 47

IV MATERIAL UND METHODEN 49
IV.1 Reagenzien 49
IV.2 Zellkultur 52
IV.3 Immunfluoreszenz 53
IV.4 Zellfraktionierung 54
IV.5 Immunblot / Western Blot 56
IV.6 Proteasomenaktivitätstest 58
IV.7 Wechselzahl der nucleären Proteasomen 58
IV.8 Proteasomale Aktivität im Nucleus lebender Zellen / Mikroinjektion 59
IV.9 Proteoylsesubstrate 61
IV.10 Mikroskopie 63
IV.11 In situ Quantifikation der Fluoreszenzsignale 64
IV.12 Statistische Analysen 64

V ERGEBNISSE 67
V.1 Subzelluläre Lokalisation von Proteasomen 67
V.2 Subzelluläre Lokalisation proteasomaler Aktivität in vitro 80
V.3 Proteasomale Aktivität im Nucleus lebender Zellen 89
V.4 Proteasomenabhängige Proteindegradation im Nucleus lebender Zellen 91
V.5 Lokalisation proteasomaler Proteindegradation in subnucleären Kompartimenten lebender Zellen 96

VI DISKUSSION 101
VI.1 Aktive und nichtaktive Proteasomen lokalisieren in den gleichen Zellkompartimenten 101
VI.2 Nucleoplasmatische Proteasomen sind aktive Proteolyse-Maschinen 103
VI.3 DQ-OVA zeigt Orte proteasomaler Proteindegradation im Nucleus 105

VI.4 Passive translokation von mikroinjizierten Proteinen durch die Kernhüllenmembran 107
VI.5 Regulation nucleärer Funktion 108
VI.6 Hypothese zur Organisation der proteolytischen Zentren in Interchromatin Domänen Kanälen 113
VI.7 Proteolyse ist eine intrinsiche Funktion des Nucleus 114

VII LITERATURVERZEICHNIS 117

VIII ANHANG 141

I Zusammenfassung

Der Zellkern (Nucleus) ist das Steuerzentrum der eukaryontischen Zelle. Klassische Funktionen des Nucleus sind die Replikation, die Transkription, die Ribosomenreifung und das Spleißen der RNA. Funktionelle Proteinkomplexe, die durch Protein-Protein-Wechselwirkungen entstehen, bilden die Struktur des Nucleus. Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) degradiert circa 80% aller endogenen Proteine. Obwohl bereits seit langem beobachtet wird, dass die Hauptkomponenten des UPS sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus lokalisieren, ist die Funktion des nucleären UPS wenig beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden proteasomale Aktivität und Orte der proteasomalen Proteolyse im Nucleus untersucht. Mit den Methoden der indirekten Immunfluoreszenz und der biochemischen Zellfraktionierung wurde die Lokalisation nucleärer Proteasomen in humanen Primärzellen (Fibroblasten der Vorhaut), humanen Epithelzelllinien (HEp-2, KB), einer humanen Keratinocytenzelllinie (HaCaT) und einer murinen Fibroblastenzelllinie (L929) untersucht. In allen Fällen wurden nucleäre Proteasomen im Nucleoplasma detektiert. Inhibition der Proteasomenaktivität durch Lactacystin (LC) oder MG-132 führten nicht zu einer Modifikation der Proteasomenverteilung. In vitro Aktivitätsmessungen mit Hilfe des für das Proteasom spezifischen Peptidsubstrats suc-LLVY-7-Amino-4-Methylcourmarin (AMC) zeigten hohe Substratumsätze im Cyto-

(0,0969 µMol/min) und im Nucleoplasma (0,0541 µMol/min), während in Fraktionen der Kernhülle und der Nucleolen keine Aktivität beobachtet wurde. Mit Hilfe der Mikroinjektion des fluorogenen suc-LLVY-AMC wurde erstmalig proteasomale Aktivität im lebenden Nucleus beobachtet. Der Substratumsatz in vivo war mit 0,0472 µMol/min vergleichbar zu den Messungen der nucleoplasmatischen Fraktion. Weiterhin konnte durch Mikroinjektion des fluorogenen Proteinsubstrats DQ-OVA erstmalig bestimmt werden, dass proteasomale Proteindegradation im Nucleus in fokalen Zentren stattfindet. Diese proteolytischen Zentren konnten bei Inhibition der Proteasomen durch LC nicht beobachtet werden. Die Quantifikation von Co-Immunfluoreszenzfärbungen subnucleärer Strukturen ergab, dass die proteolytischen Zentren des Nucleus mit 20S Proteasomen, Ubiquitin sowie dem Spleißfaktor SC35 zu 10%-50% co-lokalisieren. Geringe Co-Lokalisation (circa 10%) wurden für PML Kernkörperchen und RNA Polymerase IIα gemessen, wohingegen cytoplasmatisches β-Tubulin, nucleoläres Fibrillarin und die Kernhüllenproteine Lamin A/C nicht in proteolytischen Zentren vorkommen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass im Nucleus proteasomale Aktivität vorhanden und Proteindegradation in fokalen Zentren konzentriert ist. Die vorgestellten Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass proteasomale Proteolyse, ebenso wie Replikation, Transkription und Spleißen, eine intrinsische Funktion des Nucleus ist.

II Einleitung

II.1 Der Nucleus

Der Zellkern (Nucleus) ist die größte und auffälligste Organelle der eukaryontischen (‚Karyon', griech. Kern) Zelle. Als erste subzelluläre Struktur wird der Nucleus 1831 von Robert Brown in Orchideen entdeckt und beschrieben. Umgeben von einer Doppelmembran lagert hier das Erbgut der Zelle, die Desoxyribonucleinsäure (DNA).

Der Nucleus eukaryontischer Zellen ist aber nicht nur ein Lagerungsort für Chromatin, seine wichtigsten Funktionen sind die kontrollierte Synthese der DNA (Replikation), der Ribonucleinsäuren (RNA, Transkription) und die Ribosomenreifung (Ribosomenbiogenese). Somit fungiert der Nucleus als das Steuerzentrum der Zelle: Mittels regulierter Transkription kann die Zelle ihre Proteinzusammensetzung und somit ihre Eigenschaften variieren und auf ihre Umwelt reagieren. Die räumliche Trennung zwischen dem Ort der Transkription und dem Ort der Proteinbiosynthese (Translation) in Eukaryonten ermöglicht außerdem eine effektive posttranskriptionelle Weiterverarbeitung, wie Methylierung, Adenylierungen und das Ausschneiden (Spleißen) nicht-codierender Nucleotidsequenzen (Introns) aus den RNA-Primärtranskripten (prä-RNA). Die unterschiedliche Weiterverarbeitung (alternatives Spleißen) eines Primärtranskripts

ermöglicht der eukaryontischen Zelle aus einer primären heterogenen RNA („heterogenous nuclear RNA“, hnRNA) alternierende Boten-RNA („messenger RNA“, mRNA) und damit alternierende Proteine zu generieren.
Der Nucleus enthält außer der zellulären DNA viele Proteine, die zu seiner besonderen Funktion beitragen. Diese Proteine, darunter Histone, DNA- und RNA-Polymerasen, Gen-Regulationsproteine und Proteine für das RNA-Spleißen, werden im Cytosol synthetisiert und in den Zellkern transportiert. Nucleäre Proteine sind häufig in Multiprotein/Nucleinsäure-Komplexen organisiert. Diese Komplexe bilden Proteinmaschinen, die spezifische Funktionen im Nucleus ausführen und typische Verteilungsmuster (Lokalisationen) haben. Anhand dieser Verteilungsmuster der Proteinmaschinen kann der Nucleus in unterschiedliche, subnucleäre Strukturen („nuclear domains“) unterteilt werden.

II.1.1 Subnucleäre Strukturen

Die subnucleären Strukturen repräsentieren funktionelle Kompartimente und ähneln in ihrer Funktion den Organellen des Cytoplasmas. Im Gegensatz zu Organellen erfolgt die Kompartimentierung im Nucleus jedoch nicht über Phospholipidmembranen, sondern über die Wechselwirkungen der Proteinkomplexe. Die subnucleären Strukturen des Nucleus können daher als sich selbst organisierende, dynamische Organellen angesehen werden, die sich kontinuierlich durch die funktionellen

Erfordernisse des Nucleus verändern (Spector, 2001; Lamond and Earnshaw, 1998; Lewis and Tollervey, 2000).

Umschlossen ist der Nucleus ist von einer Doppelmembran, der Kernhülle („nuclear envelope“, NE), deren äußere Membran in das rauhe Endoplasmatische Reticulum (ER) übergeht (Burke, 2001).
Das Lumen der Kernhülle wird als perinucleärer Raum („perinuclear space“) oder Perinuclearzisterne bezeichnet und geht in das Lumen des ERs über. Für eine Verbindung zwischen Cytoplasma und Nucleoplasma sorgen Kernporenkomplexe („nuclear pore complexes“) (Stoffler et al., 1999). Hier verschmelzen innere und äußere Kernmembran und bilden einen Durchgang für Ionen, Proteine und RNA-Moleküle (Wente, 2000; Ryan and Wente, 2000).
Im Kerninneren grenzt die Doppelmembran an die periphere nucleäre Lamina („peripheral nulcear lamina“).
Diese filamentöse Struktur besteht hauptsächlich aus den Strukturproteinen Lamin A/C und B (Kirschner and Goldberg, 1983) und ist maßgeblich für die Stabilität der Kernhüllenstruktur (Abb. 2.1) verantwortlich. Dissoziation und Degradation der Lamine leiten die Auflösung des Nucleus während der Mitose ein, Reassoziation und Neusynthese der Lamine sorgen für die Neubildung des Nucleus. (Moir et al., 2000; Pfaller et al., 1991)
Die Strukturproteine Lamin A und C sind Spleißvarianten desselben Gens und bilden mit dem Lamin B die Hauptbestandteile der nucleären Lamina. Der Raum im Nucleus teilt sich in Bereiche hoher DNA-Dichte und Bereiche hoher Proteindichte.

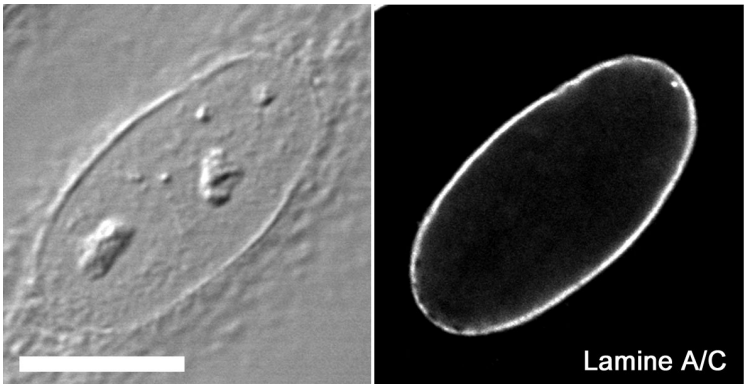


Abb. 2.1: Die nucleäre Lamina. Differenzielles Interferenzkontrastbild (links) und korrespondierendes konfokales Immunfluoreszenzbild (rechts) einer HEp2-Zelle, die mit Antikörpern gegen die Lamine A und C gefärbt wurde. Größenbalken: 5 µm

Die DNA der Zelle, verpackt mit Histonen und Nicht-Histonproteinen, liegt als Chromatin (‚Chroma' griech. für Farbe) im Nucleus vor und bildet das Grundgerüst der nucleären Architektur: Das fädige Interphase-Chromatin organisiert sich während der Mitose zu den kompakteren Strukturen der Chromosomen. In der Interphasezelle nimmt das entspiralisierte Chromatin eines Chromosoms jeweils einen individuellen Bereich im Nucleus ein.

Es entstehen abgegrenzte Chromosomen-Territorien („chromosome territories", CTs), die sich nicht überschneiden. (Schardin et al., 1985; Lamond and Earnshaw, 1998) (Abb. 2.2). Zwischen zwei CTs liegen Regionen, die frei von Chromatin sind, so genannte Interchromatin-Domänen. Diese Domänen bilden ein Netz aus Kanälen („interchromatin domain channels," IDCs), deren funktionelle Bedeutung diskutiert wird.

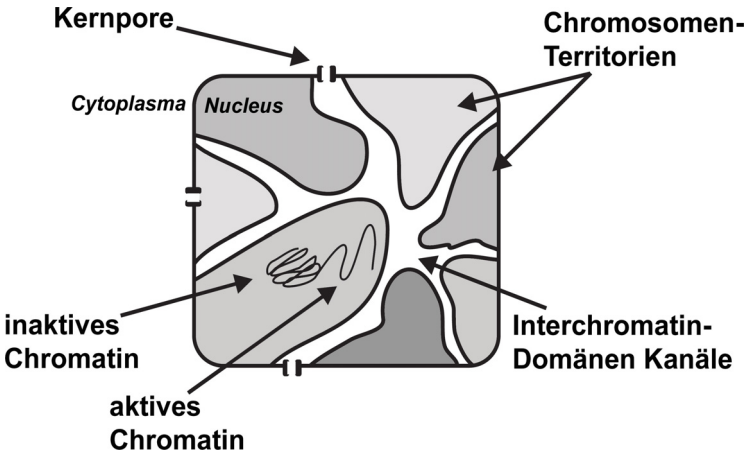


Abb. 2.2: Interchromatin-Domänen-Kanäle. Modell der Chromosomenorganisation im Interphase-Zellkern: Chromosomen nehmen distinkte Bereiche (Chromosomen-Territorien, CTs) ein, wobei dicht gepacktes, inaktives Chromatin (Heterochromatin) sich eher im Zentrum der CTs befindet, während lockeres, aktives Chromatin (Euchromatin) in der Peripherie der CTs lokalisiert ist. Da die CTs nicht unmittelbar aneinander grenzen, entsteht ein Bereich, der frei von Chromatin ist und die Zelle wie ein Kanalnetzwerk durchzieht (Interchromatin-Domänen-Kanäle, IDCs). Im Vergleich zu den CTs sind die IDCs Bereiche erleichterter Diffusion. Modell nach Cremer (Cremer et al., 2000).

Im Vergleich zu den CTs stellen die IDCs relativ geringe Diffusionsbarrieren dar. Es konnte gezeigt werden, dass Partikel unterhalb von 500 kD praktisch ungehindert im Zellkern diffundieren (Seksek et al., 1997).

Die IDCs funktionieren demnach als Schnellrouten für passiven Transport. Eventuell stellen die IDCs auch ein funktionelles Kompartiment des Nucleus dar: Ausgehend von der Beobachtung, dass sich aktiv transkribierte Gene häufig im äußeren Bereich der CTs befinden (Kurz et al., 1996; Wansink et al., 1996; Eils et al.,

1996), formulieren Cremer et al. ein Modell für die schnelle Modifikation von hnRNA Transkripten (Cremer et al., 2000; Cremer et al., 1993). Die Anreicherung von Spleißosomen in den IDCs gewährleistet, dass naszierende Primärtranskripte durch die erleichterte Diffusion innerhalb der Kanäle schnell in Kontakt mit den sie weiter verarbeitenden Proteinmaschinen kommen. Eine hohe Enzymdichte in den IDCs und eine schnelle Diffusion der Substrate durch die IDCs erleichtert die Entstehung von Substrat-Enzymkomplexen und gewährleistet eine effektive Enzymreaktion.

Die IDCs sind nach dieser Theorie nicht nur ein schneller Transportweg durch den Nucleus, sondern ein eigenes nucleäres Kompartiment, in dem durch erleichterte Diffusion und angereicherte Enzyme eine hohe katalystische Effektivität erzielt wird. In den IDCs lokalisieren die Interchromatin Granulären Cluster („interchromatin granular cluster“, IGC) (Abb. 2.3), welche die Spleißosomen beherbergen. Die Spleißosomen sind Proteinmaschinen die sich aus kleinen nucleoplasmatischen Riboproteinpartikeln („small nuclear riboproteinparticles“, snRNPs, (Nyman et al., 1986)) und Spleißfaktoren wie SC35 oder U1-70k (Fu and Maniatis, 1990) zusammensetzen. Sie sind verantwortlich für die Reifung der prä-RNA. Die Verteilung der snRNPs im Nucleoplasma hat ein heterogenes, aber typisches Muster: 25 bis 50 kleine Bereiche („nuclear speckles“ oder Spleißinseln) hoher Spleißosomendicht sind untereinander verbunden (Spector, 2001).

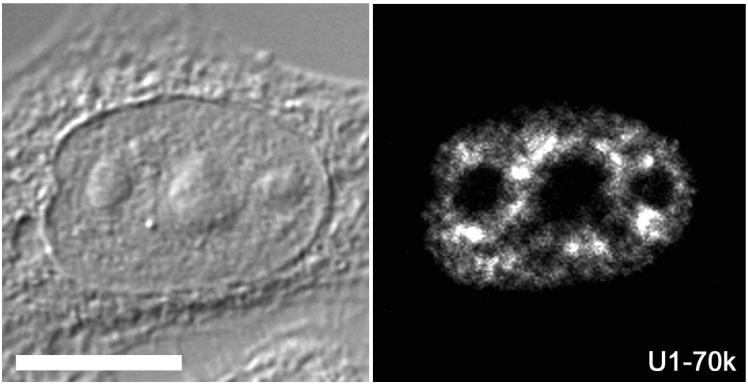


Abb. 2.3: Die Interchromatin Granulären Cluster. Differenzielles Interferenzkontrastbild (links) und korrespondierendes konfokales Immunfluoreszenzbild (rechts) einer HEp2-Zelle, die mit Antikörpern gegen U1-70k gefärbt wurde. Wie SC35 ist U1-70k ein Bestandteil der kleinen nucleären Riboproteinpartikel (snRNPs) und Teil der Spleißosomen, welche das Spleißen der Primärtranskripte der Boten-RNA (hnRNA) kontrollieren. Das Verteilungsmuster der snRNPs hat eine netzartige Hintergrundfärbung mit Regionen stark angereicherter snRNPs. Die stark leuchtenden Bereiche werden als Interchromatin Granuläre Cluster bezeichnet. Größenbalken: 5 µm

Dieses Verteilungsmuster wird auch als ‚netzartig-fleckig' („reticulated speckled") bezeichnet. Die Beobachtung, dass transkriptionell aktive Zellen weniger und kleinere IGCs aufweisen (Zeng et al., 1997), führte zu der Annahme, dass es sich bei den IGCs um Lagerstätten von Spleißosomen-Komponenten handelt.

Im proteindichten Raum zwischen den Chromosomen-Territorien liegen auch die subnucleären Strukturen der Kernkörperchen und die größte und prominenteste subnucleäre Struktur: der Nucleolus.

Die Nucleolen (Abb. 2.4) sind die Orte der Ribosomenbiogenese der Zelle und bilden sich um die Gene der Ribosomenuntereinheiten (ribosomale DNA, rDNA). Diese codieren für die 28S, 18S und 5,8S

ribosomale RNA (rRNA) und liegen im Genom in Gen-Clustern in mehrfacher Ausführung hintereinander geschaltet (sog. „tandem-repeats“) vor. Im humanen Genom findet man rDNA-Cluster auf 5 Chromosomen und rDNA-Gene in circa 250 Kopien (Spector, 2001). Ein rDNA-Cluster dient als Anlagerungsort der Proteinmaschinen der Ribosomenbiogenese und wird auch als „nucleoläre Organisationsregion“ („nucleolar organizer region“, NOR) bezeichnet. Der Nucleolus setzt sich aus drei Regionen unterschiedlicher Struktur zusammen. Der Kern der Nucleolen bildet sich um ein NOR und wird als fibrilläres Zentrum („fibrillar center“, FC) bezeichnet. Um das FC liegt eine zweite Region, die so genannte „dichte fibrilläre Komponente“ („dense fibrillar component“, DFC). Den äußeren Teil eines Nucleolus bildet die granuläre Region („granular region“, GR) (Scheer and Hock, 1999). Es wird angenommen, dass die Transkription der rRNA-Gene durch die RNA Polymerase I (Pol I) im FC stattfindet und der Reifungsprozess der prä-rRNA im DFC beginnt und sich nach außen in die GR erstreckt. Die Anzahl der Nucleolen ist transkriptions- und zellzyklusabhängig und verändert sich mit der benötigten Ribosomensyntheserate. Löst sich die Struktur des Nucleus zu Beginn der Mitose auf, geschieht dies parallel mit den Nucleolen. Gegen Ende der Telophase bilden sich die Nucleolen aus „prä-Nucleolären-Körperchen“ neu (Bell et al., 1992; Benavente et al., 1987). Andere Rollen, die im Zusammenhang mit dem Nucleolus diskutiert werden, sind Funktionen in der Zellzykluskontrolle (Shou et al., 1999) , in Degradations- und Export- Prozessen von mRNA.

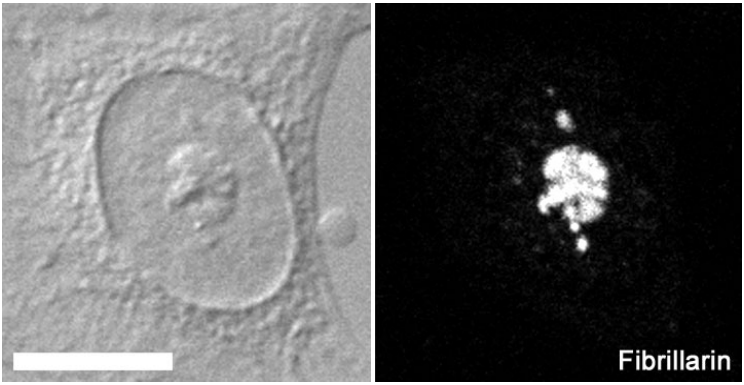


Abb. 2.4: Der Nucleus. Differenzielles Interferenzkontrastbild (links) und korrespondierendes konfokales Immunfluoreszenzbild (rechts) einer HEp2-Zelle, die mit Antikörpern gegen Fibrillarin gefärbt wurde. Das nucleoläre Protein Fibrillarin ist Bestandteil vieler nucleolärer Ribonucleoproteinpartikel (snoRNPs) und Teil der Spleißingmachinerie der Nucleolen. Fibrillarin lokalisiert außerdem in den Cajal-Kernkörperchen (punktförmige Struktur unmittelbar unterhalb des Nucleolus). Größenbalken: 5 µm

(Harris et al., 1969) und in stressinduzierten Signaltransduktionskaskaden (Olson, 2004).

Aufgrund der zahlreichen in den letzten Jahren entdeckten Funktionen wird der Nucleolus auch als plurifunktionell beschrieben (Pederson, 1998).

Unter dem Begriff der Kernkörperchen („nuclear bodies“) fasst man eine Vielzahl punktförmiger subnucleärer Strukturen im Interphase-Nucleus zusammen. (Gall, 2000; Gall, 2001). Kernkörperchen unterscheiden sich in Anzahl und Proteinzusammensetzung und sind häufig durch die Anwesenheit spezieller Signaturproteine definiert. p80-Coilin (Andrade et al., 1993; Almeida et al., 1998), ein Protein mit unbekannter Funktion, ist das Signaturprotein für Cajal-Kern-

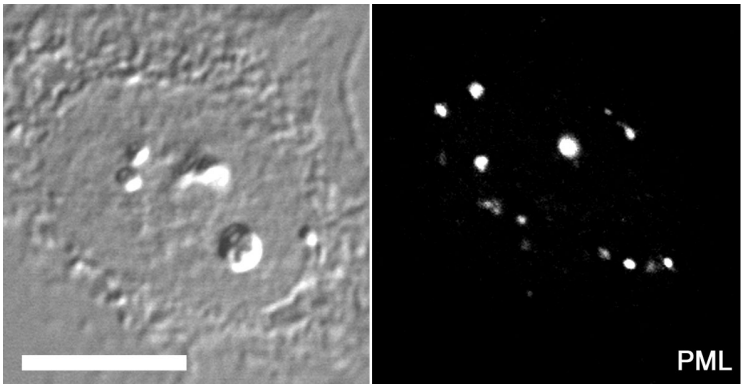


Abb. 2.5 Die nucleären Kernkörperchen. Differenzielles Interferenzkontrastbild (links) und korrespondierendes konfokales Immunfluoreszenzbild (rechts) einer HEp2-Zelle, die mit Antikörpern gegen das PML-Protein gefärbt wurde. Promyelocytische Leukämie-Kernkörperchen (PML-Bodies) sind typische Vertreter eine Anzahl unterschiedlicher subnucleärer Strukturen, die aufgrund ihrer punktförmigen Lokalisation als Kernkörperchen zusammengefasst werden. Die Kernkörperchen unterscheiden sich sowohl im Proteingehalt als auch in der Häufigkeit ihres Auftretens und scheinen unterschiedliche Funktionen im Zellkern zu erfüllen. Größenbalken: 5 µm

körperchen (Cajal-Bodies, früher auch: Coiled Bodies). Ein bis zehn der nach ihrem Entdecker Ramon y Cajal benannten Kernkörperchen finden sich in einem Nucleus.

Die biologische Funktion der Cajal-Kernkörperchen ist bisher nicht vollständig verstanden, sie scheinen jedoch eine Art Verteilerstation für nucleoplasmatische und nucleoläre Spleiß- und Transkriptionsfaktoren zu sein (Gall, 2001). Promyelocytische Leukämie-Kernkörperchen (PML-Bodies) sind eine andere Art Kernkörperchen, welche nach ihrer Rolle in der akuten Promyelocytischen Leukämie benannt sind (Zhong et al., 2000)

(Abb. 2.5). Die zehn bis 30 PML-Kernkörperchen eines Nucleus enthalten Transkriptionsfaktoren, chromosomale Proteine, Tumor-Suppressoren, Proto-Oncogene und das Signaturprotein PML und scheinen an der Transkription immunologisch relevanter Gene beteiligt zu sein (LaMorte et al., 1998; Boisvert et al., 2000; von et al., 2000; Kiesslich et al., 2002). Weiterhin wird auch eine Funktion in der nucleoplasmatischen Proteolyse diskutiert (Wojcik and DeMartino, 2003; Anton et al., 1999).

II.2 Intrazelluläre Proteolyse

In den frühen Theorien der zellbiologischen Forschung war die Zerstörung einmal vorhandener Zellbestandteile nicht vorgesehen. Otto Knut Folin formulierte 1905 eine These, nach welcher einmal entstandene Eiweiße (Proteine) in einer Zelle stabil sind (Folin, 1975). Erst 40 Jahre später wurde dieses Dogma widerlegt. Mit Hilfe von ^{15}N-markierten Proteinen konnte gezeigt werden, dass Proteine in einer Zelle einer kontinuierlichen Neusynthese und einem kontinuierlichen Abbau unterliegen („protein turnover“) (Ratner et al., 1987).

Den Abbau der Proteine in der Zelle katalysieren proteolytische Enzyme (Proteasen), indem die Isopeptidbindung zwischen zwei Aminosäuren unter Wasserverbrauch (Hydrolyse) gespalten wird. Wie schnell die Abspaltung katalysiert wird, gibt die Wechselzahl (WZ, engl. „turnover number“) der Protease in Spaltungen pro

Sekunde pro Enzym an. Die WZ der Proteasen variieren stark und reichen von 0,5 (Lysozym) bis >1.000.000 (Katalase).

Die Spaltungsreaktion verläuft über einen nucleophilen Angriff des katalytischen Zentrums der Protease auf das Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung. Anhand des katalytischen Zentrums lassen sich fünf Gruppen von Proteasen unterscheiden: die Serinproteasen (bspw. Proteasen des Komplements und pankreatische Enzyme), die Cysteinproteasen (bspw. lysosomale Enzyme), die Metalloproteinasen (bspw. Kollagenasen), die Aspartatproteinasen (bspw. Virus-Proteasen) und Threoninproteinasen (bspw. das Proteasom).

Aktiviert wird das katalytische Zentrum der Protease durch Proteinseitenketten, welche die notwendige biochemische Umgebung für die Hydrolyse schaffen. Sind für die Aktivierung auch Seitenketten des Substrats notwendig, kann die Protease nur Peptidbindungen spalten, die über diese Seitenketten verfügt. Die meisten Proteasen besitzen eine solche Schnittpräferenz. Beispiele für Proteasen mit spezieller Schnittpräferenz sind die Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin. Trypsin kann ausschließlich Peptidbindungen hydrolysieren, welche auf der Carboxylseite basische Aminosäurereste (vor allem Arginin oder Lysin) tragen. Chymotrpysin benötigt für die Aktivierung des katalytischen Zentrums aromatische- (Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin) oder sperrige, unpolare (Methionin) Seitenketten.

Die Zelle besitzt zwei proteolytische Systeme (Abb. 2.6) die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Das lysosomale System degradiert exogene Proteine, welche mittels Endocytose in die Zelle aufgenommen werden. Das System dient hauptsächlich der ungerichteten Zerkleinerung von Proteinen. Lysosomale Proteasen besitzen daher kaum Substratspezifität und sind in der Lage eine Vielzahl von Isopeptidbindungen zu hydrolysieren. Lysosomale Proteasen werden auch als „saure Hydrolasen" bezeichnet, da sie nur im sauren Milieu (pH 4.8-5.0) der Lysosomen aktiv sind (Knop et al., 1993). Der niedrige pH-Wert unterstüzt dabei nicht nur die Denaturierung aufgenommener Proteine, sondern schützt die Zelle auch vor einem unkontrollierten Selbstverdau, sollten die sauren Hydrolasen aus den Lysosomen in das Cytoplasma (pH 7.0-7.3) übertreten. Das zweite proteolytische System der Zelle ist das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS). Das UPS degradiert endogene Proteine, welche von der Zelle nicht benötigt und gezielt für die Degradation markiert werden. Das UPS arbeitet nicht in einem spezialisierten Kompartiment, sondern frei in der Zelle. Als Schutz vor unkontrollierter Proteolyse degradiert das UPS nur speziell zur Degradation markierte Proteine (detailliert in II.3 „Das Ubiquitin-Proteasomen-System beschrieben).

Lysosomen und UPS degradieren Proteine nicht immer vollständig zu Aminosäuren. Eine wichtige Aufgabe ist auch die Generation von Peptiden für die zelluläre Immunpräsentation (Abb. 2.6). Zu diesem Zweck werden die von den Proteasen erzeugten Proteinfragmente an

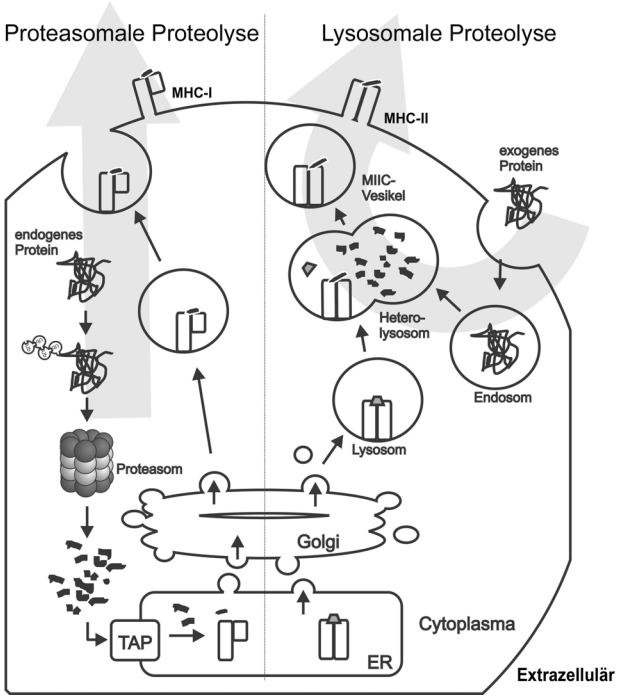


Abb. 2.6: Lysosomale und proteasomale Proteindegradation in der Immunpräsentation. *Linke Seite*: Proteasomale Prozessierung endogener Proteine. Proteine, die in der Zelle synthetisiert wurden, werden ubiquitinyliert und durch das Proteasom zu Peptiden degradiert. Die Peptide werden durch den TAP („transporter associated with antigenprocessing“) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Hier werden Klasse I-MHC-Moleküle (MHC-I) mit den Peptiden beladen und der Peptid-MHC-I- Komplex wird über das Golgi-Netzwerk in Vesikeln auf die Zelloberfläche transferiert. *Rechte Seite*: Lysosomale Prozessierung exogener Proteine. Proteine, die durch Endo- oder Pinocytose aufgenommen werden, liegen in einem endosomalen Vesikel in der Zelle vor. Klasse II-MHC-Moleküle (MHC-II) tragen ein Blockadepeptid in ihrer Bindungsfurche, sodass es nicht zur Beladung mit endogenen Peptiden im ER kommen kann. Die MHC-II werden im Golgi-Netzwerk mitsamt der lysosomalen Enzyme in Lysosomen verpackt und und fusionieren im Cytoplasma mit Endosomen zu Heterolysosomen. In Heterolysosomen degradieren die sauren Hydrolasen das exogene Protein und das Blockadepeptid, sodass das MHC-II Molekül mit einem Peptid beladen werden kann. Das beladene MHC-Molekül wird zur Peptidpräsentation auf die Zelloberfläche verbracht.

spezielle Proteinkomplexe (Haupthistokompatibilitätskomplexe, engl. „major histocompatibility complexes“, MHCs) gekoppelt und auf der Zelloberfläche den Zellen des Immunsystems präsentiert. Da das UPS Proteine degradiert, die von der zelleigenen Translationsmaschinerie erzeugt wurden, dienen die von ihr erzeugten Peptidsequenzen dem Immunsystem als Monitor für intrazelluläre Biosynthesevorgänge. Virusproduzierende oder mutierte Zellen können auf diese Weise vom Immunsystem erkannt werden. Die Proteingerüste, die endogene Proteine präsentieren, werden als Klasse I-MHC-Moleküle (MHC-I) bezeichnet und lassen sich auf allen Zellen finden.
Die Proteinkomplexe der Klasse II-MHC-Moleküle (MHC-II) präsentieren dagegen Peptide aus lysosomalen Degradationsprozessen. Sie stellen demnach ein Peptidspektrum des extrazellulären Milieus dar. MHC-II exisitieren nicht auf allen Zellen eines Organismus, sondern ausschließlich auf spezialisierten, phagocytierenden Zellen („antigen presenting cells“ Zellen, APCs).

II.3 Das Ubiquitin-Proteasomen-System

Für die Funktion einer Zelle ist die Regulation der Proteinaktivität, der Proteinkonzentration und der Proteinqualität eine existenzielle Leistung. Die Entdeckung eines substratspezifischen Proteolysesystems in der Zelle lieferte den entscheidenden Hinweis, die Proteindegradation als aktives Mittel der Proteinregulation zu

verstehen. Um ein spezielles Protein gezielt zu degradieren, muss ein proteolytisches System (1) zu degradierende Proteine gezielt markieren können und (2) gewährleisten, dass nicht-markierte Proteine in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden.

Das Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) besteht aus zwei Komponenten, die über jeweils eine der genannten Fähigkeiten verfügen: Die Ubiquitin-Komponente ist der Degradationsmarker. In der Zelle sorgt sie für die Markierung (Ubiquitinylierung) der Zielproteine. Die zweite Komponente bildet das Proteasom. Als Degradationsmaschine erkennt und hydrolysiert es die markierten Zielproteine. Beide Komponenten des UPS sind phylogenetisch alt und, mit geringen Variationen, in allen Organismen konserviert. Als zentraler Regulationsmechanismus in der Zelle spielt das UPS in praktisch allen zellulären Prozessen eine Rolle. Dass es sich bei Ubiquitin und dem Proteasomen um zwei Hauptkomponenten eines speziellen Proteolysemechanismus handelt, formulierten 1980 erstmalig A. Ciechanover, A. Hersko und I. Rose in ihrer Theorie zur regulierten ATP-abhängigen Proteolyse ubiquitinmarkierter Proteine (Hershko et al., 1980; Ciechanover et al., 1980). Hierfür erhielten sie 2004 den Nobelpreis für Chemie.

Das UPS reguliert wichtige zelluläre Prozesse wie Signaltransduktion (Jiang and Struhl, 1998; Joazeiro et al., 1999), Transkription (Hershko and Ciechanover, 1998; Palombella et al., 1994), Zellzyklusregulation (Glotzer et al., 1991; King et al., 1996), Immunpräsentation (Groettrup et al., 1996b; Gaczynska et al., 1993; Dick et al., 1996b) und Proteinqualitätskontrolle.

Ein Großteil der proteasomalen Degradationsprozesse findet im Rahmen der zellulären Proteinqualitätskontrolle statt. Da biologische Systeme häufig nicht fehlerfrei arbeiten, ist es wichtig, dass eine Zelle die Fähigkeit besitzt, nicht korrekt translatierte Proteine zu zerstören. Die Beobachtung, dass Zellen in der Lage sind, innerhalb einer Stunde nach Infektion virale Proteine mit eigentlich hoher Halbwertszeit auf der Zelloberfläche in MHC-I zu präsentieren (Esquivel et al., 1992), führte zu der Annahme, dass Proteasomen nicht ausschließlich Proteine degradieren, die nicht mehr benötigt werden Tatsächlich scheinen neusynthetisierte Proteine häufig falsch gefaltet oder aus anderen Gründen unbrauchbar zu sein. Diese so genannten fehlerhaften ribosomomalen Produkte („defective ribosomal products“, DRiPs) stellen 20% bis 30% (Schubert et al., 2000), teilweise sogar bis zu 75% (Yewdell et al., 1996) der gesamten Translation dar. Die rasche Degradation der DRiPs konnte mit Hilfe von spezifischen Proteasomeninhibitoren blockiert werden (Schubert et al., 2000). Ein äquivalentes System exsitiert auch für Proteine, die in das ER translatiert werden („ER-associated degradation“, ERAD) (Werner et al., 1996; McCracken and Brodsky, 2000).

Aufgrund der zentralen Stellung des UPS können Fehlfunktionen auch molekulare Grundlage für Erkrankungen sein. Besonders gut untersucht sind pathologische Zusammenhänge zwischen Störungen des UPS und der Tumorgenese: Das oncogene Potential von p53 ist unter anderem auf die Funktionen der Proteine MDM2 (Kubbutat et

al., 1997), E6-AP (Scheffner et al., 1990) und pVHL (Lisztwan et al., 1999) zurück zu führen. Diese Proteine sind E3-Ligasen und Teil der Ubiquitinylierungsmachinerie für p53. Eine direkte Interaktion besteht zwischen dem Oncogen Gankyrin und dem 26S Proteasomen, das in Patienten mit Hepatozellulärem Karzinom (hepatocelluar carcinoma) gefunden wird (Higashitsuji et al., 2000). Auch andere Erkrankungen, wie beispielsweise neurologische Fehlfunktionen (Kishino et al., 1997), virale Infektionen (Ferrell et al., 2000) und Autoimmunität (Chen et al., 2002), werden mit einer Störung in der Ubiquitinylierungsmaschinerie in Verbindung gebracht.

Die Bedeutung des UPS in der Generierung einer Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene zeigt sich auch darin, dass zahlreiche virale Proteine die Funktion des Proteasoms stören, um auf diese Weise die Präsentation ihrer Antigene zu verhindern. Für einige virale Proteine ist der Mechanismus, mit dessen Hilfe die proteasomale Proteolyse gestört wird, aufgeklärt: Das TAT Protein des humanen Immundefizienzvirus („human immundeficiency virus“, HIV) inhibiert zum Beispiel durch direkte Assoziation an den Regulatorkomplex PA28 die proteolytische Aktivität der Proteasomen (Viscidi et al., 1989; Seeger et al., 1997). Das Ebstein Barr nucleäre Antigen 1 (Ebstein Barr nuclear Antigen 1, EBNA1) besitzt eine Domäne („gly-ala-repeats“, GAR), welche die proteasomale Degradation blockiert und so effektiv die Präsentation auf MHC-I verhindert (Levitskaya et al., 1997).

II.3.1 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 8.6 kD, das ubiquitär und in nahezu identischer Aminosäuresequenz in allen eukaryontischen Zellen gefunden wird (Vijay-Kumar et al., 1987). Posttranslationell an Proteine substituiert dient es der Proteinregulation in der Zelle.
Drei Enzyme (E1, E2 und E3) arbeiten dabei sequenziell zusammen, um Ubiquitinmonomere Stück für Stück kovalent an das Zielprotein zu binden (Abb.2.7). Die Bindung verläuft über die endständige Aminosäure Glycin(G)-76 des Ubiquitins und einer α- oder ε-Aminogruppe eines Lysins (K) des Zielproteins (Breitschopf et al., 1998).

Die wichtigste und am besten untersuchte Funktion der Ubiquitinylierung ist die Markierung eines Proteins für die proteasomale Degradation. Hierbei werden mindestens vier Ubiquitinmonomere (Polyubiquitinylierung) über G76-K48 (Finley et al., 1994) bzw. G76-K27 (Koegl et al., 1999) aneinander geknüpft. Die Markierung von Proteinen mit Ubiquitin kann jedoch unterschiedliche regulatorische Funktionen haben. Die Polyubiquitinylierung eines Proteins über das K-63 scheint eine Bedeutung in der DNA-Reparatur zu haben (Spence et al., 1995). Das Anhängen eines einzelnen Ubiquitinrests (Mono-ubiquitinylierung) wurde als endocytotisches Signal beschrieben (Terrell et al., 1998).

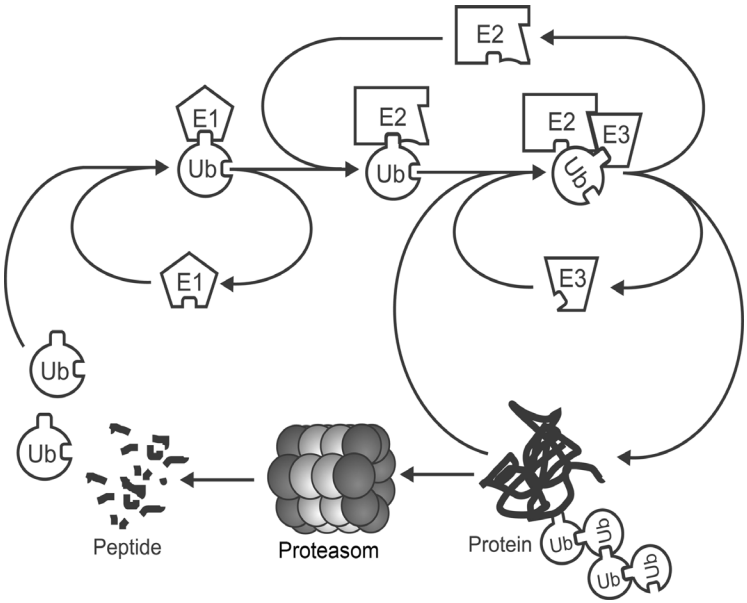


Abb. 2.7: Mechanismus der Proteinubiquitinylierung. Das C-terminale Glycin (G76) eines Ubiquitinmonomers wird unter ATP-Verbrauch an ein Cystein des ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 gebunden. Das aktivierte Ubiquitin wird in einem zweiten Schritt an ein ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Im Folgeschritt kommt es zur Interaktion zwischem dem E2 Enzym und einem Ubiquitin-Ligase-Enzym (E3) und zur Übertragung des Ubiquitins auf einen Lysinrest des Zielproteins (Monoubiquitinylierung). Um ein Protein für die proteasomale Degradation mit einem Ubiquitinschwanz zu markieren (Polyubiquitinylierung), muss der Kreislauf der Ubiquitinaktivierung und anschließenden –übertragung mehrfach durchlaufen werden. Untereinheiten des 19S Regulators des Proteasoms registrieren polyubiquitinylierte Proteine und leiten diese zur Degradation in das Innere des 20S Proteasoms, wobei die Ubiquitinmonomere frei werden und dem Ubiquitinsystem wieder zur Verfügung stehen.

Die pyramidenartige Hierarchie des Ubiquitin-Systems ermöglicht die spezifische Ubiquitinylierung individueller Proteine: Ein konserviertes E1 Enzym aktiviert biochemisch die Ubiqiutin-monomere und heterogene E2 und E3 Enzyme bilden substrat-

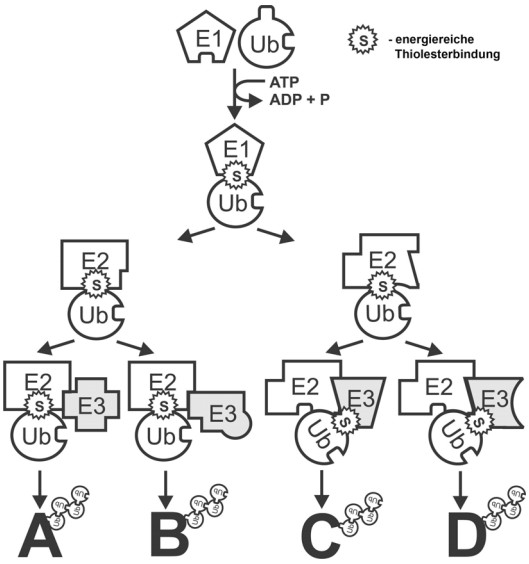


Abb. 2.8: Pyramidenartiger Aufbau der Ubiquitinylierungsmachinerie. Das Ubiquitinsystem besteht aus drei Komponenten, deren Zusammenspiel eine Variabilität schaffen, die nötig ist, um die Vielzahl der Proteine einer Zelle individuell markieren zu können. Während die Aktivierung des Ubiquitins immer von demselben Enzym (E1) durchgeführt wird, bilden Ubiqutin-konjugierende (E2) und Ubiquitin-ligierende (E3) Enzyme substratspezifische Komplexe, die nur ein spezielles Protein („A“, „B“, „C“ oder D“) ubiquitinylieren. Unter ATP-Verbrauch aktiviert das E1 Enzym einen Ubiquitinmonomer durch eine hochenergetische Thiolesterbindung. Das aktivierte Ubiquitin wird auf ein E2 Enzym übertragen, von denen es zwei Untergruppen gibt. Während „RING finger“ E2 Enzyme mit E3 Enzymen komplexieren, aber das Ubiquitin direkt vom E2 Enzym auf das Zielprotein übertragen wird, übertragen HECT E2 Enzyme über einen Zwischenschritt das aktivierte Ubiquitin erst auf ein E3 Enyzm, welches dann das Zielprotein ubiquitinyliert.

spezifische Ubiquitinylierungskomplexe (Abb. 2.8).

Nach der ATP-abhängigen Aktivierung des Ubiquitins durch ein E1 Enzym, transferiert das E1 das Ubiquitin zu einer Vielzahl an E2

Enzymen, welche mit einer noch größeren Anzahl an E3 Enyzmen interagieren. E2 und E3 Enyzme bilden gemeinsam den substratspezifischen Schritt im Ubiquitinylierungssystem.
Sowohl E2 als auch E3 Enzyme können an mehr als einer Proteinubiquitinylierung beteiligt sein (Hochstrasser, 1996) Ein Komplex aus einem spezifischen E2 und einem spezifischen E3 Enzym katalysiert jedoch immer nur die Ubiquitinylierung an einer spezifischen Stelle eines Proteins. Ubiquitin ist namengebend für eine Proteinfamilie, welche sich in ubiquitinähnliche Proteine („ubiquitin-like proteins“) und Proteinemit Ubiquitindomänen (ubiquitin-like domain proteins“) unterteilt (Pickart, 2001).

II.3.2 Proteasom

Wie das Ubiquitin-System ist das Proteasom stark konserviert. Der Aufbau des Proteasoms unterscheidet sich kaum zwischen *Archaebakterium thermoplasma* und *Homo sapiens*. Untereinheiten des Proteasoms sind nach phylogenetischen Studien über 700 Millionen Jahre alt und damit älter als die Trennung zwischen Archaebakterien und Eukaryonten (Hughes, 1997).

Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex mit modularem Aufbau (Abb. 2.9). Die zentrale Einheit („core particle“, CP) des Proteasoms ist ein hohler Zylinder, der sich aus 28 Untereinheiten zusammensetzt und etwa 700 kD schwer ist (Tanaka et al., 1986). Die charakteristische zylindrische Struktur bilden vier Ringe, wobei

die beiden inneren Ringe aus je 7 β-Untereinheiten und die äußeren Ringe aus je 7 α-Untereinheiten bestehen. So entsteht die typische α7-β7-β7-α7 Struktur des 20S Proteasoms (Kopp et al., 1993; Kopp et al., 1995).

Die Nomenklatur der Proteasomenuntereinheiten ist nicht standardisiert und unterscheidet sich in den untersuchten Spezies. In der vorliegenden Arbeit wird die von Baumeister et al. und Coux et al. vorgeschlagene systematische Nomenklatur für Proteasomenuntereinheiten verwendet (Baumeister et al., 1998; Coux et al., 1994). Eine Übersicht der Nomenklaturen ist im Anhang beigefügt (Anhang, VIII).

Während in Archaebakterien und Actinomyceten die α- und β-Einheiten untereinander identisch sind (Dahlmann et al., 1989; Cole et al., 1998), setzt sich das eukaryontische 20S Proteasom aus jeweils 7 unterschiedlichen Untereinheiten (α1-7 und β1-7) zusammen (Groll et al., 1997). Proteolytisch aktiv sind lediglich die β-Untereinheiten (in Eukaryonten nur drei der Untereinheiten: β1, β2 und β5), deren aktive Zentren in allen Organismen in den Hohlraum des Zylinders weisen („proteolytische Kammer"). Die proteolytischen Untereinheiten gehören zur Familie der N-terminalen nucleophilen Aminohydrolasen (NTN-Proteasen). Diese Proteasen katalysieren die Spaltung der Peptidbindung über ein aktiviertes Threonin, welches am N-terminalen Ende der Untereinheit lokalisiert ist (Brannigan et al., 1995; Chen and Hochstrasser, 1996). Die identischen β-Untereinheiten der Archaebakterien hydrolysieren vor allem Peptidbindungen hinter hydrophoben und sperrigen Amino-

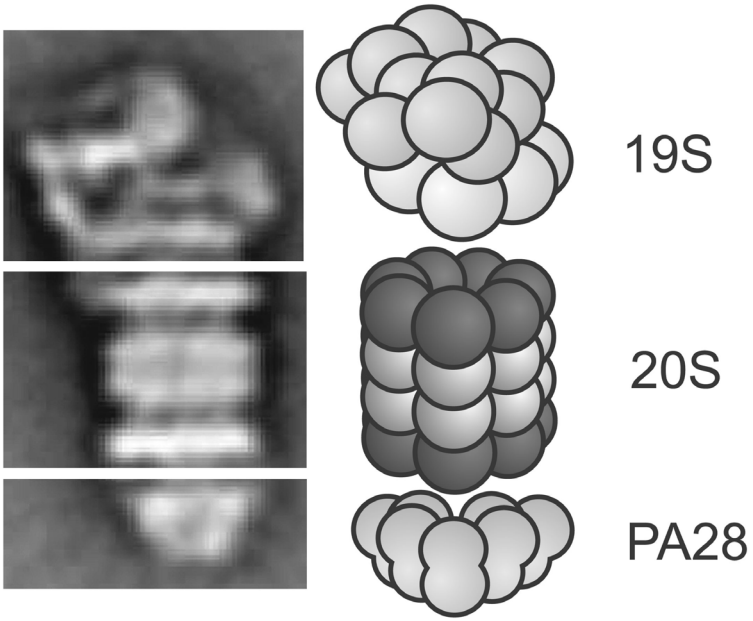


Abb. 2.9: Der modulare Aufbau des Proteasoms. Elektronenmikroskopisches Bild (links (Cascio et al., 2002)) und Modell (rechts) der drei Module des intrazellulären Proteasoms. Im Inneren des 20S Zylinders sitzen die aktiven Zentren der proteolytischen β-Untereinheiten. Der 19S Regulator besitzt ATPase-Aktivität und dient vermutlich dem Auffinden, Entfalten und Einführen ubiquitinylierter Proteine. Der PA28 Regulator wird durch Interferon-γ induziert, alterniert die Schnittmotive der 20S Einheit und dient vermutlich hauptsächlich der Produktion von Peptiden zur Immunpräsentation. Proteasomen, die wie hier dargestellt, je einen 19S und einen PA28 Regulator tragen, werden als Hybridproteasomen bezeichent. Ob diese Art der Proteasomen eine physiologische Bedeutung hat, ist bisher unklar. Proteasomen mit je zwei an die 20S Einheit angelagerten 19S Regulatoren werden als 26S Proteasomen bezeichnet und stellen die konstitutive Form der Proteasomen in der Zelle dar. Proteasomen mit je zwei PA28 Regulatoren werden aufgrund ihrer gesteigerten Fähigkeit, immunkompetente Peptide herzustellen, Immuno-proteasomen genannt.

säureresten. Da diese Schnittpräferenz der Schnittpräferenz der Protease Chymotrypsin gleicht, spricht man von der „chymo-

tryptischen“ Aktivität der NTN-Proteasen der Archaebakterien. Die drei aktiven β-Untereinheiten des eukaryontischen Proteasoms tragen leicht unterschiedliche NTN-Proteasen. Das eukaryontische Proteasom besitzt daher auch mehr als eine Schnittpräfarenz. Neben der chymotryptischen Aktivität, werden zusätzliche Isopeptidbindungen hinter basischen (tryptische Aktivität) und sauren („peptidylglutamyl peptide hydrolizing“, PGPH-Aktivität) Aminosäureresten (Arendt and Hochstrasser, 1997) gespalten. Weiterhin sind Proteolyseaktivitäten hinter verzweigten Aminosäuren („branched chain amino acid preferring“, BrAAP) und kleinen, neutralen Aminosäuren („small neutral amino acid preferring“, SNAAP) beschrieben worden (Orlowski et al., 1993). Da sich die Untereinheiten im zusammengesetzten 20S Proteasomen gegenseitig biochemisch beeinflussen, können die proteolytischen Aktivitäten des eukaryontischen Proteasoms nicht direkt einer speziellen β-Untereinheit zugeordnet werden (Kisselev et al., 1999; Kisselev et al., 2002; Kisselev et al., 2003). Geschwindigkeits-bestimmend für die Proteolyse eines Proteins ist die chymotryptische Aktivität des Proteasoms (Rock et al., 1994).

Die fassartige Struktur des 20S Proteasoms erzeugt im Hohlraum des Proteasoms ein eigenes, abgeschlossenes Kompartiment, welches zwei wichtige Funktionen erfüllt: (1) Da die aktiven Zentren im Inneren des Proteasoms liegen, sind Proteine, die nicht durch die schmalen Öffnungen an Ober- und Unterseite in die proteolytische Kammer gelangen, vor fälschlicher Proteolyse geschützt. (2) Einmal in das Innere translozierte Proteine werden effizient hydrolysiert, da

der mit Proteasen besetzte Hohlraum eine starke Wechselwirkung zwischen den Enyzmen und dem Substrat garantiert. Das 20S Proteasom trägt die proteolytische Aktivität, weist jedoch keine Substratspezifität auf. Alle Peptide und Proteine, welche in das Innere des Zylinders vordringen, werden hydrolysiert. Die Öffnungen zur proteolytischen Kammer kontrolliert die Zelle über Regulatoreinheiten („regulatory particles“, RPs), die sich an die äußeren α-Ringe des 20S Proteasoms anlagern. Die Regulatoreinheiten 19S und PA28 sind verantwortlich für die Substratspezifität, nehmen aber auch Einfluss auf die proteolytische Qualität (Schnittpräferenz) und proteolytische Quantität (Umsatzrate) des Proteasoms.

Der 19S (oder PA700) Regulator setzt sich aus circa 17 Untereinheiten zusammen und ist etwa 700 kD schwer (Chu-Ping et al., 1994). Er kann sich ATP-abhängig an die α-Ringe des 20S Kernstücks anlagern und erhöht die Effektivität der Ubiquitin-unabhängigen Proteinhydrolyse (Glickman et al., 1998). Der 19S Regulator besteht aus einer Deckel- („lid“) und einer Basis- („base“) Einheit und scheint für das Auffinden polyubiquitinylierter Proteine (Deveraux et al., 1994; Driscoll and Goldberg, 1990) sowie für die ATP-abhängige Entfaltung und Einführung der Proteine in die proteolytische Kammer (Ogura and Wilkinson, 2001; Glickman et al., 1998) verantwortlich zu sein. Der Komplex aus zwei 19S Regulatoren, die sich jeweils an die α-Ringe einer 20S Kerneinheit angelagert haben, wird als 26S Proteasom bezeichnet. Dem 19S

Regulator wird außerdem eine Rolle in der Elongation der RNA Polymerase II zugeschrieben (Ferdous et al., 2001).

Der PA28 (oder 11S) Regulator besteht aus zwei Untereinheiten (PA28α und PA28β), die sich zu einer circa 200 kD schweren Ringstruktur zusammensetzen. Ungeklärt ist bisher, ob es sich bei dem PA28 Regulator um ein Heterohexamer (α3β3) (Kopp et al., 2001; Ahn et al., 1996; Song et al., 1996) oder ein Heteroheptamer (α3β4) (Zhang et al., 1999) handelt. Der PA28 Komplex stimuliert die Aktivität aller proteolytischen β-Untereinheiten des 20S Proteasoms (Ma et al., 1992; Dubiel et al., 1992) *in vitro*, wobei der Gesamtproteinumsatz *in vivo* unverändert bleibt (Groettrup et al., 1996a; van et al., 2000). Im Gegensatz zum 19S Regulator erfolgt eine Anlagerung des PA28 Regulators an die 20S Kerneinheit ohne ATP-Verbrauch (Kania et al., 1996). Der PA28 Regulator ist einer der Bestandteile des Proteasoms, der sich durch das immunmodulatorische Cytokin Interferon-γ (INF-γ) induzieren lässt (Rechsteiner et al., 2000; Stohwasser et al., 2000).

1994 wurde erstmalig gezeigt, dass die Aktivtät des Proteasoms durch das Cytokin INF-γ modifziert werden kann (Akiyama et al., 1994; Boes et al., 1994): unter INF-γ-Einfluss werden die drei katalytischen Untereinheiten β1, β2 und β5 durch drei homologe Untereinheiten, β1i, β2i und β5i („i“ für induzierbar) ersetzt. Wie die konstitutiven β-Untereinheiten sind auch die induzierbaren, proteolytischen Untereinheiten NTN-Hydrolasen, jedoch entsprechen ihre Schnittpräferenzen und damit auch die erzeugten Peptide nicht genau denen der homologen Einheiten, die sie ersetzen.

Für 20S Proteasomen mit eingebauten, induzierbaren Untereinheiten schlugen Tanaka und Kollegen 1994 den Namen „Immunoproteasom“ vor, welcher die gesteigerte Fähigkeit beschreibt, Peptide für die Präsentation auf MHC-I zu generieren (Akiyama et al., 1994).

Der modulare Aufbau und die Induzierbarkeit verschiedener Untereinheiten ermöglichen eine Vielzahl verschiedener Proteinkonformationen der Proteasomen. Man geht davon aus, dass sowohl Zelltyp (Kumatori et al., 1990), Zellzyklus (Palmer et al., 1994), Kompartiment (Palmer et al., 1996; Brooks et al., 2000) als auch der inflammatorische Status Einfluss auf die Zusammensetzung der Proteasomen einer Zelle haben. Ein 20S Proteasom mit zwei angelagerten 19S Regulatoren (19S-20S-19S) stellt die konstitutive Konformation des Proteasoms („house keeping proteasome“) in der Zelle dar und wird auch als 26S Proteasom bezeichnet. Neuere Arbeiten legen nahe, dass die 19S-20S-PA28 Konfiguration (Abb. 2.7), das sogenannte Hybridproteasom, ebenfalls eine physiologisch aktive Konformation in der Zelle ist (Hendil et al., 1998; Cascio et al., 2002; Kopp et al., 2001; Tanahashi et al., 2000). Eine *in vitro* Rekonstitution von isolierten 26S Proteasomen und PA28 Regulatoren konnte zeigen, dass die Proteasomenuntereinheiten und Regulatoren sich in einem selbst organisierten Prozess aneinanderlagern (Cascio et al., 2002). Eine Analyse der Proteasomenzusammensetzung ergab, dass alle statistisch möglichen Kombinationen auffindbar waren. Mit 32% bzw. 31% am häufigsten

waren die 19S-20S und die 19S-20S-19S Konformationen. 10% aller Proteasomen lagen in der 19S-20S-PA28 Konfiguration vor. Selten dagegen waren die Konfigurationen 20S-PA28 (2,5%) und PA28-20S-PA28 (1,5%).

II.3.3 Lokalisation von Proteasomen

Die absolute Konzentration an Proteasomen ist gewebespezifisch. Die 20S Proteasomen machen zwischen 0.01% (humane Lymphocyten (Hoffman and Rechsteiner, 1996)) und 3% (Rattenthymus (Kuehn et al., 1991)) des Gesamtproteins einer Zelle aus. In der humanen Epithelzelllinie HeLa konnten 0.6% des Gesamtproteins als 20S Proteasom identifziert werden (Hendil, 1988). Proliferierende und transformierte Zellen verfügen über eine höhere Proteasomenkonzentration als ruhende und nicht-transformierte Zellen (Machiels et al., 1995).

In eukaryontischen Zellen findet man das 20S Proteasom sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleoplasma (Tanaka et al., 1989). Allerdings sind die Proteasomen nicht gleichmäßig (homogen) über die beiden Kompartimente verteilt. Das Verhältnis von cytoplasmatischen zu nucleoplasmatischen Proteasomen ist abhängig sowohl vom Zelltyp (Rivett et al., 1992) als auch vom Zellzyklus. Proliferierende Zellen besitzen einen höheren Anteil an nucleoplasmatischen Proteasomen als Zellen im Ruhezustand (Machiels et al., 1995). Die Verteilungsmuster der Proteasomen in der Zelle wurden mit Hilfe von indirekten Immun-

fluoreszenzfärbungen in fixierten Interphasezellen untersucht und sind in allen Zelltypen ähnlich: Man findet eine homogene Distribution der Proteasomen im Cytoplasma, sowie eine stärkere, ungleichmäßigere (hetereogenere) Distribution im Nucleoplasma. Die Nucleolen und der Bereich unmittelbar an der Kernhülle sind proteasomenfrei (Grossi de Sa et al., 1988; Kamakura et al., 1988; Kloetzel et al., 1987; Knecht et al., 1991; Kumatori et al., 1990). Die Distribution der Proteasomen in fixierten Zellen wurde später auch in lebenden Zellen bestätigt, die mit einem Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein („green fluorescent protein“, GFP) und der Proteasomenuntereinheit β1i (LMP2) transfiziert worden waren (Reits et al., 1997).

Die Verteilung der cytoplasmatischen Proteasomen wird allgemein als homogen beschrieben, wobei vakuoläre Strukturen ausgespart sind.

Der größte Teil der cytoplasmatischen Proteasomen diffundiert frei im Zellkörper, während ein geringerer Anteil mit Komponenten des Cytoskeletts zellzyklusabhängig assoziiert zu sein scheint. Gefunden wurden Interaktionen mit intermediären Filamenten (Olink-Coux et al., 1994), Cytokeratinfilamenten (Palmer et al., 1994), Aktinfilamenten (Arcangeletti et al., 1997) und Aktin-Myosin-Komplexen (Ryabova et al., 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass cytoplasmatische Proteasomen zu einem geringen Grad mit dem glatten ER assoziiert sind und sich auf der cytoplasmatischen Seite des ERs befinden (Rivett et al., 1992; Palmer et al., 1996; Beyette and Mykles, 1992).

II.3.4 Nucleoplasmatische Proteasomen

Obwohl die ersten Berichte über eine nucleäre Lokalisation der Proteasomen bereits Anfang der 1980er Jahre veröffentlicht wurden (Hugle et al., 1983), konzentrierte sich die wissenschaftliche Forschung bisher vor allem auf die cytoplasmatische Proteolyse und die Prozessierung von Antigenen. So ist über die funktionelle Organisation und die Funktion nucleolärer Proteasomen wenig bekannt. Der folgende Abschnitt fasst den bisherigen Stand der Forschung zu nucleären Proteasomen zusammen.

Inwiefern sich nucleäre Proteasomen von ihren cytoplasmatischen Verwandten unterscheiden, ist bisher nur wenig erforscht. Bekannt ist, dass einige 20S Untereinheiten Kern-Lokalisation-Signale („nuclear localization signals“, NLSs) besitzen, die eine Translokation durch die Kernporenkomplexe in den Nucleus ermöglichen. Auch Ansammlungen von positiven und negativen Ladungen sowie Tyrosinphosphorylierungen könnten eine Rolle im nucleo-cytoplasmatischen Verkehr spielen (Tanaka et al., 1990; Wang et al., 1997). Ob komplette nucleoläre Proteasomen in den Nucleus translozieren oder aber einzelne Untereinheiten einwandern und erst im Nucleus zu Proteasomen zusammengesetzt werden, ist unklar. Untersuchungen in Hefezellen geben Hinweise darauf, dass Proteasomen eventuell als Vorläuferkomplexe in den Kern transportiert werden (Lehmann et al., 2002).

Lokalisation der nucleären Proteasomen im Zellzyklus

Zur zellzyklusabhängigen Veränderung der Distribution nucleärer Proteasomen exisitieren unterschiedliche Beobachtungen. In fixierten epithelialen Zelllinien wie HeLa- und PtK2-Zellen konnten keine Anreicherungen von Proteasomen im Nucleoplasma während des Zellzyklus festgestellt werden (Palmer et al., 1994). In lebenden humanen Fibrosarkomazellen (HT1080) beobachten dagegen Reits und Kollegen einen unidirektionalen Transport eines GFP-β1i-Fusionsproteins in den Nucleus (Reits et al., 1997). Ausgehend von diesen Beobachtungen formulierte dieselbe Forschergruppe eine Theorie, nach welcher der gerichtete Transport von 20S Proteasomen in den Kern zu einer ansteigenden Konzentration im Nucleus führt. Die Auflösung der Kernmembran während der mitotischen Teilung sorgt dann für eine Equilibration der Proteasomen, woraufhin eine neue Konzentrationszunahme beginnt, sobald die Kernmembran wieder aufgebaut ist (Reits et al., 1997). Die Theorie des unidirektionalen Transports der Proteasomen erklärt jedoch nicht, wie post-mitotische oder seneszente Zellen eine Equilibration der zellulären Proteasomen erreichen. Um eine stetige Akkumulation von Proteasomen im Nucleus zu verhindern, muss eine nicht-proliferierende Zelle über bidirektionale Transportwege verfügen. Beschrieben ist ein solcher Export von Proteasomen aus dem Nucleus in das Cytoplasma in apoptotischen Zellen. Die Autoren konnten zeigen, dass nucleäre Proteasomen in apoptotischen Blebs akkumulieren (Pitzer et al., 1996).

Nucleäre Proteasomen und subnucleäre Strukturen

Während des Zellzyklus der humanen Epithelzelllinie HeLa scheinen Proteasomen in steigendem Maß mit der nucleären Matrix zu assoziieren (Wojcik et al., 1995).

Einige Arbeiten berichten über Assoziationen zwischen nucleoplasmatischen Proteasomen und den subnucleären Domänen der PML-Kernkörperchen in den Epithelzelllinien HeLa und HEp2 (Fabunmi et al., 2001), in murinen Embryofibroblasten (Lallemand-Breitenbach et al., 2001) oder humanen Brustkarzinomazellen (MCF-7) (Mattsson et al., 2001). Kolokalisationen zwischen nucleären Proteasomen und PML-Kernkörperchen konnten auch in eigenen Arbeiten bestätigt werden (Rockel and von Mikecz, 2002). Weiterhin sind Kolokalisationen nucleärer Proteasomen mit Proteinen der Interchromatin Granulären Cluster, wie deren Signaturprotein SC35, mit Histonproteinen sowie mit Proteinen des Spleißosoms U1-70k und sm B/B' beschrieben (Rockel and von Mikecz, 2002; Chen et al., 2002). Andere nucleäre Proteine wie Topoisomerase Iα und Centromerproteine sowie die nucleolären Proteine Fibrillarin und „Upstream Binding Factor" (UBF) zeigen dagegen keine Kolokalisation (Rockel and von Mikecz, 2002). Eine massenspektroskopische Proteom-Analyse in der humanen Epithelzelllinie HeLa detektierte ebenfalls keine Proteasomen in den Nucleolen (Andersen et al., 2002). Einige Veröffentlichungen berichten von Assoziationen nucleärer Proteasomen mit der Peripherie des Heterochromatins und den Nucleolen (Rivett et al., 1992; De et al., 2000). Während Proteasomen im Allgemeinen nicht

in Nucleolen vorkommen, berichten zwei Arbeiten von induzierter nucleolärer Lokalisation von Proteasomen durch Proteasom-inhibition (Mattsson et al., 2001) oder bei Überexpression des Onkogens c-Myc (Arabi et al., 2003).

II.3.5 Proteasominhibitoren

Während Fragen zur Struktur des Ubiquitin-Proteasomen-Systems maßgeblich in *in vitro* Experimenten untersucht wurden, konnte erst mit dem Aufkommen spezifischer Inhibitoren die Funktion proteasomaler Proteolyse *in vivo* analysiert werden.

Proteasominhibitoren sind aufgrund ihrer Wirkungsmechanismen in vier Gruppen gegliedert: Die Peptidaldehyde wurden zuerst entdeckt. Sie stellen Peptidanaloga dar, die die Übergangszustände zwischen aktivem Zentrum und Substrat stören („transition state inhibitors“) (Lee and Goldberg, 1996) können. Beispiele hierfür sind MG-132 und ALLN, zwei häufig verwendete proteasomale Inhibitoren. Die Inhibition solcher Peptidaldehyde ist reversibel, und kann durch Auswaschen des Inhibitors aufgehoben werden. Ein Nachteil der Peptidaldehyde ist die nicht eindeutige Spezifität für das Proteasom. Es ist bekannt, dass die Peptidaldehyde auch lysosomale Cystein-Proteasen (Cathepsine) und Calpaine in ihrer Funktion hemmen (Rock et al., 1994).

Eine andere Wirkungsweise besitzt Lactacystin und dessen aktives Derivat *clasto*-Lactacystin β-Lacton (Dick et al., 1996a). Die ursprünglich aus Aktinomyceten (Fenteany et al., 1994) gewonnene

Substanz ist ein sogenanntes Pseudosubstrat, welches kovalent an die Hydroxylgruppen der aktiven Threoninreste der β-Untereinheiten des 20S Proteasoms bindet. Durch die kovalente Bindung ist die Inhibition mittels Lactacystin irreversibel. Lactacystin zeichnet sich zudem durch eine hohe Spezifität aus.
Eine weitere Gruppe von Proteasominhibitoren sind Peptide, die carboxyterminal ein Vinyl-Sulfon-Motiv tragen. Ähnlich dem Lactacystin binden sie mittels dieses Motivs an die aktiven Threoninreste der β-Untereinheiten (Bogyo et al., 1997).
Die neueste Gruppe an Inhibitoren zeichnet sich durch eine besonders hohe Bindungsaffinität und Sensitivität aus. Es handelt sich um peptid- und peptidomimetische Sequenzen (synthetische Peptidderivate), die einen Boronatsubstituenten tragen, der reversibel an die aktiven β-Untereinheiten binden kann (Adams et al., 1998).

II.3.6 Proteasomale Proteolyse

Ob Proteasomen überall aktiv sind oder ob spezielle Lokalisationen proteolytischer Aktivität (‚Hotspots') exsistieren, ist bisher umstritten. Dass nach Proteasominhibiton definierte Aggregate zu finden sind, welche sowohl Proteasomen als auch ubiquitinylierte Proteine enthalten, scheint für eine intrazelluläre Stuktur proteasomaler Degradation zu sprechen. Diese Strukturen enthalten ubiquitinylierte Proteine und Proteasomen (Fabunmi et al., 2000) und sind von Vimentin umgeben (Johnston et al., 1998).

Die Funktion der Aggregate ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Während das Sequestosomen-Modell die Aggregate als Lagerstätte für andernorts zu degradierende Proteine sieht (Shin, 1998), geht das Aggresomen-Modell davon aus, dass es sich bei den Akkumulationen auch gleichzeitig um den Ort der Proteolyse handelt (Wojcik, 1997b; Wojcik, 1997a).

Ebenfalls offen ist die Frage, ob es sich bei der Akkumulation von zu degradierendem Material um eine Schutzfunktion der Zelle vor fehlerhaften Proteinen (Kopito, 2000) oder aber um einen pathologischen Prozess (Sathasivam et al., 2001) handelt. Da diese Aggregate sowohl durch Inhibition der proteolytischen Aktivität des Proteasoms als auch durch Überexpression exogener Proteine induziert werden können, ist es wahrscheinlich, dass die Störung des proteolytischen Gleichgewichts die Ursache der Aggregatformation ist (Johnston et al., 1998). Proteinaggregate können außerdem durch inflammatorische Cytokine induziert warden. In HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem proinflammatorischen Faktor INFγ zu kleinen monospezifischen Aggregaten des „Leucin Zipper Proteins“ IFP35 führt (Meyerdierks et al., 1999). Inflammatorische Stimulation kann auch in Dendritischen Zellen zu einer vorübergehenden Akkumulation („dendritic cell aggresome-like induced structure“, DALIS) von ubiquitinylierten Proteinen führen. (Lelouard et al., 2002).

Proteolyse und Proteasomen im Nucleus

Die Exsistenz und das Ausmaß proteolytischer Prozesse im Nucleus ist zur Zeit unklar. Während die Lokalisation der Proteasomen im Nucleoplasma unbestritten ist, weiß man nur wenig über andere Proteasen in diesem Zellkompartiment. Zwei kürzlich veröffentlichte Arbeiten berichten von nucleären Lokalisationen der Sentril/SUMO-spezifischen Protease (SENP2) (Hang and Dasso, 2002) und der lysosomalen Protease Cathepsin L (Goulet et al., 2004), wobei es sich jedoch in beiden Fällen um Analysen ektopischer (transfizierter) Proteine handelt.

Eine der ersten Arbeiten über eine mögliche nucleoplasmatische Proteolyse stammt aus den 1990er Jahren. Die Autoren untersuchten Affennierenfibroblasten, in welchen bakterielle β-Galaktosidase (β-Gal) zur Expression gebracht wurde. Das nucleoplasmatische Protein zeigt eine deutlich reduzierte Halbwertszeit, wenn es in einer nicht-funktionalen (mutierten) Form in die Zellen transfiziert wurde. Eine cytoplasmatische β-Gal-Variante ohne Kernlokalisationssequenz (NLS) dagegen war in der Zelle stabil. Die Arbeit kann allerdings nicht ausschließen, dass nucleoplasmatisches β-Gal zur Degradation ins Cytoplasma transportiert wurde (Tsuneoka and Mekada, 1992). Ähnliche Exportprozesse zur proteasomalen Degradation werden bisher für die Transkriptionsfaktoren p53 (Vousden and Woude, 2000; Zhang and Xiong, 2001; Freedman and Levine, 1998), den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) (Davarinos and Pollenz, 1999), den Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB IκB (Rodriguez et al.,

1999), das Cyclin D1 (Diehl et al., 1998) und den Cyclin-abhängigen-Kinase Inhibitor (p27Kip1) (Tomoda et al., 1999) angenommen.

Neuere Experimente mit Hilfe von Leptomycin B, einem Inhibitor des nucleären Exports, weisen jedoch auf eine nucleäre Degradation von p53 (Shirangi et al., 2002) und dem Transkriptionsfaktor myoD (Floyd et al., 2001) hin.

Ob der Nucleus dabei eine proteolytische Substruktur besitzt ist unklar, doch lassen einige Beobachtungen proteolytische Zentren vermuten: Centrosomähnliche Strukturen entdeckten Salomni und Kollegen am PML-Kernkörperchen im Nucleus (Salomoni and Pandolfi, 2002). Eine INFγ-abhängige Assoziation zwischen PA28 Regulatoren, Immunoproteasomen und PML Kernkörperchen wurde in den humanen Zelllinien HeLa und HEp-2 gefunden (Fabunmi et al., 2001). Bei Proteasominhibition akkumulieren in humanen Osterosarkomzellen proteasomale Antigene und falsch gefaltete Proteine an den PML-Kernkörperchen und an den Centrosomen (Anton et al., 1999). Andere Gruppen berichten von aggresomenähnlichen Akkumulationen im Nucleus, welche durch INFγ induziert werden können (‚Clastosomen', (Lafarga et al., 2002)).

III Wissenschaftliche Fragestellung

Es ist wissenschaftlich anerkannt, dass Proteasomen nicht nur im Cytoplasma, sondern auch im Nucleoplasma vorhanden sind. Unbeantwortet ist dabei allerdings, ob es sich bei den nucleären Proteasomen um physiologisch aktive Komplexe handelt und ob es innerhalb des Nucleus zur proteasomalen Proteolyse kommt.
Die Charakterisierung der nucleoplasmatischen Subpopulation der Proteasomen ist das Thema dieser Dissertation.

Dabei werden im Besonderen zwei Aspekte detailliert untersucht:

(1) Besitzen nucleoplasmatische Proteasomen proteolytische Aktivität *in vitro* und *in vivo*?
(2) Lassen sich Orte proteasomalen Proteinabbaus im Nucleus lokalisieren?

Die zentrale Fragestellung lautet: Ist das Nucleoplasma ein zelluläres Kompartiment mit aktiver proteasomaler Proteolyse oder handelt es sich lediglich um einen Lagerungsort inaktiver Proteasomen oder Proteasomenvorstufen?

IV Material und Methoden

IV.1 Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien waren alle vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und stammten von den Firmen SIGMA (Taufkirchen), ROTH (Karlsruhe), Fluka (Bruchs, CH) und Merck (Darmstadt). Das verwendete Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) gereinigt. Für sterile Anwendungen (bspw. Zellkultur) wurden die Lösungen entweder 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert oder sterilfiltriert.

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

Acrylamid Stammlösung (ApliChem)
30% Acrylamid 40 K (*ApliChem*)
RT

Ammoniumpersulphat Stocklösung (APS)
0,1 g Ammoniumpersulphat
1,0 ml H_2O
-20° C

Bradford Protein Assay für Mikrotiterplatten
1 Teil Bradford Reagenz + 4 Teile Wasser
filtrieren
BSA Standard: 500, 250, 125, 62.5 [µg/ml]
20 µl Proteinlysat + 100 µl Färbelösung
Photometrische Messung bei 595 nm

Fötales Kälberserum (FCS)
Fötales Kälberserum mit Fetal Bovine Serum low in Endotoxine (Sigma)
0,5 h bei 65°C inaktiviert

Komplementserum (SC)
0,2 M Glutamin
$1x10^5$ U Penicillin
100 mg Streptomycin
nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
0,1 M Pyruvat

Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese(1l)
3,0 g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Trizma Base)
14,4 g Glycin
1,0 g Natriumlaurylsulfat (SDS)
RT

PBS
137 mM NaCl
2,7 mM KCl
65 mM $Na_2HPO_4x2H_2O$
15 mM KH_2PO_4
pH 7,2

PBS Tween
PBS + 0,5% (v/v) Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)
(*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

Ponceau S
2,5 g Ponceau S
5 ml 9% Essigsäure
500 ml H_2O

Proteintransferpuffer
3,0 g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Trizma Base)
14,4 g Glycin
200 ml Ethanol
650 ml H_2O

Sammelpuffer (1l)
30,3 g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Trizma Base)
2,0 Natriumlaurylsulfat (SDS)

pH 6,8
RT

Sammelgel (4%)
1,8 ml Acrylamid Stocklösung
5,0 ml Trennungspuffer
4,0 ml H_2O
100 µl Ammoniumpersulphat Stammlösung (APS)
10 µl N, N, N, N-Tetramethylthylendiamin (TEMED)

SDS Ladepuffer
50 mM Tris/HCl
100 mM DDT
2% Natriumlaurylsulfat (SDS)
0,1% Bromphenol
10% Glycerin
-20° C

Trenngel (12%)
7,5 ml Acrylamid Stocklösung
9,0 ml Trenngelpuffer
2,0 ml H_2O
180 µl Ammoniumpersulphat Stammlösung (APS)
18 µl N, N, N, N-Tetramethylthylendiamin (TEMED)

Trenngelpuffer (1l)
90,8 g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Trizma Base)
2,0 g Natriumlaurylsulfat (SDS)
pH 8,8
RT

Trypanblaulösung
0,5% (w/v) Trypanblau
0,9% (w/v) NaCl
in H_2O

Zellkulturmedium
RPMI 1640 für HEp2- und HaCaT-Zellen
+ 10% (v/v) Fötales Kälberserum

+ 5% (v/v) Serumkomplement

Minimales essentielles Medium (MEM) für KB-, L929- und HPF-Zellen
+10% /v/v) Fötales Kälberserum
+ 5% (v/v) Serumkomplement

IV.2 Zellkultur

Humane epitheliale HEp2-Zellen, peridermoide KB Zellen und murine L929 Fibroblasten wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, US) bezogen. Primäre dermale Fibroblasten (HPF) wurden aus humaner Vorhaut wie in Berneburg et. al (Berneburg et al., 1999) beschrieben isoliert. Humane Keratinocyten (HaCaT) wurden von Petra Boukamp (Boukamp et al., 1988) bezogen.

Die Zellen wurden in den jeweiligen Medien bis auf 80% Konfluenz kultiviert und mittels Trypsin geerntet. Die Lebendzellzahl der Zellen wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Für die Proteasominhibitionsstudien wurden die Zellen mit 1 bis 10 µM Lactacystin (Alexis Biochemicals/ Axxora Grünberg, Deutschland) bzw. 5 bis 20 µM MG-132 (Merck Bioscience, Darmstadt, Deutschland) für bis zu 4 h behandelt. Lactacystin ist wasserlöslich und wurde in einer Stockkonzentration von 1 mM bei -20°C gelagert. MG-132 wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Stockkonzentration von 10 mM bei -20°C gelagert.

IV.3 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, über zwei Tage bis auf 80% Konfluenz kultiviert und durch Inkubation bei -20°C mit Methanol (7 min.) und Acteon (3 min.) fixiert. Für die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern aus der Maus (mmA) oder polyklonalen Antikörpern aus dem Kaninchen (kpA) oder Menschen (hpA) gefärbt.

ID	Spezifität	Klonalität	Quelle
PW8155	α- und β-Unter-einheiten des 20S Proteasoms	kpA	Affiniti/ BioTrend, Köln, D
PW8195	α-Untereinheiten des 20S Proteasoms	mmA	Affiniti/ BioTrend, Köln, D
Tub 2.1	β-Tubulin	mmA	Sigma-Aldrich, München, D
αSC35	SC35	mmA	(Fu and Maniatis, 1990)
72B9	Fibrillarin	mmA	(Reimer et al., 1987),
2.73	U1-70k	mmA	(Degen et al., 2000)
Y12	SmB/B	mmA	(Degen et al., 2000)
9A9	U1A/U2B	mmA	(Degen et al., 2000)

PC-M3	PML	mmA	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
636	Lamin A/C	mmA	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
P4D1	Ubiquitin	mmA	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
mara3	RNA Polyermase II	mmA	(Patturajan et al., 1998) als Geschenk von Bart Sefton, Salk Institute, La Jolla, CA, US).

Als Sekundärantikörper wurden Ziege-Anti-Maus-, -Anti-Human- und -Anti-Kaninchenkonjugate mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), Rhodamin (Rhod) oder Carbocyanin5 (CY5) (Jackson ImmunoResearch Laboratories/ Dianova, Hamburg, D) in der Verdünnung 1:100 eingesetzt.

IV.4 Zellfraktionierung

Die Präparation der cytoplasmatischen, nucleären und nucleolären Zellfraktionen aus HEp-2 Zellen erfolgte nach einer Methoden von Harris Busch und Kollegen (Rothblum et al., 1977) mit den folgenden Aufreinigungschritten: Aliquots (1 ml) mit Hep2-Zellen

wurden in PBS gewaschen und in 4 ml RSB-8 Puffer (0,01 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl, 8 mM MgAc, pH 7,4) resuspendiert und für 30 min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 1000 x g für 8 min. bei 4°C zentrifugiert und in RSB-NP40 Puffer (0,01 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl, 1,5 mM MgAc, pH 7,2, + 0,5% NP40) resuspendiert und mittels eines Homogenisators aufgebrochen. Die Suspension wurde bei 800 x g für 8 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als cytoplasmatische Fraktion eingesetzt, während das nucleäre Pellet in 1 ml 0,88 M Sukrose, 5 mM MgAc resuspendiert wurde. Die Suspension wurde mittels eines Phasenkontrastmikroskops auf eventuell nicht aufgeschlossene Zellen überprüft und anschließend bei 2500 x g für 20 min. bei 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml 0,34 M Sukcrose, 0,5 mM MgAc resuspendiert und mit einem „Microtip Probe Sonicator (Labsonic U, B. Braun Medical, Bethlehem, PA) 10 x 0,5 s (Energieniveau „Low“) sonifiziert. Die sonifizierte Probe wurde über 3 ml 0,88 M Sukrose geschichtet und bei 3000 x g für 20 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als nucleoplasmatische Fraktion eingesetzt, während das Pellet die nucleoläre Fraktion enthielt. Um die Reinheit der Proben zu kontrollieren, wurden die Fraktionen mittels Immunblot auf das Vorkommen von Markerproteinen der subzelluären Kompartimente hin überprüft. Als Signaturproteine dienten β-Tubulin für das Cytoplasma, Lamine A/C für die Kernhülle, SC35 für das Nucleoplasma und Fibrillarin für die Nucleolen.

Die Präparation der Kernhüllenfraktion erfolgte nach einem Protokoll von Gerace und Blobel (Gerace and Blobel, 1982) mit folgenden Aufreinigungschritten: ~1x10^7 Nuclei wurden nach der oben beschriebenen Methode isoliert und in 10 mM Triethanolamin-HCl, 292 mM Sukrose, 0,1 mM $MgCl_2$, pH 8,5 und 1 µg/ml DNase I resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min. bei 22°C inkubiert und anschließend über 10 mM Ethanolamin-HCl, 876 mM Sucrose, 0,1 mM $MgCl_2$, pH 7,5 geschichtet und bei 13.000 x g für 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mM Trienthanolamin, 292 mM Sukrose, 0,1 mM $MgCl_2$, pH 7,5 mit DNase I (5 µg/ml) resuspendiert und 15 min. bei 22°C inkubiert. Die verdauten Nuclei wurden bei 13.000 x g für 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mM Triethanolamin, 292 mM Sukrose, 0,1 mM $MgCl_2$, pH 7,5 resuspendiert. Unter Zugabe von Triton-X100 (Endkonzentration 2% w/v) für 10 min. bei 4°C inkubiert und bei 10.000 x g 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 M NaCl, 100 mM Triethanolamin-HCl, pH 7,5 resuspendiert und als Kernhüllenfraktion eingesetzt. Um die Reinheit der Proben zu kontrollieren, wurden die Fraktionen mittels Immunblot auf Markerproteine der subzellulären Kompartimente hin überprüft.

IV.5 Immunblot / Western Blot

Lystate von ~1x10^6 Hep-2 Zellen oder äquivalente Volumina der Zellfraktionen, wurden mittels SDS-PAGE auf Nitrozellulose-membranen transferiert (Hybond N von Amersham, Arlington

Heights, IL). Die transferierte Proteinmenge wurde mittels Ponceau S Färbung überprüft. Die Detektion erfolgte in PBS mit 0,5% Tween20 und 5% Milchpulver (w/v). Für die Detektion wurde die Membran mit folgenden primären Antikörper 1 h in PBS mit 0,5% Tween20 und 5% Milchpulver inkubiert.

ID	Spezifität	Klonalität	Quelle
PW8195	gegen die α-Untereinheiten des 20S Proteasoms	mmA	Affiniti / BioTrend, Köln, D
Tub 2.1	β-Tubulin	mmA	Sigma-Aldrich, München, D
636	Lamin A/C	mmA	Santa Cruz Bio-technology, Heidel-berg, D
72B9	Fibrillarin	mmA	(Reimer et al., 1987),
αSC35	SC35	mmA	(Fu and Maniatis, 1990)

Als Sekundärantikörper wurden Ziege-Anti-Maus, -Anti-Human und -Anti-Kaninchenkonjugate mit Meerrettich-Peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories/ Dianova, Hamburg, D) in einer Verdünnung von 1:10.000 und das Chemolumineszenz-System (ECL) nach Herstellerangaben (Amersham, Freiburg, D) eingesetzt.

IV.6 Proteasomenaktivitätstest

Die proteasomale Aktivität der Zellfraktionen wurde mit Hilfe eines fluorogenen Markerpeptids gemessen. Das proteasomenspezifische Substrat Suc-LLVY-AMC (Affiniti / BioTrend, Köln, D) besteht aus einem Peptid mit vier Aminosäuren (Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin) und einem C-terminal angehängten inaktiven Fluorochrom (AMC, 7-amino-4-methylcoumarin), welches erst durch die Hydrolyse der Peptide aktiviert wird. Das Peptid beinhaltet das Schnittmotiv für die Chymotrypsinaktivität des 20S Proteasoms, welches hauptsächlich nach großen, hyrophoben Resten schneidet.

Die Zellfraktionen wurden in Reaktionspuffer (500 mM Hepes, 10 mM EDTA, pH 7,6) mit 10 µM Substrat bei 37°C inkubiert und die freiwerdende Fluoreszenz mittels eines Fluorometers (Fluoroscan Ascent, Thermo Labsystems, Engelsbach, D) bei 380 nm Extinktion und 460 nm Emission gemessen. Als Referenzstandard wurde die Fluoreszenz von freiem AMC (Molecular Probes, Karlsruhe, D) gemessen. 2 h nach Reaktionsstart wurden Kontrollproben des Proteasominhibitors Lacatcystin (Alexis Biochemicals/ Axxora Grünberg, Deutschland) als Spezifitätskontrolle zugesetzt. Die Produktkurven wurden über 24 h verfolgt.

IV.7 Wechselzahl der nucleären Proteasomen

Um die Wechselzahl (turnover number) der Proteasomen zu bestimmten, wurde die Aktivität der zellulären Fraktionen bei 37°C für 115 min. in einer gesättigten Suc-LLVY-AMC Umgebung (10

µM) gemessen (Dahlmann et al., 1993). Die Enzymaktivität [EA] wurde über die Steigung der Aktivitätskurve bestimmt. Für die Berechnung der Wechselzahl [WZ] für die proteasomale Hydrolyse wurde der Proteingehalt der Zellfraktionen mittels des Bradford Protein Assays bestimmt. Für die Bestimmung der absoluten Anzahl an 26S Proteasomen [P] wurde angenommen, dass 1% des Gesamtproteinvolumens 26S Proteasomen darstellen (Hendil, 1988). Das Molekulargewicht des 26S Proteasoms wurde basierend auf den Molekulargewichten des 20S Proteasoms, circa 700.000 kDa (Tanaka et al., 1986), und des 19S Regulators, circa 700.000 kDa (Chu-Ping et al., 1994), auf 2.1 MDa geschätzt.
Die Wechselzahl [WZ] wurde mit folgender Gleichung berechnet:

EA [µmol x min^{-1}] / P [µmol] = WZ [µmol x min^{-1} x $µmol^{-1}$]

Um die proteasomale Enyzmaktivität *in vivo* zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzdaten der Suc-LLVY-AMC Proteolyse in lebenden Zellen und die *in vitro* Daten des Proteasomenaktivitätstests normalisiert und verglichen.

IV.8 Proteasomale Aktivität im Nucleus lebender Zellen / Mikroinjektion

Für die *in vivo* Degradationsanalysen wurden HEp-2 Zellen auf Deckgläschen bis zu 80% Konfluenz kultiviert und Substrat in den Nucleus mikroinjiziert. Alle Substrate wurden in PBS, pH 7,4 mittels

Mikromanipulator (InjectMan, Eppendorf, Hamburg, D) injiziert, wobei jeweils ca. 5% des Zellvolumen injiziert wurden.

In den Experimenten zur proteasomalen Aktivität in lebenden Zellen wurde das Substratpeptid Suc-LLVY-AMC mikroinjiziert und die ansteigende Fluoreszenz über 115 min. beobachtet. Als Negativ- bzw. Spezifitätskontrolle wurde proteasomal vorverdautes Suc-LLVY-AMC bzw. das Caspase-3-spezifische Markerpeptid Ac-DEVD-AMC mikroinjiziert (Nicholson et al., 1995). Alle Substrate wurden in DMSO gelöst und auf ihrer Endkonzentration von 10 µM in PBS verdünnt.

Für die Experimente mit globulärem Protein und zur Lokalisation nucleärer Proteolyse wurde fluorochrom-gekoppeltes Ovalbumin (DQ-Ovalbumin, DQ-OVA, Molecular Probes, Karlsruhe, D) eingesetzt. Für die Beobachtungen zur endocytotischen Aufnahme wurden HEp-2 Zellen in RPMI mit 200 µg/ml DQ-OVA für 30 min. bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, in PBS gewaschen und in RPMI/10%FSC im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Für *in situ* Akkumulationsstudien von DQ-OVA wurden HEp-2 Zellen auf Deckgläschen bis zu 80% Konfluenz kultiviert, mit 0,5 mg/ml DQ-OVA in PBS, mit und ohne 10 µM Lactacystin (LC) mikroinjiziert. Die Zellen wurden 5 bis 15 min. inkubiert und in Methanol und Aceton fixiert.

Für die *in situ* Lokalisationsstudien nucleoplasmatischer proteasomaler Proteolyse wurden auf Deckgläschen gezogene HEp-2 Zellen mit 0,5 mg/ml DQ-OVA in PBS mikroinjiziert, 1 h bei 37°C

und 5% CO_2 inkubiert, mit Methanol und Aceton fixiert und Markerproteine für subzelluläre Kompartimente mittels IIF gefärbt.

IV.9 Proteoylsesubstrate

Für die Beobachtung der proteolytischen Aktivität wurden sowohl Peptide als auch vollständige Proteine als Substrate für das Proteasom ausgewählt. Die Peptidsubstrate bestehen aus einer kurzen Aminosäuresequenz und einem C-terminal angehängten 7-Amino-4-Methylcourmarin (AMC). Das gebundene AMC ist ein Fluorochromvorläufer und hat als solcher keine Fluoreszenzeigenschaften. Erst die Hydrolyse des Peptids setzt das AMC Molekül frei, welches mit einer Extinktion von 380 nm und einer Emission von 460 nm beobachtet werden kann (Abb. 3.1, A). Als proteasomenspezifisches Substrat wurde Suc-LLVY-AMC eingesetzt. Das Substrat besitzt ein Schnittmotiv für die chymotryptische Aktivität des Proteasoms (Stein et al., 1996) welche, ähnlich dem Chymotrypsin, Isopeptidbindungen hauptsächlich hinter großen, hydrophoben Aminosäuren spaltet.
Die Chymotrypsinaktivität ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der proteasomalen Proteindegradation. Als Spezifitätskontrolle dient das Substrat Ac-DEVD-AMC. DEVD ist eine Peptidseqeuenz aus der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), welches ein spezifisches Substrat für die Caspase-3 darstellt (Nicholson et al., 1995). Das Proteinsubstrat nutzt eine andere Technik, um die Beobachtung der Degradation zu ermöglichen. DQ-

Ovalbumin ist ein selbstquenchendes Konjugat aus Ovalbumin und dem Fluorochrom BODIPY FL (Molecular Probes). Ovalbumin ist ein bekanntes Substrat für Proteasomen (Ben-Shahar et al., 1997).

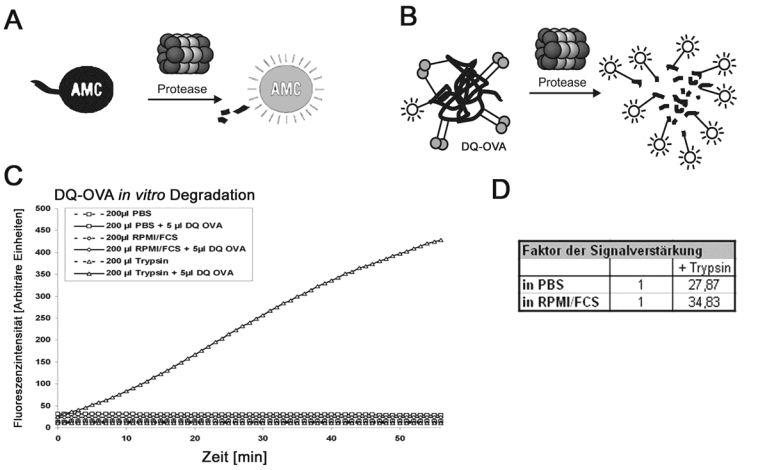


Abb. 3.3: Proteolysesubstrate. Der Mechanismus der eingesetzten fluorogenen Proteolysesubstrate ist unterschiedlich. (A) Suc-LLVY-AMC besteht aus einem vier Aminosäuren langem Peptid, welches über eine kovalente Bindung mit dem Fluorochrom 7-Amino-4-Methylcourmarin (AMC) verbunden ist. Das durch die Bindung vollständig inaktive AMC wird erst durch die Degradation des Peptid in seine aktive Form überführt. (B) DQ-Ovalbumin (DQ-OVA) ist ein aus 385 Aminosäuren bestehendes, 45 kD schweres Protein, das stark mit dem Fluorochrom BODIPY besetzt ist. Die Fluorochrome unterliegen einer gegenseitigen sterischen Störung (gequenchte Fluoreszenz), sodass nur 3% der möglichen Fluoreszenz im vollständigen Protein aktiv ist. Die Degradation des Proteins vereinzelt (entquencht) die Fluorochrome, sodass 100% der Fluoreszenzemission erreicht werden. (C) *In vitro* Testmessung des DQ-OVA Substrats: Weder PBS noch das Zellkulturmedium mit fötalem Kälberserum (RPMI/FSC) sind in der Lage, die Fluoreszenz des vollständigen DQ-Proteins zu entquenchen. Wird das Protein in einer Trypsinlösung (0,5 µg/ml) inkubiert, ist der entquenchende Effekt der Proteolyse deutlich sichtbar. (D) Die Verstärkung des Signals durch proteolytische Entquechnung ist im Vergleich zur Proteinkontrolle in PBS 29-fach und zum Zellkulturmedium 35-fach. Dies entspricht einer Grundfluoreszenz des Gesamtproteins von 3%.

Die hohe Dichte des gekoppelten Farbstoffs erzeugt sterische Hinderungen, sodass die Fluorochrome nur selten eine aktive Konformation einnehmen können. Erst die Degradation des Protein vereinzelt die Fluorochrome, was mit einer starken Steigerung der Fluoreszenzeigenschaften der Probe verbunden ist (Abb. 3.1, B). Fluorometrische Messung der DQ-OVA Degradation *in vitro* durch Trypsin (0,5 mg/ml) erhöhte die Fluoreszenz der Probe um den Faktor 30 (Abb. 3.1, C und D), während destilliertes Wasser, PBS oder Zellkulturmedium (RPMI/FCS) nicht in der Lage waren, DQ-OVA zu entquenchen.

IV.10 Mikroskopie

Bilder der Suc-LLVY-AMC-Akkumulation in lebenden Zellen wurden mit einem Zeiss Axiovert 100 TV Fluoreszenzmikroskop aufgenommen, das ausgestattet ist mit einem 60 x Ölimmersionsobjektiv (Plan-Neofluar, Zeiss, Jena, Germany) und einer digitalen Kamera (ORCA II, Hamamatsu, Bridgewater, NJ). Die Fluoreszenzsignale des AMCs wurden durch einen DAPI Filtersatz (Exitation: 330-385 nm, Emission: 420-460 nm) aufgefangen. Alle anderen Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (Fluoview 2.0, IX70, Olympus, Hamburg) aufgenommen, das ausgestattet ist mit einem 60 x Ölimmersionsobjektiv (UPlanFl, Olympus). Die Fluorchrome FITC und DQ-OVA wurden bei 488 nm angeregt, die Emission wurde

zwischen 510 und 550 nm detektiert. Das Fluorochrom CY5 wurde bei 647 nm angeregt und die Emissionen über 660 nm detektiert. Die Detektion der Fluorochrome war spezifisch, und es konnte kein „Durchbluten“ (Crosstalk) der Fluorochromemission in andere Detektionskanäle beobachtet werden.
Morphologische Studien der gefärbten Zellen wurden mittels Normarski Optik (Differenziellen Interferenzkontrast, DIC) aufgenommen.

IV.11 *In situ* Quantifikation der Fluoreszenzsignale

Die quantitative Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurde mit der Analyse Software Metamorph ‚Imaging Analysis Software Package’ (Universal Corp., West Chester, PA, US) vorgenommen. Die Analysebereiche (Regions of Interest, ROI) wurden manuell anhand der korrespondierenden differenziellen Interferenzkontrastbilder definiert. In Kolokalisationsexperimenten wurden Signale als ‚Gelb’ und kolokalisierend definiert, wenn der Pixelwert im Bereich Rot 108-255, Grün 108-255, Blau 0-255 (RGB Farbmodell) lag.

IV.12 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen der fluorometrischen Daten wurde die Software GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, US) eingesetzt. Die Datensätze wurden mittels ungepaartem t-Test verglichen. Die angegebenen p-Werte (1.0 = 100%) zeigen die

Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der beobachteten Differenz bei einer angenommenen Normalverteilung der Werte um einen zufälligen Unterschied handelt.

V Ergebnisse

V.1 Subzelluläre Lokalisation von Proteasomen

In HEp-2 Zellen lokalisieren Proteasomen ausschließlich im Cytoplasma und Nucleoplasma der Zelle. In indirekten Immunfluoreszenz(IIF)-Experimenten wurde die Lokalisation des 20S Proteasoms in der humanen Epithelzelllinie HEp-2 untersucht. Auf Deckgläschen zur Subkonfluenz kultivierte HEp-2 Zellen wurden mit Methanol und Aceton fixiert und mit monoklonalen Primärantikörpern gegen die α- und β-Untereinheiten des 20S Proteasoms behandelt. Über fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper wurden Proteasomen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Die Abbildung 4.1 zeigt eine fixierte HEp-2 Zelle in Nomarskioptik (Differenzielles Interferenzkontrastbild, DIC; Abb. 4.1, A) und im korrespondierenden konfokalen Fluoreszenzbild (Abb. 4.1, B) die Verteilung der Proteasomen.

Proteasomen lokalisieren im Cytoplasma (cy) und Nucleoplasma (nu), während die Nucleolen (no) und der Kernhüllenbereich (ne) frei von Proteasomen sind. Cytoplasmatische Proteasomen weisen eine homogene Verteilung auf, wohingegen im Nucleoplasma zusätzliche Strukturen zu erkennen sind, die geclustert oder punktiert erscheinen.

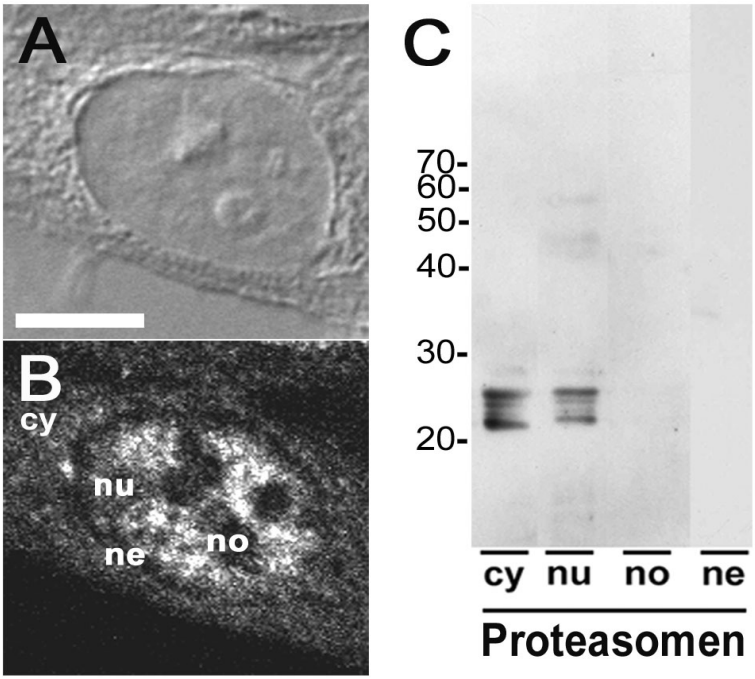


Abb. 4.1: Subzelluläre Lokalisation der 20S Proteasomen.(A) Differenzielles Inter-ferenzkontrastbild (DIC) einer repräsentativen, humanen HEp-2 Zelle während der Interphase. (B) Konfokales Immunfluoreszenzbild der in (A) abgebildeten Zelle, gefärbt mit einem monoklonalen Antikörper gegen 20S Proteasomen (PW8195). Die Färbung zeigt eine cytoplasmatische (cy) Lokalisation und ein fleckiges (engl. „speckled“) Muster im Nucleoplasma (nu). Ungefärbte Bereiche im Nucleus entsprechen den Nucleolen (no) und der Kernhülle (nuclear envelope, ne). (C) Immunblot biochemisch fraktionierter HEp-2 Zellen, detektiert mit einem polyklonalen Antikörper gegen 20S Proteasomen (PW8155), zeigt die gleiche Verteilung der Proteasomen: Die im Cytoplasma (Spur 1, cy) und im Nucleoplasma (Spur 2, nu) gefundenen Banden zwischen 20 und 30 kD entsprechen den α- und β- Untereinheiten des 20S Proteasoms. Die Nucleolen- (Spur 3, no) und Kernhüllenfraktion (Spur 4, ne) zeigen keine Banden. 20, 30, 40, 50, 60, 70 Molekulargewicht in Kilodalton (kD). Größenbalken: 5 µm.

Diese Ergebnisse konnten in biochemischen Zellextraktionsexperimenten bestätigt werden. Cytoplasma, Nucleoplasma, Nucleolen und Kernhüllenbereich wurden über biochemische Aufreinigungsverfahren (siehe Material und Methoden IV.4) isoliert und im Immunblot auf das Vorhandensein von 20S Proteasomen hin analysiert.

Die cytoplasmatischen (cy) und nucleoplasmatischen (nu) Fraktionen zeigen mehrere Proteinbanden mit Größen zwischen 20 und 30 kD, welche die α- und β-Untereinheiten des 20S Proteasoms darstellen (Abb. 4.1 C, Spur 1 und 2), während sowohl die nucleoläre- (no) als auch die Kernhüllenfraktion (ne) keine 20S Proteasomen beinhaltet (Abb. 4.1 C, Spur 3 und 4).

Die Lokalisation von Proteasomen ist in vielen Zelltypen reproduzierbar und unabhängig von einer Behandlung mit Proteasominhibitoren. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren proteasomaler Proteolyse ermöglicht es, die Funktion von Proteasomen in der lebenden Zelle zu analysieren. Da eine kürzlich veröffentlichte Arbeit (Mattsson et al., 2001) von der Rekrutierung von Proteasomen in die Nucleolen von humanen Brustkarzinomzellen (MCF-7) nach Proteasominhibition berichtet, wurden die Auswirkungen von Proteasominhibitoren auf die Lokalisation von Proteasomen detailliert untersucht.

Als Inhibitoren eingesetzt wurden das Peptidanalog MG-132 und das Pseudosubstrat Lactacystin (LC) in jeweils einer niedrigen (5- bzw. 1

µM) sowie einer hohen Dosis (20- bzw. 10 µM) für jeweils 4 h und die Auswirkungen auf die Proteasomen- verteilung in fünf unterschiedlichen Zelltypen beobachtet. Besonderer Wert wurde bei der Analyse auf mögliche Veränderungen der Lokalisation der Proteasomen und deren Rekrutierung in die Nucleolen gelegt.

HEp-2. Abbildung 4.2 zeigt Beobachtungen zur Proteasomenlokalisation nach Proteasominhibitorbehandlung in der humanen Epithelzelllinie HEp-2. 12 A zeigt die typische Verteilung von Proteasomen im Nucleoplasma mit einer homogenen Hintergrundfärbung und stärker gefärbten, geclusterten Strukturen, während die Nucleolen ungefärbt sind.
Die konfokalen Immunfluoreszenzbilder zeigen optische Schnitte durch den Nucleus der Zellen, sodass nicht in jedem Fall Fluoreszenzsignale cytoplasmatischer Proteasomen zu sehen sind. Eine 4-stündige Behandlung mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) des Inhibitors MG-132 zeigte keinerlei Auswirkung auf die Lokalisation der nucleoplasmatischen Proteasomen (Abb. 4.2, B) oder die Morphologie der Zellen. Während die Behandlung mit 5 µM MG-132 keine sichtbaren Auswirkungen auf die HEp-2 Zellen hatte (Abb. 4.2, C), zeigten die Zellen mit 20 µM MG-132 lochartige Läsionen im Cytoplasma (Abbildung 4.2, D, Δ). Die Verteilung der nucleoplasmatischen Proteasomen zeigte keine deutlichen Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollzellen (vgl. Abb. 4.2, A).

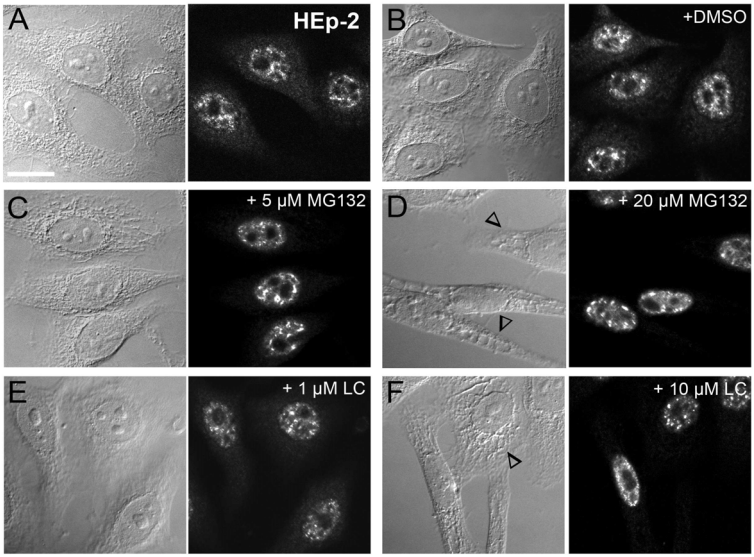


Abb. 4.2: Subnucleäre Lokalisation der Proteasomen in humanen HEp2-Zellen mit und ohne Proteasominhibitoren. Differenzielles Interferenzkontrastbild (DIC) repräsentativer HEp-2 Zellen mit korrespondierdem konfokalen Immunfluoreszenzbild. Die Verteilung von 20S Proteasomen in der humanen Epithelzelllinie HEp-2 nach Inhibition der proteasomalen Aktivität. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen 20S Proteasomen (PW8195) gefärbt und auf Änderungen der Proteasomenverteilung nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren MG-132 oder Lactacystin (LC) hin untersucht. (A) Typische nucleoplasmatische, gefleckte Verteilung von 20S Proteasomen in unbehandelten HEp-2 Zellen. (B) Zellen, die mit DMSO, dem Lösungmittel des Inhibitors MG-132, für 4 h behandelt wurden. Es ist keine Veränderung der proteasomalen Verteilung zu erkennen. (C-F) Zellen, die mit 5 (C) bzw. 20 µM (D) des Proteasominhibitors MG-132 oder 1 (E) bzw. 10 µM (F) LC für 4 h behandelt wurden. Obwohl die Zellen unter hohen Inhibitordosen deutliche morphologische Veränderungen im Cytoplasma aufweisen, konnten keine Änderungen in der subnucleären Verteilung der Proteasomen beobachtet werden. (E-F, ∆).Größenbalken: 10 µm.

Es konnte keine Rekrutierung oder Umverteilung der Proteasomen in die Nucleolen festgestellt werden. Die Untersuchungen mit dem in destillierten Wasser gelösten irreversiblen Inhibitor LC zeigten

ähnliche Ergebnisse. Die 4-stündige Behandlung mit 1 µM LC zeigte weder morphologische Auffälligkeiten noch Veränderungen im Verteilungsmuster der nucleoplasmatischen Proteasomen (Abb. 4.2, E). HEp-2 Zellen, die mit hohen Dosen LC (10 µM) behandelt wurden, zeigten dagegen ähnliche Läsionen im Cytoplasma wie Zellen, die mit hohen Dosen MG-132 (20 µM) behandelt wurden (vgl. Abb. 4.2 F und D, Δ).

HaCaT. Unbehandelte Zellen der humanen Keratinocytenzelllinie HaCaT, die mit dem gleichen monoklonalen Antikörper gegen 20S Proteasomen gefärbt wurden,

zeigten ebenso die typischen Verteilungsmuster der nucleoplasmatischen Proteasomen (Abb. 4.3, A).

Wurden die Zellen mit DMSO inkubiert, konnten keine Veränderungen in Morphologie oder Proteasomenverteilung beobachtet werden (Abb. 4.3, B). Starke morphologische Veränderungen konnten dagegen nach der Behandlung mit MG-132 beobachtet werden (Abb. 4.3, C und D, Δ). Die löchrigen Läsionen betrafen hauptsächlich das Cytoplasma und ähnelten den morphologischen Veränderungen, die in HEp-2 Zellen beobachtet wurden. Die morphologischen Veränderungen waren jedochausgeprägter und in nahezu alle Zellen zu beobachten. Obwohl die Zellen durch den Proteasominhibitor stark geschädigt wurden, konnten keine Proteasomen in den Nucleolen der Zelle beobachtet werden (Abb.

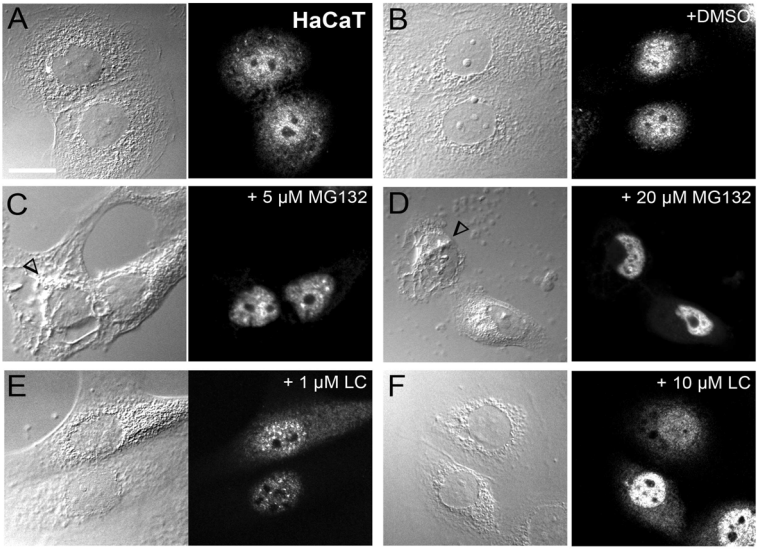


Abb. 4.3: Subnucleäre Lokalisation der Proteasomen in humanen HaCaT Zellen mit und ohne Proteasominhibition. Die Verteilung von 20S Proteasomen in der humanen Keratinocytenzelllinie HaCaT nach Inhibition der proteasomalen Aktivität. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen 20S Proteasomen (PW8195) gefärbt und auf Änderungen der Proteasomenverteilung nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren MG-132 oder Lactacystin (LC) hin untersucht. (A) Typische nucleoplasmatische, gefleckte Verteilung von 20S Proteasomen in unbehandelten HaCaT Zellen. (B) Zellen, die mit DMSO, dem Lösungmittel des Inhibitors MG-132, für 4 h behandelt wurden. Es sind keine Veränderungen der proteasomalen Verteilung zu erkennen. (C-F) Zellen die mit 5- (C) bzw. 20 µM (D) des Proteasomeninhibitors MG-132 oder 1- (E) bzw. 10 µM (F) LC für 4 h behandelt wurden. Obwohl die Zellen unter hohen Inhibitordosen deutliche morphologische Veränderungen im Cytoplasma aufweisen, konnten keine Änderungen in der subnucleären Verteilung der Proteasomen beobachtet werden. (E-F, ∆). Größenbalken: 5 µm.

4.3, C und D). HaCaT Zellen, die mit dem Inhibitor LC behandelt wurden, wiesen dagegen keine morphologischen Auffälligkeiten auf. Die Immunfluoreszenzbilder zeigten unterschiedlich stark gefärbte

Nuclei, jedoch waren die Nucleoloen in allen Fällen frei von proteasomaler Färbung (Abb. 4.3, E und F).

HPF. Humane primäre Fibroblasten wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit Proteasominhibitoren behandelt und mit monoklonalen Antikörpern gegen die Untereinheiten des 20S Proteasoms gefärbt. Abbildung 4.4 A zeigt ein Nomarskibild unbehandelter primärer Fibroblasten und das korrespondierende konfokale Immunfluoreszenzbild der Proteasomenverteilung im Nucleus. Zu erkennen ist eine homogene Hintergrundfärbung des Nucleoplasmas und stark gefärbte Bereiche hoher Proteasomendichte. Die Nucleolen sind frei von Proteasomen. DMSO behandelte Zellen (Abb. 4.4, B) zeigten keine Veränderung in Morphologie oder Proteasomenverteilung. Die primären Fibroblasten zeigten morphologische Veränderungen, wenn sie mit MG-132 behandelt wurden (Abb. 4.4, C und D, Δ). Insbesondere Zellen, die mit hohen Dosen MG-132 behandelt wurden zeigten starke Veränderungen des Cytoplasmas. Während unbehandelte primäre Fibroblasten eine langgezogene Struktur und ein in der Nomarskioptik glatt erscheinendes Cytoplasma aufweisen (vgl. Abb. 4.4, A), zeigten die mit MG-132 behandelten Zellen erheblich kürzere cytoplasmatische Ausläufer und ein knotig erscheinendes Cytoplasma (Abb. 4.4, D, Δ).
Die Analyse der Proteasomenverteilung im Nucleus erbrachte jedoch keinerlei Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle. Obwohl die

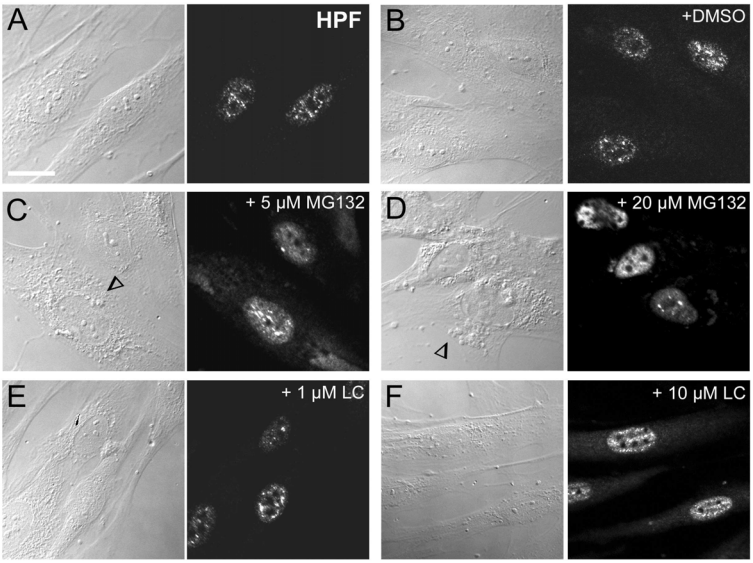


Abb. 4.4: Subnucleäre Lokalisation der Proteasomen in primären humanen Fibroblasten mit und ohne Proteasominhibition. Die Verteilung von 20S Proteasomen in humanen primären Fibroblasten (HPF) nach Inhibition der proteasomalen Aktivität. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen 20S Proteasomen (PW8195) gefärbt und auf Änderungen der Proteasomenverteilung nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren MG-132 oder Lactacystin (LC) hin untersucht. (A) Typische nucleoplasmatische, gefleckte Verteilung von 20S Proteasomen in unbehandelten HPF Zellen. (B) Zellen, die mit DMSO, dem Lösungmittel des Inhibitors MG-132, für 4 h behandelt wurden. Es sind keine Veränderung der proteasomalen Verteilung zu erkennen. (C-F) Zellen die mit 5 (C) bzw. 20 µM (D) des Proteasominhibitors MG-132 oder 1 (E) bzw. 10 µM (F) LC für 4 h behandelt wurden. Obwohl die Zellen unter hohen Inhibitordosen deutliche morphologische Veränderungen im Cytoplasma aufweisen, konnten keine Änderungen in der subnucleären Verteilung der Proteasomen beobachtet werden. (E-F, ∆). Größenbalken: 5 µm.

Zellen durch die Proteasominhibition beeinträchtigt wurden, konnte keine Umverteilung in die Nucleolen beobachtet werden. Die Behandlung mit dem spezifischeren und wasserlöslichen Inhibitor

LC zeigte keine morphologischen Auffälligkeiten. Die primären Fibroblasten zeigten keine morphologischen Veränderungen und das Verteilungsmuster nucleärer Proteasomen war im Vergleich zur Kontrolle unverändert (Abb. 4.4, E und F). Während die Lokalisation der nucleoplasmatischen Proteasomen sich unter Inhibition nicht veränderte, erschien das Fluoreszenzsignal der Proteasomen in inhibierten Zellen stärker. Dies kann auf eine Zunahme der Proteinkonzentration an Proteasomen hinweisen.

KB. Unbehandelte Zellen der humanen Epithelzelllinie KB (Abb. 4.5, A) zeigen die aus der Literatur bekannten Lokalisationmuster nucleoplasmatischer Proteasomen. Die Behandlung der KB Zellen mit DMSO (Abb. 4.5, B) zeigte weder morphologische Veränderungen noch einen Unterschied in der Verteilung der Proteasomen. Die Behandlung der Zellen mit dem Proteasomeninhibitor MG-132 führte allerdings zu morphologischen Veränderungen. Das Cytoplasma der Zellen erschien abgerundet (Abb. 4.5, C, Δ). Dieser Effekt war in Zellen, die mit hohen Dosen MG-132 behandelt wurden, noch deutlicher zu beobachten (Abb. 4.5, D, Δ). Das Fluoreszenzsignal der nucleoplasmatischen Proteasomen erschien in proteasominhibierten Zellen stärker, die Lokalisation der Proteasomen zeigte keinerlei Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. KB Zellen, die mit LC behandelt wurdenwiesen keine morphologischen Auffälligkeiten auf (Abb. 4.5,

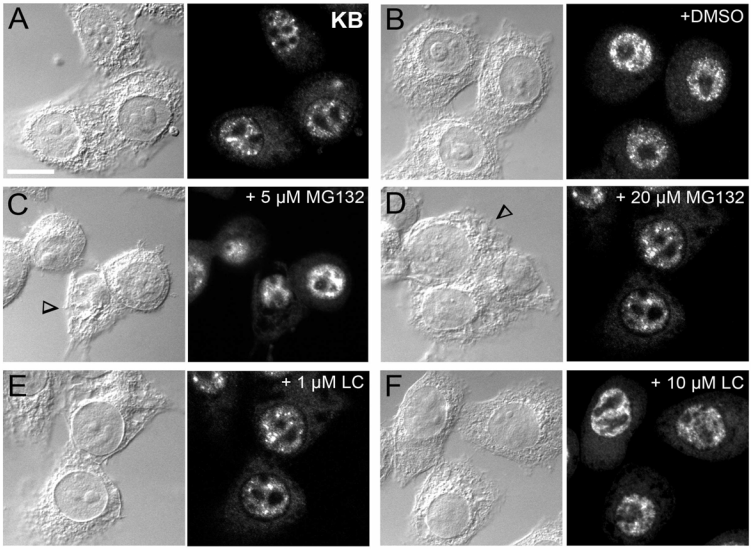


Abb. 4.5: Subnucleäre Lokalisation der Proteasomen in humanen KB Zellen mit und ohne Proteasominhibition. Die Verteilung von 20S Proteasomen in der humanen Epithelzelllinie KB nach Inhibition der proteasomalen Aktivität. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen 20S Proteasomen (PW8195) gefärbt und auf Änderungen der Proteasomenverteilung nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren MG-132 oder Lactacystin (LC) hin untersucht. (A) Typische nucleoplasmatische, gefleckte Verteilung von 20S Proteasomen in unbehandelten KB Zellen. (B) Zellen, die mit DMSO, dem Lösungmittel des Inhibitors MG-132, für 4 h behandelt wurden. Es sind keine Veränderungen der proteasomalen Verteilung zu erkennen. (C-F) Zellen, die mit 5 (C) bzw. 20 µM (D) des Proteasomeninhibitors MG-132 oder 1 (E) bzw. 10 µM (F) LC für 4 h behandelt wurden. Obwohl die Zellen unter hohen Inhibitordosen deutliche morphologische Veränderungen im Cytoplasma aufweisen, konnten keine Änderungen in der subnucleären Verteilung der Proteasomen beobachtet werden. (E-F, ∆). Größenbalken: 5 µm.

E und F). Auch hier zeigten die konfokalen Immunfluoreszenzbilder eine Zunahme des Fluoreszenzsignals, die in Zellen mit hoher LC-Dosis (Abb. 4.5, F) noch stärker war. Das Verteilungsmuster der nucleoplasmatischen Proteasomen verändert sich unter der

Behandlung nicht im Vergleich zur Kontrolle, und eine Rekrutierung von Proteasomen in die Nucleolen der KB Zellen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

L929. Die murine Fibroblastenzelllinie L929 wurde ebenfalls daraufhin untersucht, ob die Inhibition der proteasomalen Aktivität morphologische Veränderungen oder Unterschiede in der Proteasomenverteilung verursacht. Das Verteilungsmuster der nucleoplasmatischen Proteasomen in unbehandelten L929 Zellen (Abb. 4.6, A) zeigte die typische Lokalisation einer homogenen Hintergrundfärbung mit zusätzlich stark fluoreszierenden Bereichen. Wurden die Zellen ausschließlich mit DMSO (Abb. 4.6, B) behandelt, konnten keine Unterschiede zu den Kontrollzellen festgestellt werden. L929 Zellen, die mit MG-132 behandelt wurden, zeigten starke morphologische Veränderungen im Cytoplasma (Abb. 4.6, C und D, Δ), wie Abrunden des Zellkörpers und Läsionen im Cytoplasma. Trotz der zum Teil starken Einwirkung auf die Zellmorphologie veränderte sich die Proteasomenverteilung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen nicht. In keinem Fall konnten Umverteilung von Proteasomen in die Nucleolen der L929 Zellen beobachtet werden. Zellen, die mit dem Proteasomeninhibitor LC behandelt wurden, zeigten nur in hohen Dosen des Inhibitors morphologische Veränderungen (Abb. 4.6, E und F, Δ) und keinerlei Veränderung der Proteasomenverteilung. Die typische, in der Literatur beschriebene Distribution von Proteasomen in eukaryontischen Zellen konnte in den humanen Ephitelzelllinien

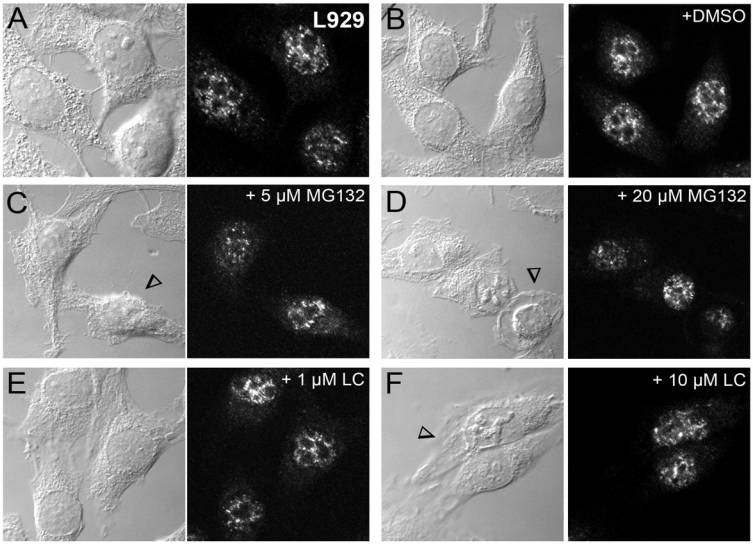


Abb. 4.6: Subnucleäre Lokalisation der Proteasomen in murinen L929 Zellen mit und ohne Proteasominhibition. Die Verteilung von 20S Proteasomen in der murinen Fibroblastenzelllinie L929 nach Inhibition der proteasomalen Aktivität. Die Zellen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen 20S Proteasomen (PW8195) gefärbt und auf Änderungen der Proteasomenverteilung nach Behandlung mit den Proteasominhibitoren MG-132 oder Lactacystin (LC) hin untersucht. (A) Typische nucleoplasmatische, gefleckte Verteilung von 20S Proteasomen in unbehandelten L929 Zellen. (B) Zellen, die mit DMSO, dem Lösungmittel des Inhibitors MG-132, für 4 h behandelt wurden. Es sind keine Veränderungen der proteasomalen Verteilung zu erkennen. (C-F), Zellen die mit 5 (C) bzw. 20 µM (D) des Proteasominhibitors MG-132 oder 1 (E) bzw. 10 µM (F) LC für 4 h behandelt wurden. Obwohl die Zellen unter hohen Inhibitordosen deutliche morphologische Veränderungen im Cytoplasma aufweisen, konnten keine Änderungen in der subnucleären Verteilung der Proteasomen beobachtet werden. (E-F, ∆). Größenbalken: 5 µm.

HEp-2 (Abb. 4.2, A) und KB (Abb. 4.5), der humanen Keratinocytenlinie HaCaT (Abb. 4.3, A) und sowohl in primären humanen (Abb. 4.4, A) als auch in immortalisierten murinen (Abb. 4.6, A) Fibroblasten bestätigt werden.

Behandlungen mit den Proteasominhibitoren LC und MG-132 verursachten zum Teil morphologische Veränderungen im Cytoplasma, von denen nicht alle Zellarten gleichermaßen betroffen waren (Abb. 4.2 - 4.6, C-F, Δ). Besonders starke Effekte zeigten sich in Keratinocyten und Fibroblasten (Abb. 4.3, 4.4 und 4.6), während die Epithelzelllininen HEp-2 und KB sichtbar weniger sensibel auf die Behandlung reagierten (Abb. 4.2 und 4.5). Die starken morphologischen Veränderungen in MG-132 behandelten Zellen sind dabei nicht auf das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) zurück zu führen, denn ausschließlich mit DMSO behandelte Zellen zeigten keinerlei Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 4.2 - 4.6, B).

Obwohl die behandelten Zellen teilweise deutliche morphologische Effekte in Folge der Inhibitorbehandlung zeigten, konnte keine Veränderung des proteasomalen Verteilungsmusters, insbesondere keine Rekrutierung in die Nucleolen, beobachtet werden. Diese Ergebnisse widersprechen der Rekrutierung von Proteasomen nach Inhibition der Proteasomen, die von Mattsson et al. berichtet wurden (Mattsson et al., 2001).

V.2 Subzelluläre Lokalisation proteasomaler Aktivität *in vitro*

Das Vorhandensein von 20S Proteasomen im Nucleoplasma von Zellen ist eine Grundvoraussetzung für, aber nicht gleichbedeutend

mit einer aktiven proteasomalen Proteolyse im Nucleus. In weiteren Experimenten wurden die im Nucleus lokalisierten Proteasomen auf proteolytische Aktivität hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden HEp-2 Zellen bis zu 70%-iger Konfluenz kultiviert, die Zellkompartimente biochemisch aufgereinigt (siehe Material und Methoden, IV.4) und die proteasomale Aktivität bestimmt. Die proteasomale Aktivität der Fraktionen wurde gemessen, indem ihre Fähigkeit analysiert wurde, ein inaktives fluorogenes Substrat zu einem aktiven Fluorochrom zu degradieren. Das eingesetzte Substrat Suc-LLVY-AMC wird spezifisch durch die geschwindigkeitsbestimmende, chymotryptische Aktivität der Proteasomen (Rock et al., 1994) geschnitten. Die Degradation des Peptids LLVY verursacht, dass das Fluorochrom Aminomethylcoumarin (AMC) von einer inaktiven in eine aktive Form wechselt, die fluorometrisch detektiert werden kann. Die gemessene Aktivitätskurve der ansteigenden Fluoreszenz ist proportional zur vorhandenen proteolytischen Aktivität.

Die Reinheit der aufgereingten cytoplasmatischen Fraktion wurde mit Hilfe von Signaturproteinen überprüft (Abb. 4.7, A). Im Immunblot konnte nachgewiesen werden, dass die Fraktion das cytoplasmatische Protein β-Tubulin als Bestandteil des Cytoskeletts im Cytoplasma enthielt (siehe Bande in Spur 1, bei 55 kD), während die Signaturproteine der anderen Zellkompartimente, SC35 als Bestandteil der Interchromatin Granulären Cluster im Nucleoplasma (Spur 2, 35 kD), Fibrillarin als Bestandteil des dichten fibrillären Kompartiments der Nucleolen (Spur 3, 34 kD) und Lamine A/C als

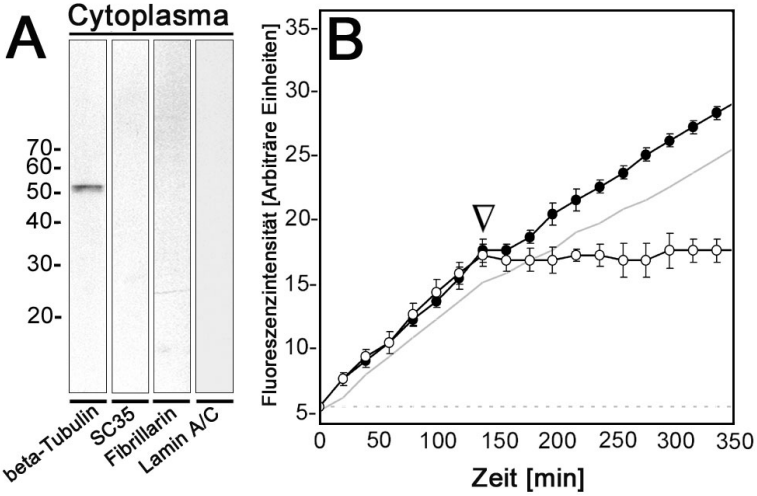


Abb. 4.7 Proteasomale Aktivität in cytoplasmatischen Zellfraktionen. Humane HEp-2 Zellen wurden subkonfluent kultiviert, biochemisch fraktioniert und auf proteasomale Aktivität hin untersucht. (A) Mittels Immunblot gegen Signaturproteine von Cytoplasma (β-Tubulin), Nucleoplasma (SC35), Nucleolus (Fibrillarin) und Kernhülle (Lamin A/C) wurde die Reinheit der Fraktionen überprüft. Die cytoplasmatische Fraktion zeigte eine mit β-Tubulin korrespondierende Bande bei 55 kD. (B) Messung der proteasomalen Aktivität anhand der Degradation des Substrats Suc-LLVY-AMC bei 37°C. Die cytoplasmatische Fraktion zeigte eine lineare proteolytische Aktivität (schwarze Kreise). Die Aktivitätszunahme wird blockiert, wenn der Proteasominhibitor Lactacystin zugegeben wird (weiße Kreise). Die Zugabe erfolge 2 h nach Inkubationsstart (∆). Als Positivkontrolle dienen biochemische isolierte 20S Proteasomen (graue Linie), als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Proteasomen (gestrichelte graue Linie).

Bestandteil der nucleären Lamina der Kernhülle (Spur 4, Doppelbande bei 70 kD), nicht vorhanden waren. Im Proteasomenaktivitätstest zeigte die cytoplasmatische Fraktion die Fähigkeit, das proteasomenspezifische, fluorogene Substrat Suc-LLVY-AMC zu degradieren (Abb. 4.7, B schwarze Kreise). Die Umsatzrate der cytoplasmatischen Proteasomen war über den

gesamten Messzeitraum linear. Mit Hilfe eines AMC-Referenzstandards konnte die Wechselzahl (WZ) cytoplasmatischer Proteasomen auf 73,97 [Substrat/Minute/Enzym] bestimmt werden (siehe Material und Methoden, IV.7).

Um die proteasomale Spezifität der Substratdegradation zu überprüfen, wurde einer cytoplasmatischen Zellfraktion 2 h nach Inkubationsstart der spezifische Proteasominhibitor LC in einer Endkonzentratin von 10 μM zugegeben (Abb. 4.7, B, weiße Kreise, Zugabe des Inhibitors bei Δ).

Die irreversible Inhibition der Proteasomen verhinderte die weitere Degradation des fluorogenen Substrats und damit die Akkumulation des Fluoreszenzsignals. Die proteolytische Aktivität der cytoplasmatischen Fraktion war um ein geringeres Maß höher als die der Positivkontrolle mit biochemisch isolierten 20S Proteasomen (graue Linie). In einer Messprobe ohne Proteasomen (gestrichelte graue Linie) konnte keine Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Die Immunblotanalyse der nucleoplasmatischen Zellfraktion (Abb. 4.8, A) zeigte eine spezifische 35 kD große Bande für das nucleoplasmatische Signaturprotein SC35 (Spur 2), sowie einen geringen Gehalt der Signaturproteine für die Kernhülle Lamine A/C (Abb. 4.8, A, Spur 4, bei 70 kD). Die Fraktion war negativ für das cytoplasmatische Signaturprotein β- Tubulin (Spur 1, 55 kD) und das nucleoläre Signaturprotein Fibrillarin (Spur 4, 34 kD). Im Proteasomenaktivitätstest (Abb. 4.8, B) konnte eine deutliche proteolytische Aktivität nachgewiesen werden (schwarze Kreise).

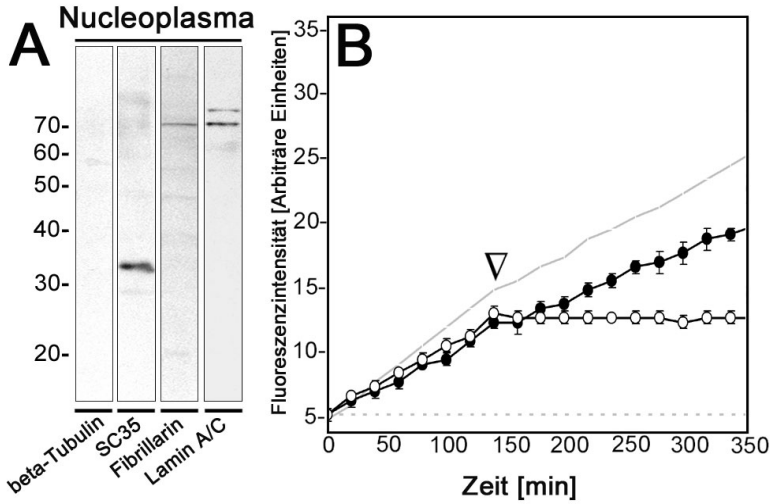


Abb. 4.8: Proteasomale Aktivität in nucleoplasmatischen Zellfraktionen. Humane HEp-2 Zellen wurden subkonfluent kultiviert, biochemisch fraktioniert und auf proteasomale Aktivität hin untersucht. (A) Mittels Immunblot gegen Signaturproteine von Cytoplasma (β-Tubulin), Nucleoplasma (SC35), Nucleolus (Fibrillarin) und Kernhülle (Lamin A/C) wurde die Reinheit der Fraktionen überprüft. Die nucleoplasmatische Fraktion zeigte eine zu SC35 korrespondierende Bande bei 35 kD. (B) Messung der proteasomalen Aktivität anhand der Degradation des Substrats Suc-LLVY-AMC bei 37°C. Die nucleoplasmatische Fraktion zeigte eine lineare proteolytische Aktivität (schwarze Kreise). Die Aktivitätszunahme wird blockiert, wenn der Proteasominhibitor Lactacystin zugegeben wird (weiße Kreise). Die Zugabe erfolgte 2 h nach Inkubationsstart (∆). Als Positivkontrolle dienten biochemische isolierte 20S Proteasomen (graue Linie), als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Proteasomen (gestrichelte graue Linie).

Die Proteasomen der nucleoplasmatischen Fraktion zeigten eine lineare Umsatzrate über den gesamten Zeitraum der Messungen. Die Wechselzahl der nucleoplasmatischen Proteasomen wurde anhand der Steigung der Aktivitätskurve auf 40,68 [Substrat/Minute/Enzym] bestimmt. Die Degradation des Substrats konnte blockiert werden, indem der spezifische Proteasominhibitor LC zugegeben wurde

(weiße Kreise, Zugabe des Inhibitors 2 h nach Messstart, Δ). Die nucleoplasmatische Fraktion zeigte eine etwas geringere proteasomale Aktivität als die Positivkontrolle mit biochemisch isolierten 20S Proteasomen (graue Linie), während eine Substratprobe ohne Zusatz von Proteasomen (Negativkontrolle) keine Reaktion zeigte (gestrichelte graue Linie).

Die nucleoläre Fraktion der HEp2-Zellen zeigte sich im Immunblot (Abb. 4.9, A) frei von Signaturproteinen des Cytoplasmas (β-Tubulin, Spur 1, 50 kD), des Nucleoplasmas (SC35, Spur 2, 35 kD) und der Kernhülle (Lamine A/C, Spur 4, bei 70 kD). Angereichert in dieser Fraktion war ausschließlich Fibrillarin, das Signaturprotein für die Nucleolen (Spur 3, 34 kD). Der Proteasomenaktivitätstest dieser Fraktion zeigte keine deutliche Akkumulation der Fluoreszenz während der Messung (Abb. 4.9, B, schwarze Kreise). Rechnerisch ergibt sich für die schwache Steigung der Aktivitätszahl eine theoretische Wechselzahl der Proteasomen von 2.97 [Substrat/Minute/Enzym]. Da keine proteasomale Aktivität in der nucleolären Fraktion gemessen werden konnte, konnte mit Hilfe des Proteasominhibitors LC, der 2 h nach Messstart hinzugefügt wurde (weiße Kreise), hier kein Spezifitätstest durchgeführt werden. Die als Positivkontrolle eingesetzten biochemisch isolierten 20S Proteasomen zeigten eine deutliche Aktivierungskurve (graue Linie). Einer Suc-LLVY-Substratprobe, der kein Proteasomen zugesetzt wurde (gestrichelte graue Linie), zeigte dagegen keine Aktivitätszunahme im Verlauf der Messung. Um die Reinheit der

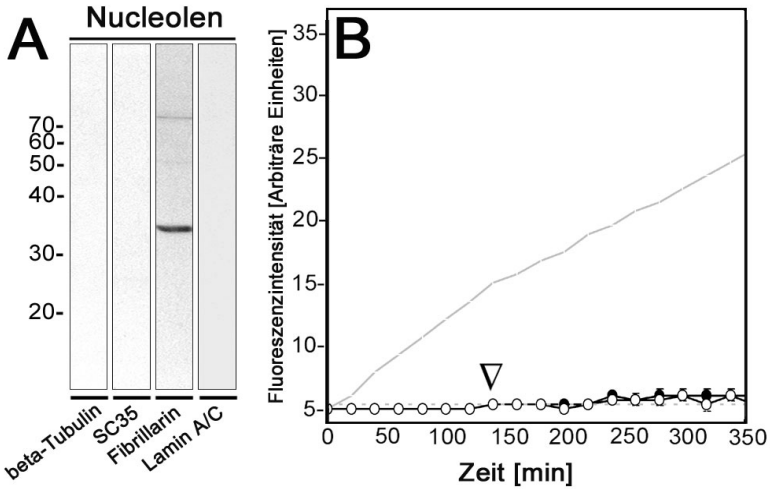


Abb. 4.9: Proteasomale Aktivität in nucleolären Zellfraktionen. Humane HEp-2 Zellen wurden subkonfluent kultiviert, biochemisch fraktioniert und auf proteasomale Aktivität hin untersucht. (A) Mittels Immunblot gegen Signaturproteine von Cytoplasma (β-Tubulin), Nucleoplasma (SC35), Nucleolus (Fibrillarin) und Kernhülle (Lamin A/C) wurde die Reinheit der Fraktionen überprüft. Die nucleoläre Fraktion zeigte eine mit Fibrillarin korrespondierende Bande bei 34 kD. (B) Messung der proteasomalen Aktivität anhand der Degradation des Substrats Suc-LLVY-AMC bei 37°C. Die nucleoläre Fraktion zeigte keine lineare proteolytische Aktivität (schwarze Kreise). Die Zugabe des Proteasominhibitors Lactacystin (weiße Kreise) hatte keinen Effekt auf die gemessene proteasomale Aktivität. Die Zugabe erfolge 2 h nach Inkubationsstart (∆). Als Positivkontrolle dienten biochemische isolierte 20S Proteasomen (graue Linie), als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Proteasomen (gestrichelte graue Linie).

Kernhüllenfraktionen zu überprüfen, wurden die Fraktionen im Immunblot auf die Anwesenheit von Signaturproteinen verschiedener Kompartimente überprüft. Die Lamine A/C (Abb. 4.10, A, Spur 4, bei 70 kD) konnten in der Fraktion detektiert werden, während die Probe negativ für die Signaturproteine der anderen Kompartimente, Cytoplasma (β-Tubulin, Spur 1),

Nucleoplasma (SC35, Spur 2) und Nucleolen (Fibrillarin, Spur 3) war.

Im Proteasomenaktivitätstest zeigte die Kernhüllenfraktion eine schwache proteolytische Aktivität (Abb. 4.10, B, schwarze Kreise), die mit Zugabe von LC (Abb. 4.10, B, weiße Kreise, LC Zugabe bei Δ) teilweise blockiert werden konnte. Anhand der schwachen Steigung der Aktivitätskurve wurde eine rechnerische Wechselzahl von 2.89 [Substrat/Minute/Enzym] ermittelt. Als Positivkontrolle diente eine Probe mit biochemisch isolierten 20S Proteasomen, welche eine deutliche Akkumulation der Fluoreszenz zeigte (graue Linie). Die als Negativkontrolle eingesetzte Probe mit Suc-LLVY-AMC ohne Proteasomen zeigt keinerlei Akivitätszunahme während des Messzeitraums (gestrichelte graue Linie). Diese Ergebnisse zeigen, dass (1) die zellulären Kompartimente sich in ihrer proteolytischen-proteasomalen Aktivität unterscheiden und dass (2) diese Aktivität mit dem physischen Vorhandensein der Proteasomen korrelliert (vgl. Abb. 3.1 und Abb. 4.7 - 4.10). Nucleoplasma und Cytoplasma enthalten sowohl Proteasomen als auch proteasomale Aktivität. Nucleäre Kernhülle und Nucleolen enthalten weder Proteasomen noch proteasomale Aktivität. Mit freiem AMC in definierten Konzentrationen als Referenz, konnten individuelle Wechselzahlen für die Substratumsetzung der Proteasomen bestimmt werden. Das Cytoplasma der HEp-2 Zellen zeigte die höchste proteasomale Aktivität mit einer enzymatischen Wechselzahl [WZ] von 73,97 [Substrat/Minute/Enzym]. Das Nucleoplasma besitzt eine

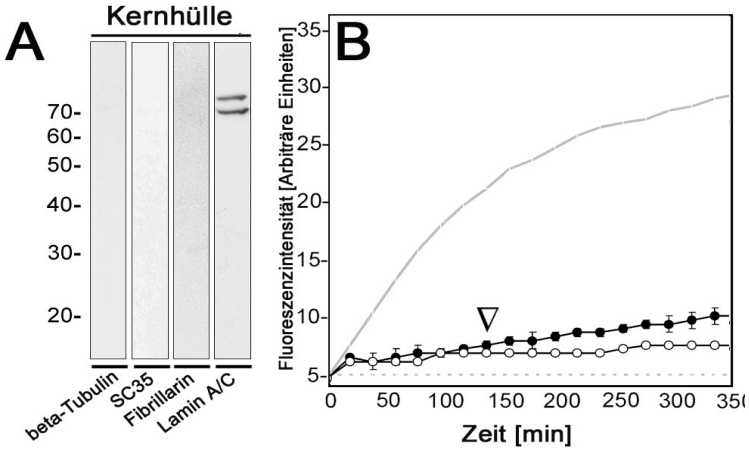


Abb. 4.10: Proteasomale Aktivität in Kernhüllenfraktionen. HEp-2 Zellen wurden subkonfluent kultiviert, biochemisch fraktioniert und auf proteasomale Aktivität hin untersucht. (A) Mittels Immunblot gegen Signaturproteine von Cytoplasma (β-Tubulin), Nucleoplasma (SC35), Nucleolus (Fibrillarin) und Kernhülle (Lamin A/C) wurde die Reinheit der Fraktionen überprüft. Die Kernhüllenfraktion zeigte zwei mit den Laminen A und C korrespondierende Banden bei 70 kD. Die nucleoläre Fraktion zeigt keine lineare proteolytische Aktivität (schwarze Kreise). Die Zugabe von Proteasominhibitor Lactacystin (weiße Kreise) hat keinen Effekt auf die gemessene proteasomale Aktivität. Die Zugabe erfolgte 2 h nach Inkubationsstart (∆). Als Positivkontrolle dienten biochemische isolierte 20S Proteasomen (graue Linie), als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Proteasomen (gestrichelte graue Linie).

signifikante proteasomale Aktivität mit einer Wechselzahl von 40,68. Nucleoläre- bzw. Kernhüllenfraktionen besitzen keine Proteasomen und dementsprechend kaum proteasomale Aktivität ([WZ] 2,97 bzw. 2,89).

V.3 Proteasomale Aktivität im Nucleus lebender Zellen

Um proteasomale Aktivität im intakten Nucleus zu beobachten, wurde das fluorogene Substrat Suc-LLVY-AMC in lebende Zellen eingebracht. Um zu verhindern, dass das Substrat endosomal oder cytoplasmatisch degradiert wird, wurde das Suc-LLVY-AMC durch einen Mikromanipulator direkt in den Nucleus von HEp-2 Zellen mikroinjiziert. Das entstehende Fluoreszenzsignal wurde über einen Zeitraum von 115 (min.) in Intervallen von 5 min. aufgenommen (Abb. 4.11, A).

Die Quantifikation der Fluoreszenzintensität einer mikroinjizierten Zelle zeigte einen linearen Anstieg des Signals über 2 h (Abb. 4.11, B, schwarze Dreiecke). Die Injektion von Suc-LLVY-AMC ausschließlich in das Cytoplasma führte nicht zu detektierbaren Fluoreszenzsignalen (nicht gezeigte Daten). Um Autofluoreszenz des Substrats bzw. unspezifische Proteolyse im Nucleus zu kontrollieren, wurden proteasomal vorverdautes Suc-LLVY-AMC (schwarze Kreise) bzw. das fluorogene Caspase-3-spezifische Substrat Ac-DEVD-AMC (schwarze Vierecke) in den Nucleus der Zellen mikroinjiziert. Beide Substanzen zeigten keine akkumulierenden Fluoreszenzsignale (Abb. 4.11, B). Die Lage des Nucleus wurde sowohl über Phasenkontrastbilder (nicht gezeigte Daten) als auch nach Abschluss der Beobachtung mittels DAPI-Injektion in die Zelle (Abb. 4.11, A) bestimmt. Der Vergleich der *in vitro* Degradationrate von Suc-LLVY-AMC in aufgereinigten Zellfraktionen (weiße Kreise: cytoplasmatische Fraktion, weiße Dreiecke: nucleoplasma-

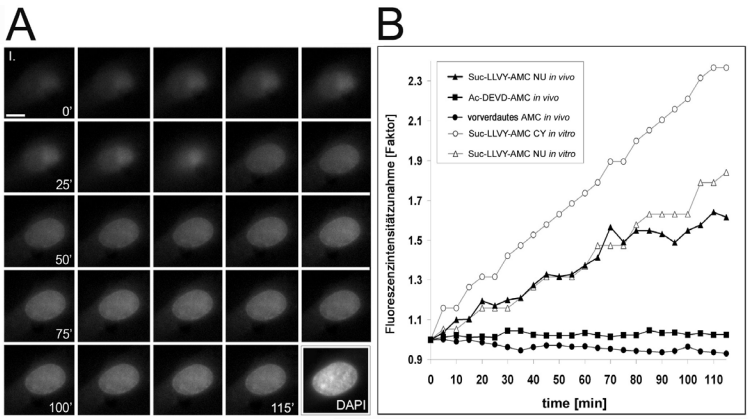


Abb. 4.11: Proteasomale Akitivtät im Nucleus lebender Zellen. (A) Das fluorogene Substrat Suc-LLVY-AMC wurde in den Nucleus einer HEp-2 Zelle mikroinjiziert und die durch Degradation freiwerdende Fluoreszenz detektiert. Die Messungen erfolgten im Abstand von 5 min. Nach 115 min. wurde DAPI in die Zelle mikroinjiziert, um die DNA zu färben und den Zellkern sichtbar zu machen. (B) Fluorometrische Quantifikation des Experiments in (A) (schwarze Dreiecke). Weiterhin aufgetragen sind *in vitro* Produktkurven biochemisch aufgereinigter Zellfraktionen des Cytoplasmas (weiße Kreise) und des Nucleoplasmas (weiße Dreiecke). Als Spezifitäts- bzw. Negativkontrolle wurde das Caspase-spezifische fluorogene Substrat Ac-DEVD-AMC (schwarze Vierecke) bzw. proteasomal vorverdautes Suc-LLVY-AMC (schwarze Kreise) in den Nucleus lebender Zellen mikroinjiziert. Besonders bemerkenswert ist die Vergleichbarkeit der proteasomalen Aktivität einer nucleoplasmatischen Proteinfraktion mit der Aktivität, die im Nucleus einer lebenden Zelle gemessen wurde. Größenbalken: 5 µM.

Degradationsraten in intakten Nuclei in lebenden Zellen (schwarze Dreiecke) zeigen ähnliche proteasomale Aktivitäten (vgl. weiße Dreiecke und schwarze Dreiecke). Die Steigungen der Aktivitätskurven entsprechen Substratumsätzen von 0,0969 µMol/min in der cytoplasmatischen Fraktion, von 0,0541 µMol/min in der nucleoplasmatischen Fraktion und einem Umsatz von 0,0472 µMol/min Suc-LLVY-AMC im intakten Nucleus lebender Zellen.

V.4 Proteasomenabhängige Proteindegradation im Nucleus lebender Zellen

Für eine effektive Degradation von Peptiden ist ein funktionelles 20S Proteasom notwendig. Die Experimente mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC zeigen, dass im Nucleoplasma aktive 20S Proteasomen vorliegen. Eine effiziente Degradation kompletter Proteine ist jedoch nur mit einem vollständigen 26S Proteasomen möglich (Glickman et al., 1998). Um die proteasomenabhängige Degradation von vollständigen Proteinen im Nucleus lebender Zellen zu beobachten, wurde HEp-2 Zellen das ektopische Protein DQ-Ovalbumin (DQ-OVA) appliziert. Hühnereiweiß (Ovalbumin, OVA) ist ein häufig verwendetes Protein in der Proteolyseforschung und als proteasomales Substrat in der Immunpräsentation beschrieben (Dick et al., 1994; Rock et al., 1994). DQ-Ovalbumin ist so stark mit dem Fluorochrom BODIPY besetzt, dass durch „sterische Blockade (quenching) nur 3% des potenziellen möglichen Fluoreszenssignals entsteht. Durch die Hydrolyse des Proteins werden die störenden Interferenzen der Fluorochrome beseitigt, und es entstehen stark fluoreszierende Abbauprodukte (detailliert beschrieben in Material und Methoden, IV.9).

HEp-2 Zellen, die mit DQ-OVA-angereichertem Medium inkubiert wurden, zeigen die endosomale Aufnahme des Substrats innerhalb von 5 min. und starke Fluoreszenz in endosomalen Vesikeln des Cytoplasmas, während der Nucleus auch 16 h nach Aufnahme ungefärbt bleibt (Abb. 4.12, C).

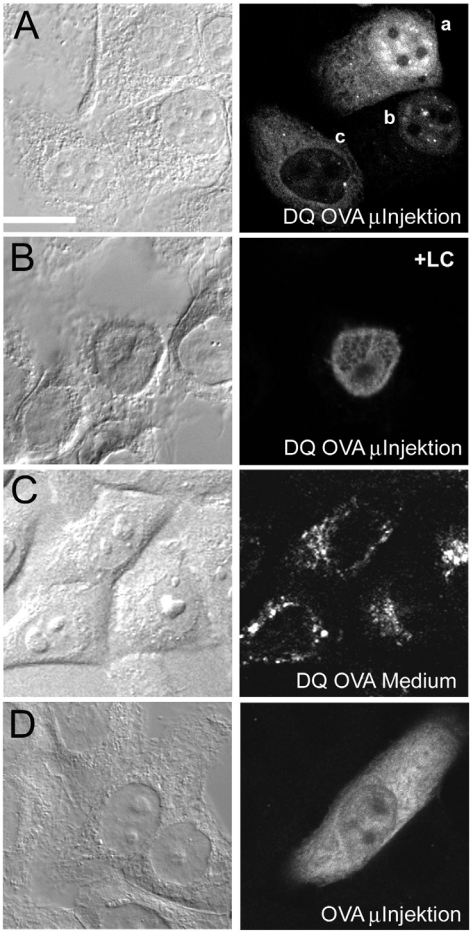


Abb. 4.12: Lokalisation des ektopischen Proteins Ovalbumin nach unterschiedlicher Applikation. Die Bildfolgen (A) – (D) zeigen jeweils konfoale Fluoreszenaufnahmen von repräsentativen humanen HEp-2 Zellen mit ihren korrespondierenden differenziellen Interferenzkontrastbildern Mikroinjektion des gequenchten Substrats DQ-Ovalbumin (DQ-OVA) ins Cyto- und Nucleoplasma (Zelle a)-, ins Nucleoplasma (Zelle b) oder ausschließlich ins Cytoplasma (Zelle c) von HEp-2 Zellen. Im Nucleus der Zelle lokalisiert DQ-OVA in granulären Clustern und distinkten Punkten (fokalen Zentren). Die Nucleolen enthalten keinerlei DQ-OVA. Bemerkenswert ist, dass Zellen die ausschließlich ins Cytoplasma mikroinjiziert wurden kein DQ-OVA im Zellkern aufweisen. (B) Eine HEp-2 Zelle, welche mit DQ-OVA und dem Proteasominhibitor Lactacystin (LC) ins Nucleoplasma mikroinjiziert wurde, zeigte eine schwächere Färbung und keine fokalen Zentren. (C) Lokalisation von endosomal aufgenommenen DQ-OVA. HEp-2 Zellen wurden 30 min. mit DQ-OVA inkubiert. Selbst aufgenommenes DQ-OVA lokalisiert in endosomalen Vesikeln im Cytoplasma. Der Zellkern enthält kein DQ-OVA. (D) Lokalisation von Ovalbumin (OVA) nach Mikroinjektion ins Cyto- und Nucleoplasma. Die konfokale Aufnahme einer repräsentativen HEp-2 Zelle nach Mikroinjektion von OVA gefärbt mit einem monoklonalen Antikörper gegen OVA zeigt eine homogene Verteilung des ektopischen Proteins und keine fokalen Zentren. Größenbalken: 10 µm.

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass endosomal aufgenommenes Substrat nicht in den Nucleus transferiert wird. Um endosomale Degradation zu umgehen und den proteasomalen Abbau des Substrats zu analysieren, wurde DQ-OVA via Mikromanipulation direkt in das Cytoplasma (Abb. 4.12, A, Zelle c), in das Nucleoplasma (Abb. 4.12, A, Zelle b) oder in beide Kompartimente (Abb. 4.12, A, Zelle a) der Zellen mikroinjiziert.

Im Gegensatz zur endosomalen Aufnahme des DQ-OVA (Abb. 4.12, C) verteilt sich das mikroinjizierte DQ-OVA in einem granulären Muster sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleoplasma (vgl. Abb. 4.12, A und C). Besonders auffällig sind starke Fluoreszenzsignale in distinkten lokalen Bereichen des Nucleoplasmas (nucleäre fokale Zentren). Ungefärbte Bereiche im Nucleus korrespondieren mit der Lokalisation von Nucleolen (vgl. Abb. 4.12, A, Fluoreszenzbild und DIC-Bild). Gezielte Mikroinjektion in das Cytoplasma bzw. Nucleoplasma resultiert in der spezifischen Lokalisation des Substrats in dem jeweiligen Kompartiment (Abb. 4.12, A). Diese Beobachtung zeigt, dass ein Austausch des Substrats zwischen den Kompartimenten nicht oder nur in geringem Maß statt findet.

Als Spezifikationskontrolle und um den Ort der proteasomalen DQ-OVA Degradation näher zu lokalisieren, wurden HEp-2 Zellen DQ-OVA und zusätzlich 10 µM des Proteasominhibitors LC in den Nucleus mikroinjiziert (Abb. 4.12, B). So behandelte Zellen zeigten eine diffuse und schwächere DQ-OVA-Fluoreszenz ohne nucleäre

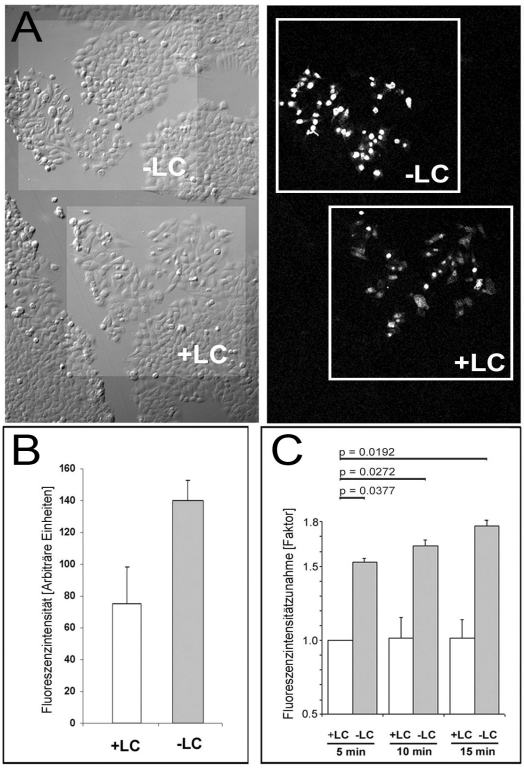


Abb. 4.13: Quantifikation der DQ-OVA-Degradation in unbehandelten und proteasominhibierten Zellen
(A) Einer gleichen Anzahl von humanen HEp-2 Zellen auf einem Deckglas wurde DQ-OVA (-LC) oder DQ-OVA mit Lactacystin (+LC) mikro-injiziert, und das Fluoreszenzsignal quantifiziert (B). Die mit Inhibitor behandelten Zellen zeigen eine um 50% reduzierte Fluoreszenz. (C) HEp-2 Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt und 5, 10 oder 15 min. nach Inkubation fixiert und die Fluoreszenzintensitätquanti-fiziert.

fokale Zentren (Abb. 4.12, B). Um auszuschliessen, dass es sich bei den beobachteten Akkumulationen der Fluoreszenzsignale in nucleäre fokale Zentren nicht um die typische Verteilung des ektopischen Proteins handelt, wurden HEp-2 Zellen mit unmarkiertem OVA mikroinjiziert (Abb. 4.12, D). Die Detektion mit monoklonalen Antikörpern gegen OVA zeigte eine homogene Verteilung des Proteins im Cytoplasma und Nucleoplasma, während die Nucleolen kein OVA enthielten. OVA ist jedoch nicht in nucleären fokalen Zentren konzentriert. Für die quantitative Analyse

der proteasomalen Proteindegradation im Nucleus wurden jeweils eine gleiche Anzahl von HEp-2 Zellen auf einem Präparat DQ-OVA (‚-LC') oder DQ-OVA und 10 µM LC (‚+LC') mikroinjiziert (Abb. 4.13, A, Rahmen markieren die Bereiche unterschiedlich behandelter Zellen). Die Quantifikation der Fluoreszenssignale (Abb. 4.13, B) zeigte, dass die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Lactacystin das Signal um circa 50% reduziert. In kinetischen Untersuchungen der DQ-Degradation im Nucleus wurden auf gleiche Weise behandelte Zellpräparate 5, 10 und 15 min. nach Mikroinjektion untersucht. Die Quantifikation der Fluoreszenssignale (Abb. 4.13, C) zeigte eine rasche Proteolyse des Proteins innerhalb der ersten 5 min. Zellen, die mit Proteasominhibitor behandelt wurden, zeigten keine Akkumulation des Fluoreszenzsignals.

Die Erbgebnisse der Mikroinjektionsexperimente mit DQ-OVA zeigten, dass man mit Hilfe dieser Technik proteasomale Proteindegradation im Nucleus lebender Zellen analysieren kann, da (1) DQ-OVA nicht zwischen den Kompartimenten transportiert wird, (2) mindestens 50% des DQ-OVA-Fluoreszenzsignals durch die proteasomale Proteolyse hervorgerufen wird, (3) 100% der Akkumulation des DQ-OVA-Fluoreszenzsignals durch proteasomale Proteolyse ensteht und (4) das Auftreten distinkter Bereiche besonders starker Fluoreszenz (nucleäre fokale Zentren) durch den Proteasominhibitor LC verhindert wird.

V.5 Lokalisation proteasomaler Proteindegradation in subnucleären Kompartimenten lebender Zellen

Um die Orte der proteasomalen Proteindegradation *in situ*/*in nucleo* genauer zu bestimmen, wurden mit DQ-OVA (grün) injizierte HEp-2 Zellen fixiert und mit Signaturproteinen für subzelluläre Strukturen oder Funktionen (rot) gegengefärbt (Abb. 4.14). Die Quantifikation der gelben Fluoreszenzsignale gibt die prozentuale Kolokalisationen zwischen Degradationsorten und Signaturproteinen wieder (Abb. 4.14, I). Die Abbildung 4.14 zeigt für jedes Signaturprotein eine detaillierte Aufnahme einer Zelle sowie eine Übersichtsaufnahme mit mehreren Zellen. Die Übersichtsaufnahmen beinhalten sowohl HEp-2 Zellen, die ins Cytoplasma injiziert wurden (schwarze Dreiecke), als auch Zellen, die ins Nucleoplasma injiziert wurden (weiße Dreiecke). Zellen, die nicht mikroinjiziert wurden, zeigen nur die rote Fluoreszenz der Antikörperfärbung. In HEp-2 Zellen, denen DQ-OVA in den Nucleus injiziert wurde, erschien das Substrat in einer granulären, nucleoplasmatischen Hintergrundfärbung und in stark fluoreszierenden nucleären fokalen Zentren, während die Nucleolen ungefärbt blieben. Für die Quantifikation der Kolokalisation wurden ausschließlich solche Zellen analysiert, die eine eindeutige nucleoplasmatische DQ-OVA Färbung zeigten.

β-Tubulin lokalisierte in den Zellen in einem granulären Muster im Cytoplasma und zeigte keine Kolokalisationssignale (gelb) mit DQ-OVA (Abb. 4.14, A, Tab. 4.1). Für die Quantifikation der Kolokalisationssignale zwischen β-Tubulin und Orten der nucleopl-

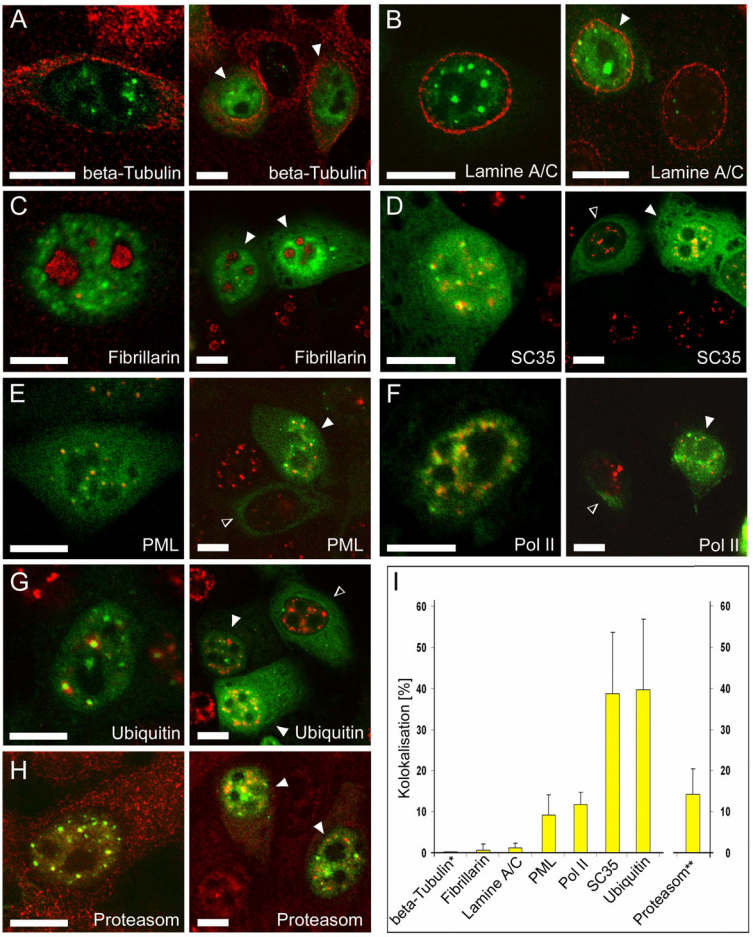


Abb. 4.14: Lokalisation proteasomaler Degradation von DQ-OVA in distinkten subnucleären Strukturen. (A) - (H) zeigen jeweils eine konfokale Fluoreszenzmikrografie repräsentativer HEp-2 Zellen, denen DQ-Ovalbumin (DQ-OVA) mikroinjiziert wurde (grün), und eine korrespondierende Übersichtsaufnahme von mikroinjizierten Zellen (weiße Dreiecke) und nicht behandelten Zellen. Die Zellen wurden zusätzlich mit den Antikörpern β-Tubulin (A), Lamin A/C (B), Fibrillarin (C), SC35 (D), PML (E) RNA

Polymerase II (pol II, F), Ubiquitin (G) und 20S Proteasom (H) gefärbt (rot). Gelbe Kolokalisationssignale von mikroinjiziertem DQ-OVA konnten mit SC35, PML, Pol II, Ubiquitin und 20S Proteasomen beobachtet werden. (I) Quantifikation der Kolokalisationen von DQ-OVA mit β-Tubulin sowie den nucleären Proteinen in mikroinjizierten Zellen. Der Kolokalisationstudie zwischen DQ-OVA und β-Tubulin liegt der gesamte Zellkörper als Messbereich zugrunde (*). Den Kolokalisationsstudien zwischen nucleären Proteinen und nucleären Proteasomen (**) liegt der Nucleus als Messbereich zugrunde. Besonders hervorzuheben sind HEp-2 Zellen, die ausschießlich ins Cytoplasma mikroinjiziert wurden und keine Kolokalisation mit nucleären Proteinen zeigen (schwarze Dreiecke). Größenbalken 5 µm.

asmatischen Proteolyse wurde der gesamte Zellkörper der Zellen gemessen. Für alle anderen Signaturproteine wurden ausschließlich die Nuclei analysiert. Die Kernhüllenproteine Lamine A und C lokalisieren als ringförmige Struktur um das Nucleoplasma. Es konnten nur minimale Kolokalisationen zwischen den Strukturproteinen der nucleären Lamina und Orten nucleoplasmatischer Degradation gefunden werden (Abb. 4.14, B und I, Tab. 4.1).

Das nucleoläre Protein Fibrillarin lokalisierte im dichten, fibrillären Kompartiment der Nucleolen und in Cajal-Kernkörperchen. Die Analyse der Kolokalisationssignale von Fibrillarin mit DQ-OVA zeigte, dass Fibrillarin nicht mit den Orten nucleärer Proteolyse kolokalisiert (Abb. 4.14, C und I, Tab. 4.1). Signaturproteine für zelluläre Strukturen, die nicht im Nucleoplasma der Zelle lokalisiert sind, zeigten demnach auch keine Kolokalisation mit Orten nucleoplasmatischer Proteindegradation. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen wurde eine 40%-ige Kolokalisation zwischen dem Spleißingfaktor SC35, dem Signaturprotein der Intrachromatin Granulären Cluster, und den Degradationsorten des DQ-OVAs in

Protein	Kolokalisation zwischen DQ-OVA Degradation und Signaturproteinen
β-Tubulin	-
Lamine A/C	-
Fibrillarin	-
PML	+
Pol II	+
Proteasom	++
Ubiquitin	+++
SC35	+++

Tab. 4.1 : Kolokalisation zwischen subnucleären Strukturen und Orten proteasomaler Proteolyse im Nucleus. Signaturproteine anderer zellulärer Kompartimente (β-Tubulin, Lamine A/C und Fibrillarin) kolokalisieren nicht mit Orten nucleärer Proteolyse. PML, Signaturprotein für die PML-Kernkörperchen, und RNA Polymerase II zeigen geringe Kolokalisationsignale. Die Komponenten des UPS-Systems Ubiquitin und Proteasom und auch SC35, als Signaturprotein für die Spleißosomen, zeigen starke Kolokalisation mit Orten der Proteolyse.

den nucleären fokalen Zentren gemessen (Abb. 4.14, D und I, Tab. 4.1). Doppelfärbungsexperimente mit DQ-OVA und Antikörpern gegen PML, einem Signaturprotein der PML-Kernkörperchen, ergaben eine circa 10%-ige Überlappung zwischen PML-Kernkörperchen und den Orten nucleoplasmatischer Protein-degradation. HEp-2 Zellen, die mit Antikörpern gegen RNA-Polymerase II (pol II, Abb. 4.14, F und I, Tab. 4.1) gefärbt wurden, zeigten ebenfalls Kolokalisationsraten um 10%. Wie SC35 zeigte

auch Ubiquitin, Degradationsmarker der proteasomalen Proteolysemachinerie, eine starke Überlappung mit den nucleären fokalen Zentren (Abb. 4.14, G und I, Tab. 4.1). 40% des Gesamtproteins kolokalisiert mit den Orten nucleärer Proteolyse. 20S Proteasomen kolokalisierten zu 10% mit den nucleären fokalen Zentren (Abb. 4.14, H, Tab. 4.1).

Die Quantifikation der Kolokalisationsstudie zeigte, dass nicht alle Signaturproteine im gleichen Maße mit DQ-OVA kolokalisieren (Abb. 4.14. I, Tab. 4.1). Dies weist darauf hin, dass es sich bei den beobachteten distinkten Bereichen starker Fluoreszenz nicht um die zufällige Verteilung des ektopischen Proteins oder seiner Peptide im Nucleus handelt, sondern den nucleären fokalen Zentren eine funktionelle Bedeutung zugrunde liegt.

VI Diskussion

VI.1 Aktive und nichtaktive Proteasomen lokalisieren in den gleichen Zellkompartimenten

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz und Immunblot Proteasomen sowohl im Cyto- als auch im Nucleoplasma der humanen Epithelzelllinie HEp-2 nachgewiesen, wogegen in Nucleolen sowie im Bereich der Kernhülle keine Proteasomen detektiert wurden. Während cytoplasmatische Proteasomen homogen verteilt sind, zeigen Immunfluoreszenzbilder nucleoplasmatischer Proteasomen zusätzlich zu einer homogenen Verteilung distinkte Bereiche besonders hoher Proteasomendichte. Das Verteilungsmuster der Proteasomen ist typisch und konnte in den humanen Epithelzelllinien HEp-2 (Abb. 4.2) und KB (Abb. 4.5), der humanen Keratinocytenzelllinie HaCaT (Abb. 4.3), der murinen Fibroblastenzelllinie L929 (Abb. 4.6) und in humanen primären Fibroblasten (Abb. 4.4) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse entsprechen denen anderer Publikationen aus dem Bereich der Ubiquitin-Proteasomen-Forschung. Elektronenmikroskopie (Rivett et al., 1992), Immunfluoreszenz (Chen et al., 2002), GFP-Fusionsproteine (Reits et al., 1997) und Proteomanalysen (Andersen et al., 2002) haben gezeigt, dass sich Proteasomen in Cyto- und Nucleoplasma, jedoch nicht in den Nucleolen der Zelle befinden (Wojcik and DeMartino, 2003).

Da in der vorliegenden Arbeit Aussagen über die Lokalisation von Proteasomen gemacht werden und Proteasominhibitoren eingesetzt wurden, war es wichtig zu überprüfen, ob die kürzlich beschriebenen Beobachtungen zur Umverteilung der Proteasomen nach Behandlung mit dem Proteasomeninhibitor MG-132 (Mattsson et al., 2001) im hier genutzten Zellsystem ebenfalls zutreffen. In den untersuchten Zelllinien konnten keine Veränderungen der Verteilung von Proteasomen beobachtet werden, wenn diese durch Proteasomeninhibitoren inaktiviert wurden. Beide eingesetzten Inhibitoren, das Peptidanalog MG-132 und das Pseudosubstrat Lactacystin, verursachten in hohen Konzentrationen (20 µM und 10 µM) morphologische Veränderungen und eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals. Eine Modifikation der Verteilung oder ein Wechsel der Zellkompartimente konnte jedoch in keinem Fall beobachtet werden. Mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen in der unterschiedlichen Behandlungsdauer und im verwendeten Zelltyp: Mattson et al. zeigen eine Umverteilung von Proteasomen in die Nucleolen der Zelle in einer humanen Brustkarzinom-Zelllinie (MCP-7) nach eine 15 stündigen Behandlung mit 20 µM MG-132. Alle hier eingesetzten Zelltypen konnten eine 15 Stunden andauernde Behandlung mit 20 µM MG-132 oder 10 µM Lactacystin nicht überstehen.

VI.2 Nucleoplasmatische Proteasomen sind aktive Proteolyse-Maschinen

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellfraktionierungen und das fluorogene Peptid-Substrat Suc-LLVY-AMC eingesetzt, um *in vitro* proteasomale Aktivität in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu untersuchen und erstmalig proteasomale Aktivität im intakten Nucleus zu visualisieren. Durch Zellfraktionierung isolierte Zellkompartimente wurden *in vitro* auf ihre proteasomale Aktivität hin analysiert. Proteinbestimmungen der Fraktionen und ein Referenzstandard des Fluorochroms ermöglichten es, die enyzmatischen Eigenschaften der Proteasomen zu charakterisieren. Durch die Steigung der Produktkurven des freiwerdenden Fluorochroms konnte die Wechselzahl („turnover number"), also der Substratumsatz des Zellkompartiments bestimmt werden. Aktive Proteolyseleistung wurde im Cytoplasma (Abb. 4.7) und im Nucleoplasma (Abb. 4.8) detektiert, während die nucleoläre Fraktion (Abb. 4.9) und die Fraktion der Kernhülle (Abb. 4.10) praktisch keine proteolytischen Aktivitäten aufwiesen. Die Wechselzahlen wurden für die cytoplasmatische Fraktion mit 73,97 Katalysen pro Sekunde und für die nucleoplasmatische Fraktion mit 40,68 bestimmt. Die Fraktion der Nucleolen und der Kernhülle wiesen mit Wechselzahlen von 2,97 bzw. 2,89 Werte im Bereich des Messhintergrundes auf.

Mit diesen Wechselzahlen liegt die enzymatische Aktivität der Proteasomen im unteren Bereich des Spektrums bekannter Wechselzahlen: Die kleinste bisher bestimmte Wechselzahl weist

mit 0,5 Katalysen pro Sekunde das Lysozym auf, während die höchsten Wechselzahlen mit über 1.000.000 Katalysen pro Sekunde von Katalasen gemessen wurden.

Um proteasomale Aktivität im Zellkern erstmalig *in vivo* nachzuweisen, wurde das Peptid-Substrat Suc-LLVY-AMC in den Nucleus lebender Zellen mikroinjiziert. Die aufgenommenen Produktkurven nucleoplasmatischer Proteasomenaktivität *in vivo* wurden mit den Daten der *in vitro* Messungen der nucleoplasmatischen Fraktionen verglichen. Der Vergleich der Ergebnisse aus der Zellfraktionierung mit denen der Mikroinjektionsexperimente ergab nahezu übereinstimmende Proteolyseraten von Suc-LLVY-AMC *in vitro* in nucleoplasmatischen Fraktionen und *in vivo* in intakten Nuclei lebender Zellen (Abb. 4.11, B). Mit Hilfe von Proteinbestimmung der nucleoplasmatischen Fraktion und Literaturdaten zum Proteingehalt eukaryontischer Zellen, sowie dem theoretisch angenommenen Anteil an Proteasomen vom Gesamtprotein (Hendil, 1988) ließ sich die Umsatzrate pro Proteasom errechnen. Demzufolge wiesen die Proteasomen der nucleoplasmatischen Fraktion eine Umsatzrate von 0,0541 [µMol/min] auf, die Umsatzrate der Proteasomen in diesem Zellkompartiment wies *in vivo* einen Umsatz von 0,0472 [µMol/min] auf.

Die gemessenen Wechselzahlen beziehen sich jedoch ausschließlich auf die chymotryptische Aktivität der 20S Untereinheit des Proteasoms. Die tatsächliche proteasomale Umsatzrate eines Proteins *in vivo* kann mit diesen Daten aus zwei Gründen jedoch nicht

abgeschätzt werden: (1) Die Proteolyse des Suc-LLVY-Substrats wird ausschließlich durch die chymotryptische Aktivität der 20S Untereinheit des Proteasoms katalysiert. Diese Aktivität tragen jedoch nur zwei der sechs katalytischen Zentren des 20S Proteasoms. (2) Im Gegensatz zur Proteolyse eines vollständigen Proteins braucht ein Peptidsubstrat nicht entfaltet zu werden. Das Peptidsubstrat gelangt durch Diffusion in die proteolytische Kammer, während ubiquitinylierte Proteine durch die 19S Regulatoren detektiert und der proteolytischen Kammer des Proteasoms aktiv zugeführt werden. Da sich die tatsächliche Proteolyseleistung der Proteasomen einerseits aus sechs katalytischen Zentren zusammensetzt und zielgerichtet verläuft, damit also schneller und effektiver wird, andererseits jedoch der Mechanismus der Proteindegradation im Vergleich zur Peptiddegradation aufwendiger ist, ist eine Abweichung der Umsatzraten für die Degradation ganzer Proteine sowohl nach oben als auch nach unten denkbar.

VI.3 DQ-OVA zeigt Orte proteasomaler Proteindegradation im Nucleus

Durch Mikroinjektion des fluorogenen Modellproteins DQ-Ovalbumin (DQ-OVA) wurde in dieser Arbeit erstmalig nucleäre proteasomale Proteindegradation *in situ* beobachtet und lokalisiert (Abb. 4.12). Die Proteolyse dieses gequenchten Proteinsubstrats löst die blockierenden Interferenzen des Farbstoffs auf und erzeugt an den Orten aktiver Proteolyse hohe Konzentrationen aktiver

Fluorochrome, die als stark fluoreszierende fokale Zentren detektiert werden können. Die auf diese Weise erkennbare Lokalisation aktiver Proteolyse weist eine granuläre Verteilung mit stark emitierenden distinkten fokalen Zentren im Nucleoplasma auf. Globuläre Proteine wie Ovalbumin tragen häufig hydrophobe Aminosäurereste in ihrem Innern. Die Degradation eines globulären Proteins führt dazu, dass solche hydrophoben Bereiche mit der wässrigen Phase des Cyto- oder Nucleoplasmas in Berührung kommen und dadurch ausfallen könnten. Dass es sich bei den beobachtenen fokalen Zentren lediglich um Aggregate ausgefällter Protein handelt, konnte ausgeschlossen werden, indem unmarkiertes Ovalbumin in Zellen mikroinjiziert wurde. Dieses zeigte keine fokalen Zentren wie das DQ-Ovalbumin, sondern eine homogene Verteilung (Abb. 4.12, D). Diese Beobachtung beweist, dass exogene globuläre Proteine oder aus ihnen hervorgehende Peptide nach Mikroinjektion nicht zwangsläufig an spezifischen Orten im Nucleus akkumulieren. Diese Schlussfolgerung wird durch eine Veröffentlichung zur Dynamik von Peptiden gestützt (Reits et al., 2003). Die Autoren zeigen in ihrer Arbeit, dass frei diffundierende fluoreszierende Peptide nicht ausfallen, sondern sich homogen im Nucleoplasma verteilen und schnell degradiert werden.

Weitere Untersuchungen weisen außerdem die fluoreszierenden Zentren als Orte aktiver Proteolyse aus: Mikroinjektionen ausschließlich des Fluorochroms oder eines *in vitro* hergestellten vorverdauten DQ-OVA-Substrats zeigten, dass diese Substrate innerhalb weniger Minuten nicht mehr zu detektieren sind (nicht

gezeigte Daten). Auch diese Beobachtung bestätigt die Beobachtung zur Dynamik von Peptiden (Reits et al., 2003) und zeigt, dass auch im hier vorgestellten System einmal entstandene Peptide nicht stabil sind. Die Fluoreszenz, die in den fokalen Zentren detektiert wird, muss daher von nazierenden Peptiden stammen, die bei der Proteindegradation entstehen. Als zusätzlicher Hinweis, dass die fluoreszierenden Zentren Orte der Proteolyse darstellen, dient die Beobachtung, dass die Zentren bei Zugabe von spezifischen Proteasomeninhibitoren nicht entstehen (Abb. 4.12, A und B, 4.13).

VI.4 Passive translokation von mikroinjizierten Proteinen durch die Kernhüllenmembran

Untersuchungen zum Austausch von mikroinjizierten Proteinen zwischen Cytoplasma und Nucleoplasma zeigten, dass kein signifikanter Transport vom Cytoplasma in das Nucleoplasma stattfindet. Da zur Mikroinjektion in den Zellkern einer intakten Zelle das Cytoplasma durchstoßen werden muss und eine Mikroinjektionskanüle stetig kleine Mengen Injektionssubstrat verliert, ist es nicht möglich, ausschließlich Substrat in den Zellkern zu bringen. Dies bedeutet, dass für Untersuchungen zur passiven Diffusion des Substrats zwischen den beiden Kompartimenten nur die Translokation von cytoplasmatisch injiziertem Substrat in das Nucleoplasma beobachtet werden kann. Zellen, denen das Substrat ausschließlich in das Cytoplasma mikroinjiziert wurde, zeigten allerdings keine signifikante Fluoreszenzzunahme im Nucleoplasma

über einen Beobachtungszeitaum von maximal 2 Stunden (Abb. 4.12, A). Das Substrat konnte demzufolge nicht passiv durch den circa 9 nm weiten Kanal des Kernporenkomplexes in das Nucleoplasma translozieren. Das dem eingesetzten Proteinsubstrat DQ-OVA zugrunde liegende Protein Ovalbumin hat eine Größe von 44 kD und einen Durchmesser von circa 6 nm. Frühe Arbeiten zum passiven Transport durch den Kernporenkomplex haben gezeigt, dass nur Moleküle, die kleiner als 5 kD sind, ungehindert durch die Kernporen der Kernhülle gelangen können (Paine et al., 1975; Gorlich and Kutay, 1999). Die Halbwertszeit für ein Equilibrium von Ovalbumin zwischen Cytoplasma und Nucleoplasma wird in dieser Arbeit mit 30 Minuten angegeben. In der vorliegenden Arbeit lag die Halbwertszeit für ein Equilibrium des cytoplasmatisch mikroinjizierten DQ-OVAs zwischen Cytoplasma und Nucleoplasma mit über 2 Stunden deutlich höher. Ursache für diesen Unterschied könnte im Einsatz unterschiedlicher Zelltypen zu finden sein. Paine et al. verwendeten Amphibien-Eizellen, welche mehrere Millionen Kernporenkomplexe aufweisen, während in dieser Arbeit eingesetzte proliferierende Säugerzellen nur einige Tausend Kernporenkomplexe besitzen (Allen et al., 2000).

VI.5 Regulation nucleärer Funktion

Die gezielte Proteolyse von Proteinen im Cytoplasma durch das UPS dient nicht in erster Linie dem Recycling von Aminosäuren, sondern ist ein Instrument, mit dem die Zelle ihren Proteinhaushalt reguliert.

Man kann vermuten, dass ein aktives UPS im Zellkern für ähnliche Aufgaben verantwortlich ist. Wie in der Vergangenheit gezeigt werden konnte, finden zentrale nucleäre Funktionen wie Transkription, Spleißen oder Proliferation in distinkten Bereichen des Zellkerns statt (Spector, 2001). Durch die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode, mit der proteolytische Zentren im Zellkern sichtbar gemacht werden, konnten die Orte der Proteindegradation mit Orten spezifischer nucleärer Aktivität in Beziehung gesetzt werden.

Die Doppelfärbeexperimente, in denen mit Hilfe von Injektion von DQ-OVA Orte der Proteolyse kenntlich und mittels Antikörperfärbung unterschiedliche Strukturen des Zellkerns sichtbar gemacht wurden, zeigten Interaktionen zwischen der nucleären Proteolyse und den klassischen nucleären Funktionen (Abb. 4.14, Tab. 4.1). Dass Transkription durch proteolytische Aktivität reguliert wird, wurde im Rahmen der Transkriptions-gekoppelten DNA-Reparatur (transcription-coupled repair) der RNA-Polymerase II bereits beschrieben: Aktive RNA-Polymerase II, welche DNA-Läsionen nicht überspringen kann und an einem DNA-Strang unbeweglich hängen bleibt, dient der Zelle als Indikator für einen DNA-Schaden. Die unbewegliche, aber aktive Polymerase, die an ihrem Phosphorylierungsstatus erkannt wird, wird ubiquitinyliert undb proteasomal abgebaut, während DNA-Reparaturmaschinen an den Ort des DNA-Schadens rekrutiert werden (Lee et al., 2002). Bisher ist unklar, ob die Proteolyse der RNA-Polymerase II im

Nucleoplasma stattfindet oder markierte Polymerase II im Cytoplasma degradiert wird.

Die hier vorgestellten Kolokalisationexperimente zwischen Orten proteasomaler Proteolyse und der RNA-Polymerase II (Abb. 4.14, F) zeigen, dass signifikante Überlappungen zwischen Orten der Transkription und Orten der Proteolyse vorhanden sind. Diese Beobachtung macht es wahrscheinlich, dass die proteolytische Regulation der RNA-Polymerase II im Nucleoplasma stattfindet. Ob hierbei Proteasomen zu Orten geschädigter DNA und damit gestoppter Transkription rekrutiert werden oder ob ubiquitinylierte RNA-Polymerase II zu proteolytischen Zentren wandern, ist eine Frage, die noch beantwortet werden muss.

Indirektere Alternativen, mit deren Hilfe die Zelle ihre Genexpression kontrollieren kann, verlaufen über die Proteolyse der Expressionsregulatoren. Tatsächlich existieren Beobachtungen sowohl zur gezielten Aktivierung der Genexpression durch Proteolyse von Repressoren und Inhibitoren (beispielsweise die signaltransduzierte Proteolyse von IκB, der Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB), wie auch zur gezielten Inaktivierung durch Proteolyse von Transkriptionsfaktoren (beispielsweise die gezielte Ubiquitinylierung von p53). Das UPS reguliert die Genexpression jedoch nicht ausschließlich über Proteolyse. Denn es konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinylierung des Histons H2B Teil der Deaktivierung eines Genabschnitts („gen silencing“) sein kann (Strahl and Allis, 2000).

Kolokalisationsstudien mit Antikörpern gegen den Spleißfaktor SC35 zeigten, dass die fokalen Zentren nucleärer Proteolyse mit den Orten hoher Spleißfaktorendichte, den Interchromatin Granulären Clustern (IGCs), partiell überlappen. Obwohl bereits berichtet wurde, dass der Spleißfaktor SC35 mit nucleolären Proteasomen kolokalisiert und unter Proteasomeinhibition in der Zelle akkumuliert (Chen et al., 2002; Rockel and von Mikecz, 2002), konnten bisher keine Ausagen über den Ort der Degradation gemacht werden. Die hier gezeigten Kolokalisationen zwischen den fokalen Zentren und den IGCs (Abb. 4.14, D) lassen vermuten, dass die Spleißfaktoren direkt im Zellkern degradiert werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass größere IGCs in transkriptionell inaktiven Zellen vorhanden sind (Zeng et al., 1997), kann vermutet werden, dass die IGCs Lagerungsorte nicht benötigter Spleißfaktoren darstellen, die durch nucleoläre Proteasomen vor Ort degradiert werden.

Die Kolokalisationsstudien mit Antikörpern gegen das PML-Protein, als Signaturprotein für die nucleären PML-Kernkörperchen, konnten belegen, dass partielle Überlappungen zwischen den PML-Kernkörperchen und den Orten proteasomaler Proteolyse im Zellkern vorhanden sind (Abb. 4.14, E). In Verbindung mit den Ergebnissen vorangegangener Studien, die beschreiben, dass PML-Kernkörpchern mit 20S Proteasomen kolokalisieren und sich die Konzentration von PML-Protein in der Zelle unter Behandlung mit Proteasomeninhibitoren erhöht (Rockel and von Mikecz, 2002), kann

man vermuten, dass auch das PML-Protein im Nucleus der Zellen proteasomal degradiert wird.
Nucleoläre Proteine wie Fibrillarin oder „Ubstream Binding Factor“ (UBF) zeigten in vorherigen Studien keine Kolokalisationen mit 20S Proteasomen und akkumulierten nicht in proteasomeninhibierten Zellen (Rockel and von Mikecz, 2002). Auch in den Kolokalisationsstudien mit Orten der proteasomalen Proteolyse konnte keine Überlappung mit den Lokalisationsorten von Fibrillarin identifiziert werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass nucleoläre Proteine nicht von nucleoplasmatischen Proteasomen degradiert werden können. Vorausgegangene Arbeiten konnte zeigen, dass die Umweltnoxe Quecksilber in der Lage ist, eine Rekrutierung von nucleolärem Fibrillarin zu nucleoplasmatischen Proteasomen auszulösen (Chen et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass ein aktives UPS im Nucleus an der Regulation zentraler nucleärer Aufgaben wie Spleißing und Transkription beteiligt ist. Diese Regulation verläuft über die gezielte Proteoylse von funktionellen Proteinen und beeinflusst die Aktivität der Proteinmaschinen im Zellkern. Die Degradation von nucleoplasmatischen Proteinen durch cytoplasmatische Proteasomen ist nur dann möglich, wenn die Proteolysesubstrate aus dem Nucleoplasma exportiert werden. Im Gegensatz dazu garantieren nucleoplasmatische Proteasomen eine enge und schnelle Regulation der aktiven Proteinkomplexe in unmittelbarer Umgebung des Wirkortes. Ob dabei

nucleoplasmatische Proteasomen zu den Degradationsorten rekrutiert werden oder ob zu degradierende Proteine zu den Proteasomen rekrutiert werden oder sogar beide Möglichkeiten vorkommen, bleibt unklar.

VI.6 Hypothese zur Organisation der proteolytischen Zentren in Interchromatin Domänen Kanälen

Die distinkten fokalen Zentren lassen die Vermutung zu, dass es sich bei den Orten der proteasomalen Proteolyse um definierte subnucleäre Bereiche handelt. Die Überlappung aktiver Proteasomen mit Komponenten der Spleißmaschinerie (Abb. 4.13 D und I) ist besonders stark in deren mutmaßlichen Lagerungsorten der Spleißfaktoren, den Interchromatin Granulären Clustern (ICGs), (Zeng et al., 1997). Dieses legt nahe, dass es sich hierbei um Degradationprozesse vorübergehend nicht benötigter Proteine handelt. Die starke Überlappung der Interchromatin Granulären Cluster mit Bereichen hoher proteolytischer Aktivität, welche zudem Ubiquitin und Proteasomen enthalten, lässt eine weitere Deutung zu: Ähnlich der Spleißosomen könnten Proteasomen die erleichterte Diffusion in Interchromatin Domänen Kanäle (IDCs) zwischen Chromosomen-Terretorien (CTs) nutzen, um hohe lokale Konzentrationen von Substrat und Enzym zu erzeugen. Wie naszierende Primärtranskripte (Cremer et al., 2000) könnten IDCs frei diffundierende, nicht funktionstüchtige oder aus ihren funktionellen Komplexen fallende Proteine kanalisieren und sie zu

weiterverarbeitenden Proteinmaschinen, den nucleoplasmatischen Proteasomen leiten. Enzymatisch aktive Proteinmaschinen wie Spleißosomen oder Proteasomen erreichen in den IDCs auf diese Weise höhere Enzym-Substrat-Konzentrationen und damit eine effektivere enzymatische Umsetzung. Besonders stark wäre der Effekt der passiven Substratkanalisierung an Kreuzungspunkten der IDCs, welche somit die effektivsten Standorte für die katalytischen Proteinmaschinen sind. Die Verteilung der Spleißosomen und Proteasomen im Nucleus entspräche demnach der Lokalisation der IDCs, wobei die Bereiche mit hoher Dichte an Proteinmaschinen die Kreuzungspunkte der IDCs darstellen könnten. Die Kreuzungspunkte der IDCs wären demnach Interchromatin Granuläre Cluster (oder „Spleißinseln“) mit höchster Spleißosomendichte und Bereiche hoher Proteasomenkonzentration („Speckles“), welche Orte der proteasomalen Proteolyse im Nucleus sind.

Die stark überlappenden Interchromatin Granulären Cluster und die Bereiche mit hoher Proteasomendichte stellen nach dieser Theorie subnucleäre, katalytische Hotspots für Spleißing und Proteolyse im Nucleus dar.

VI.7 Proteolyse ist eine intrinsiche Funktion des Nucleus

Im Rahmen dieser Arbeit werden Techniken etabliert, mit deren Hilfe sich die proteasomale Aktivität *in situ*, speziell *in nucleo*, visualisieren lässt und die eine Beobachtung der nucleären

Proteolyse in lebenden Zellen ermöglichen. Die vorgestellten Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass proteasomale Proteolyse, ebenso wie Replikation, Transkription und Spleißing eine intrinsische Funktion des Nucleus ist.

VII Literaturverzeichnis

Adams,J., Behnke,M., Chen,S., Cruickshank,A.A., Dick,L.R., Grenier,L., Klunder,J.M., Ma,Y.T., Plamondon,L., and Stein,R.L. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. Bioorg. Med. Chem. Lett. *8*, 333-338.

Ahn,K., Erlander,M., Leturcq,D., Peterson,P.A., Fruh,K., and Yang,Y. (1996). In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. J. Biol. Chem. *271*, 18237-18242.

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.

Allen,T.D., Cronshaw,J.M., Bagley,S., Kiseleva,E., and Goldberg,M.W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. J. Cell Sci. *113 (Pt 10)*, 1651-1659.

Almeida,F., Saffrich,R., Ansorge,W., and Carmo-Fonseca,M. (1998). Microinjection of anti-coilin antibodies affects the structure of coiled bodies. J. Cell Biol. *142*, 899-912.

Andersen,J.S., Lyon,C.E., Fox,A.H., Leung,A.K., Lam,Y.W., Steen,H., Mann,M., and Lamond,A.I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. Curr. Biol. *12*, 1-11.

Andrade,L.E., Tan,E.M., and Chan,E.K. (1993). Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *90*, 1947-1951.

Anton,L.C., Schubert,U., Bacik,I., Princiotta,M.F., Wearsch,P.A., Gibbs,J., Day,P.M., Realini,C., Rechsteiner,M.C., Bennink,J.R., and Yewdell,J.W. (1999). Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. J. Cell Biol. *146*, 113-124.

Arabi,A., Rustum,C., Hallberg,E., and Wright,A.P. (2003). Accumulation of c-Myc and proteasomes at the nucleoli of cells containing elevated c-Myc protein levels. J. Cell Sci. *116*, 1707-1717.

Arcangeletti,C., Sutterlin,R., Aebi,U., De,C.F., Missorini,S., Chezzi,C., and Scherrer,K. (1997). Visualization of prosomes (MCP-proteasomes), intermediate filament and actin networks by "instantaneous fixation" preserving the cytoskeleton. J. Struct. Biol. *119*, 35-58.

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.

Baumeister,W., Walz,J., Zuhl,F., and Seemuller,E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. Cell *92*, 367-380.

Bell,P., Dabauvalle,M.C., and Scheer,U. (1992). In vitro assembly of prenucleolar bodies in Xenopus egg extract. J. Cell Biol. *118*, 1297-1304.

Ben-Shahar,S., Cassouto,B., Novak,L., Porgador,A., and Reiss,Y. (1997). Production of a specific major histocompatibility complex class I-restricted epitope by ubiquitin-dependent degradation of modified ovalbumin in lymphocyte lysate. J. Biol. Chem. *272*, 21060-21066.

Benavente,R., Rose,K.M., Reimer,G., Hugle-Dorr,B., and Scheer,U. (1987). Inhibition of nucleolar reformation after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into mitotic cells. J. Cell Biol. *105*, 1483-1491.

Berneburg,M., Grether-Beck,S., Kurten,V., Ruzicka,T., Briviba,K., Sies,H., and Krutmann,J. (1999). Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. J. Biol. Chem. *274*, 15345-15349.

Beyette,J.R. and Mykles,D.L. (1992). Immunocytochemical localization of the multicatalytic proteinase (proteasome) in crustacean striated muscles. Muscle Nerve *15*, 1023-1035.

Boes,B., Hengel,H., Ruppert,T., Multhaup,G., Koszinowski,U.H., and Kloetzel,P.M. (1994). Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. J. Exp. Med. *179*, 901-909.

Bogyo,M., McMaster,J.S., Gaczynska,M., Tortorella,D., Goldberg,A.L., and Ploegh,H. (1997). Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HslV by a new class of inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94*, 6629-6634.

Boisvert,F.M., Hendzel,M.J., and Bazett-Jones,D.P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. J. Cell Biol. *148*, 283-292.

Boukamp,P., Petrussevska,R.T., Breitkreutz,D., Hornung,J., Markham,A., and Fusenig,N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J. Cell Biol. *106*, 761-771.

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. Nature *378*, 416-419.

Breitschopf,K., Bengal,E., Ziv,T., Admon,A., and Ciechanover,A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. EMBO J. *17*, 5964-5973.

Brooks,P., Fuertes,G., Murray,R.Z., Bose,S., Knecht,E., Rechsteiner,M.C., Hendil,K.B., Tanaka,K., Dyson,J., and Rivett,J. (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. Biochem. J. *346 Pt 1*, 155-161.

Burke,B. (2001). The nuclear envelope: filling in gaps. Nat. Cell Biol. *3*, E273-E274.

Cascio,P., Call,M., Petre,B.M., Walz,T., and Goldberg,A.L. (2002). Properties of the hybrid form of the 26S proteasome containing both 19S and PA28 complexes. EMBO J. *21*, 2636-2645.

Chen,M., Rockel,T., Steinweger,G., Hemmerich,P., Risch,J., and von,M.A. (2002). Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. Mol. Biol. Cell *13*, 3576-3587.

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.

Chu-Ping,M., Vu,J.H., Proske,R.J., Slaughter,C.A., and DeMartino,G.N. (1994). Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. J. Biol. Chem. *269*, 3539-3547.

Ciechanover,A., Heller,H., Elias,S., Haas,A.L., and Hershko,A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *77*, 1365-1368.

Cole,S.T., Brosch,R., Parkhill,J., Garnier,T., Churcher,C., Harris,D., Gordon,S.V., Eiglmeier,K., Gas,S., Barry,C.E., III, Tekaia,F., Badcock,K., Basham,D., Brown,D., Chillingworth,T., Connor,R., Davies,R., Devlin,K., Feltwell,T., Gentles,S., Hamlin,N., Holroyd,S., Hornsby,T., Jagels,K., Barrell,B.G., and . (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature *393*, 537-544.

Coux,O., Nothwang,H.G., Silva,P., I, Recillas,T.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.

Cremer,T., Kreth,G., Koester,H., Fink,R.H., Heintzmann,R., Cremer,M., Solovei,I., Zink,D., and Cremer,C. (2000). Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. Crit Rev. Eukaryot. Gene Expr. *10*, 179-212.

Cremer,T., Kurz,A., Zirbel,R., Dietzel,S., Rinke,B., Schrock,E., Speicher,M.R., Mathieu,U., Jauch,A., Emmerich,P., and . (1993). Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *58*, 777-792.

Dahlmann,B., Becher,B., Sobek,A., Ehlers,C., Kopp,F., and Kuehn,L. (1993). In vitro activation of the 20S proteasome. Enzyme Protein *47*, 274-284.

Dahlmann,B., Kopp,F., Kuehn,L., Niedel,B., Pfeifer,G., Hegerl,R., and Baumeister,W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. FEBS Lett. *251*, 125-131.

Davarinos,N.A. and Pollenz,R.S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytosplasmic proteasome following nuclear export. J. Biol. Chem. *274*, 28708-28715.

De,C.F., Pilotti,E., Razin,S.V., Ferraglia,F., Geraud,G., Arcangeletti,C., and Scherrer,K. (2000). In mouse myoblasts nuclear prosomes are associated with the nuclear matrix and accumulate preferentially in the perinucleolar areas. J. Cell Sci. *113 (Pt 13)*, 2399-2407.

Degen,W.G., Aarssen,Y., Pruijn,G.J., Utz,P.J., and van Venrooij,W.J. (2000). The fate of U1 snRNP during anti-Fas induced apoptosis: specific cleavage of the U1 snRNA molecule. Cell Death. Differ. *7*, 70-79.

Deveraux,Q., Ustrell,V., Pickart,C., and Rechsteiner,M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. J. Biol. Chem. *269*, 7059-7061.

Dick,L.R., Aldrich,C., Jameson,S.C., Moomaw,C.R., Pramanik,B.C., Doyle,C.K., DeMartino,G.N., Bevan,M.J., Forman,J.M., and Slaughter,C.A. (1994). Proteolytic processing of ovalbumin and beta-galactosidase by the proteasome to a yield antigenic peptides. J. Immunol. *152*, 3884-3894.

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

Dick,T.P., Ruppert,T., Groettrup,M., Kloetzel,P.M., Kuehn,L., Koszinowski,U.H., Stevanovic,S., Schild,H., and Rammensee,H.G. (1996b). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. Cell *86*, 253-262.

Diehl,J.A., Cheng,M., Roussel,M.F., and Sherr,C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes Dev. *12*, 3499-3511.

Driscoll,J. and Goldberg,A.L. (1990). The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. J. Biol. Chem. *265*, 4789-4792.

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.

Eils,R., Dietzel,S., Bertin,E., Schrock,E., Speicher,M.R., Ried,T., Robert-Nicoud,M., Cremer,C., and Cremer,T. (1996). Three-dimensional reconstruction of painted human interphase chromosomes: active and inactive X chromosome territories have similar volumes but differ in shape and surface structure. J. Cell Biol. *135*, 1427-1440.

Esquivel,F., Yewdell,J., and Bennink,J. (1992). RMA/S cells present endogenously synthesized cytosolic proteins to class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. *175*, 163-168.

Fabunmi,R.P., Wigley,W.C., Thomas,P.J., and DeMartino,G.N. (2001). Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. J. Cell Sci. *114*, 29-36.

Fabunmi,R.P., Wigley,W.C., Thomas,P.J., and DeMartino,G.N. (2000). Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. J. Biol. Chem. *275*, 409-413.

Fenteany,G., Standaert,R.F., Reichard,G.A., Corey,E.J., and Schreiber,S.L. (1994). A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *91*, 3358-3362.

Ferdous,A., Gonzalez,F., Sun,L., Kodadek,T., and Johnston,S.A. (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. Mol. Cell *7*, 981-991.

Ferrell,K., Wilkinson,C.R., Dubiel,W., and Gordon,C. (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends Biochem. Sci. *25*, 83-88.

Finley,D., Sadis,S., Monia,B.P., Boucher,P., Ecker,D.J., Crooke,S.T., and Chau,V. (1994). Inhibition of proteolysis and cell

cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. Mol. Cell Biol. *14*, 5501-5509.

Floyd,Z.E., Trausch-Azar,J.S., Reinstein,E., Ciechanover,A., and Schwartz,A.L. (2001). The nuclear ubiquitin-proteasome system degrades MyoD. J. Biol. Chem. *276*, 22468-22475.

Folin,O. (1975). The American Journal of Physiology Volume XIII: 117-138, 1905. A theory of protein metabolism. Nutr. Rev. *33*, 141-143.

Freedman,D.A. and Levine,A.J. (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. Mol. Cell Biol. *18*, 7288-7293.

Fu,X.D. and Maniatis,T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. Nature *343*, 437-441.

Gaczynska,M., Rock,K.L., and Goldberg,A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. Nature *365*, 264-267.

Gall,J.G. (2000). Cajal bodies: the first 100 years. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *16*, 273-300.

Gall,J.G. (2001). A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. FEBS Lett. *498*, 164-167.

Gerace,L. and Blobel,G. (1982). Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *46 Pt 2*, 967-978.

Glickman,M.H., Rubin,D.M., Coux,O., Wefes,I., Pfeifer,G., Cjeka,Z., Baumeister,W., Fried,V.A., and Finley,D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. Cell *94*, 615-623.

Glotzer,M., Murray,A.W., and Kirschner,M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature *349*, 132-138.

Gorlich,D. and Kutay,U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *15*, 607-660.

Goulet,B., Baruch,A., Moon,N.S., Poirier,M., Sansregret,L.L., Erickson,A., Bogyo,M., and Nepveu,A. (2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. Mol. Cell *14*, 207-219.

Groettrup,M., Soza,A., Eggers,M., Kuehn,L., Dick,T.P., Schild,H., Rammensee,H.G., Koszinowski,U.H., and Kloetzel,P.M. (1996a). A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. Nature *381*, 166-168.

Groettrup,M., Soza,A., Kuckelkorn,U., and Kloetzel,P.M. (1996b). 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 A resolution. Nature *386*, 463-471.

Grossi de Sa,M.F., Martins De,S.C., Harper,F., Coux,O., Akhayat,O., Pal,J.K., Florentin,Y., and Scherrer,K. (1988). Cytolocalization of prosomes as a function of differentiation. J. Cell Sci. *89 (Pt 2)*, 151-165.

Hang,J. and Dasso,M. (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. J. Biol. Chem. *277*, 19961-19966.

Harris,H., Sidebottom,E., Grace,D.M., and Bramwell,M.E. (1969). The expression of genetic information: a study with hybrid animal cells. J. Cell Sci. *4*, 499-525.

Hendil,K.B. (1988). The 19 S multicatalytic "prosome" proteinase is a constitutive enzyme in HeLa cells. Biochem. Int. *17*, 471-477.

Hendil,K.B., Khan,S., and Tanaka,K. (1998). Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. Biochem. J. *332 (Pt 3)*, 749-754.

Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem. *67*, 425-479.

Hershko,A., Ciechanover,A., Heller,H., Haas,A.L., and Rose,I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *77*, 1783-1786.

Higashitsuji,H., Itoh,K., Nagao,T., Dawson,S., Nonoguchi,K., Kido,T., Mayer,R.J., Arii,S., and Fujita,J. (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. Nat. Med. *6*, 96-99.

Hochstrasser,M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. Annu. Rev. Genet. *30*, 405-439.

Hoffman,L. and Rechsteiner,M. (1996). Regulatory features of multicatalytic and 26S proteases. Curr. Top. Cell Regul. *34*, 1-32.

Hughes,A.L. (1997). Evolution of the proteasome components. Immunogenetics *46*, 82-92.

Hugle,B., Kleinschmidt,J.A., and Franke,W.W. (1983). The 22 S cylinder particles of Xenopus laevis. II. Immunological characterization and localization of their proteins in tissues and cultured cells. Eur. J. Cell Biol. *32*, 157-163.

Jiang,J. and Struhl,G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. Nature *391*, 493-496.

Joazeiro,C.A., Wing,S.S., Huang,H., Leverson,J.D., Hunter,T., and Liu,Y.C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. Science *286*, 309-312.

Johnston,J.A., Ward,C.L., and Kopito,R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. J. Cell Biol. *143*, 1883-1898.

Kamakura,K., Ishiura,S., Nonaka,I., and Sugita,H. (1988). Localization of ingensin in rat central nervous system and skeletal muscle. J. Neurosci. Res. *20*, 473-478.

Kania,M.A., DeMartino,G.N., Baumeister,W., and Goldberg,A.L. (1996). The proteasome subunit, C2, contains an important site for binding of the PA28 (11S) activator. Eur. J. Biochem. *236*, 510-516.

Kiesslich,A., von,M.A., and Hemmerich,P. (2002). Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells. J. Struct. Biol. *140*, 167-179.

King,R.W., Deshaies,R.J., Peters,J.M., and Kirschner,M.W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. Science *274*, 1652-1659.

Kirschner,R.J. and Goldberg,A.L. (1983). A high molecular weight metalloendoprotease from the cytosol of mammalian cells. J. Biol. Chem. *258*, 967-976.

Kishino,T., Lalande,M., and Wagstaff,J. (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. Nat. Genet. *15*, 70-73.

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.

Kisselev,A.F., Garcia-Calvo,M., Overkleeft,H.S., Peterson,E., Pennington,M.W., Ploegh,H.L., Thornberry,N.A., and Goldberg,A.L. (2003). The caspase-like sites of proteasomes, their substrate speci-

ficity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. J. Biol. Chem. *278*, 35869-35877.

Kisselev,A.F., Kaganovich,D., and Goldberg,A.L. (2002). Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 S proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. J. Biol. Chem. *277*, 22260-22270.

Kloetzel,P.M., Falkenburg,P.E., Hossl,P., and Glatzer,K.H. (1987). The 19S ring-type particles of Drosophila. Cytological and biochemical analysis of their intracellular association and distribution. Exp. Cell Res. *170*, 204-213.

Knecht,E., Palmer,A., Sweeney,S.T., and Rivett,A.J. (1991). Immunocytochemical localization of the multicatalytic proteinase in rat liver and in L-132 cells. Biochem. Soc. Trans. *19*, 293S.

Knop,M., Schiffer,H.H., Rupp,S., and Wolf,D.H. (1993). Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. Curr. Opin. Cell Biol. *5*, 990-996.

Koegl,M., Hoppe,T., Schlenker,S., Ulrich,H.D., Mayer,T.U., and Jentsch,S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. Cell *96*, 635-644.

Kopito,R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends Cell Biol. *10*, 524-530.

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., Dahlmann,B., and Kuehn,L. (2001). Reconstitution of hybrid proteasomes from purified PA700-20 S complexes and PA28alphabeta activator: ultrastructure and peptidase activities. J. Mol. Biol. *313*, 465-471.

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.

Kubbutat,M.H., Jones,S.N., and Vousden,K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature *387*, 299-303.

Kuehn,L., Dahlmann,B., and Reinauer,H. (1991). Tissue-specific changes of multicatalytic proteinase activity in the fasted rat. Acta Biol. Hung. *42*, 175-182.

Kumatori,A., Tanaka,K., Inamura,N., Sone,S., Ogura,T., Matsumoto,T., Tachikawa,T., Shin,S., and Ichihara,A. (1990). Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *87*, 7071-7075.

Kurz,A., Lampel,S., Nickolenko,J.E., Bradl,J., Benner,A., Zirbel,R.M., Cremer,T., and Lichter,P. (1996). Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories. J. Cell Biol. *135*, 1195-1205.

Lafarga,M., Berciano,M.T., Pena,E., Mayo,I., Castano,J.G., Bohmann,D., Rodrigues,J.P., Tavanez,J.P., and Carmo-Fonseca,M. (2002). Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. Mol. Biol. Cell *13*, 2771-2782.

Lallemand-Breitenbach,V., Zhu,J., Puvion,F., Koken,M., Honore,N., Doubeikovsky,A., Duprez,E., Pandolfi,P.P., Puvion,E., Freemont,P., and de,T.H. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. J. Exp. Med. *193*, 1361-1371.

Lamond,A.I. and Earnshaw,W.C. (1998). Structure and function in the nucleus. Science *280*, 547-553.

LaMorte,V.J., Dyck,J.A., Ochs,R.L., and Evans,R.M. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *95*, 4991-4996.

Lee,D.H. and Goldberg,A.L. (1996). Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. *271*, 27280-27284.

Lee,K.B., Wang,D., Lippard,S.J., and Sharp,P.A. (2002). Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *99*, 4239-4244.

Lehmann,A., Janek,K., Braun,B., Kloetzel,P.M., and Enenkel,C. (2002). 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. J. Mol. Biol. *317*, 401-413.

Lelouard,H., Gatti,E., Cappello,F., Gresser,O., Camosseto,V., and Pierre,P. (2002). Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. Nature *417*, 177-182.

Levitskaya,J., Sharipo,A., Leonchiks,A., Ciechanover,A., and Masucci,M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *94*, 12616-12621.

Lewis,J.D. and Tollervey,D. (2000). Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. Science *288*, 1385-1389.

Lisztwan,J., Imbert,G., Wirbelauer,C., Gstaiger,M., and Krek,W. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. Genes Dev. *13*, 1822p-1833.

Ma,C.P., Slaughter,C.A., and DeMartino,G.N. (1992). Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). J. Biol. Chem. *267*, 10515-10523.

Machiels,B.M., Henfling,M.E., Broers,J.L., Hendil,K.B., and Ramekers,F.C. (1995). Changes in immunocytochemical detectability of proteasome epitopes depending on cell growth and fixation conditions of lung cancer cell lines. Eur. J. Cell Biol. *66*, 282-292.

Mattsson,K., Pokrovskaja,K., Kiss,C., Klein,G., and Szekely,L. (2001). Proteins associated with the promyelocytic leukemia gene product (PML)-containing nuclear body move to the nucleolus upon inhibition of proteasome-dependent protein degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *98*, 1012-1017.

McCracken,A.A. and Brodsky,J.L. (2000). A molecular portrait of the response to unfolded proteins. Genome Biol. *1*, REVIEWS1013.

Meyerdierks,A., Denecke,B., Rohde,M., Taparowsky,E.J., and Bottger,E.C. (1999). A cytoplasmic structure resembling large protein aggregates induced by interferons. J. Histochem. Cytochem. *47*, 169-182.

Moir,R.D., Yoon,M., Khuon,S., and Goldman,R.D. (2000). Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. J. Cell Biol. *151*, 1155-1168.

Nicholson,D.W., Ali,A., Thornberry,N.A., Vaillancourt,J.P., Ding,C.K., Gallant,M., Gareau,Y., Griffin,P.R., Labelle,M., Lazebnik,Y.A., and . (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature *376*, 37-43.

Nyman,U., Hallman,H., Hadlaczky,G., Pettersson,I., Sharp,G., and Ringertz,N.R. (1986). Intranuclear localization of snRNP antigens. J. Cell Biol. *102*, 137-144.

Ogura,T. and Wilkinson,A.J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. Genes Cells *6*, 575-597.

Olink-Coux,M., Arcangeletti,C., Pinardi,F., Minisini,R., Huesca,M., Chezzi,C., and Scherrer,K. (1994). Cytolocation of prosome antigens

on intermediate filament subnetworks of cytokeratin, vimentin and desmin type. J. Cell Sci. *107 (Pt 3)*, 353-366.

Olson,M.O. (2004). Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? Sci. STKE. *2004*, e10.

Orlowski,M., Cardozo,C., and Michaud,C. (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. Biochemistry *32*, 1563-1572.

Paine,P.L., Moore,L.C., and Horowitz,S.B. (1975). Nuclear envelope permeability. Nature *254*, 109-114.

Palmer,A., Mason,G.G., Paramio,J.M., Knecht,E., and Rivett,A.J. (1994). Changes in proteasome localization during the cell cycle. Eur. J. Cell Biol. *64*, 163-175.

Palmer,A., Rivett,A.J., Thomson,S., Hendil,K.B., Butcher,G.W., Fuertes,G., and Knecht,E. (1996). Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. Biochem. J. *316 (Pt 2)*, 401-407.

Palombella,V.J., Rando,O.J., Goldberg,A.L., and Maniatis,T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. Cell *78*, 773-785.

Patturajan,M., Schulte,R.J., Sefton,B.M., Berezney,R., Vincent,M., Bensaude,O., Warren,S.L., and Corden,J.L. (1998). Growth-related changes in phosphorylation of yeast RNA polymerase II. J. Biol. Chem. *273*, 4689-4694.

Pederson,T. (1998). The plurifunctional nucleolus. Nucleic Acids Res. *26*, 3871-3876.

Pfaller,R., Smythe,C., and Newport,J.W. (1991). Assembly/disassembly of the nuclear envelope membrane: cell cycle-dependent binding of nuclear membrane vesicles to chromatin in vitro. Cell *65*, 209-217.

Pickart,C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. Annu. Rev. Biochem. *70*, 503-533.

Pitzer,F., Dantes,A., Fuchs,T., Baumeister,W., and Amsterdam,A. (1996). Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death. FEBS Lett. *394*, 47-50.

Ratner,S., Rittenberg,D., Keston,A.S., and Schoenheimer,R. (1987). The Journal of Biological Chemistry, Volume 134, June 1940: Studies in protein metabolism. XIV. The chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats. By S. Ratner, D. Rittenberg, Albert S. Keston, and Rudolf Schoenheimer. Nutr. Rev. *45*, 310-312.

Rechsteiner,M., Realini,C., and Ustrell,V. (2000). The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. Biochem. J. *345 Pt 1*, 1-15.

Reimer,G., Pollard,K.M., Penning,C.A., Ochs,R.L., Lischwe,M.A., Busch,H., and Tan,E.M. (1987). Monoclonal autoantibody from a (New Zealand black x New Zealand white)F1 mouse and some human scleroderma sera target an Mr 34,000 nucleolar protein of the U3 RNP particle. Arthritis Rheum. *30*, 793-800.

Reits,E., Griekspoor,A., Neijssen,J., Groothuis,T., Jalink,K., van,V.P., Janssen,H., Calafat,J., Drijfhout,J.W., and Neefjes,J. (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. Immunity. *18*, 97-108.

Reits,E.A., Benham,A.M., Plougastel,B., Neefjes,J., and Trowsdale,J. (1997). Dynamics of proteasome distribution in living cells. EMBO J. *16*, 6087-6094.

Rivett,A.J., Palmer,A., and Knecht,E. (1992). Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. J. Histochem. Cytochem. *40*, 1165-1172.

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.

Rockel,TD. and von,M.A. (2002). Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. J. Struct. Biol. *140*, 189-199.

Rodriguez,M.S., Thompson,J., Hay,R.T., and Dargemont,C. (1999). Nuclear retention of IkappaBalpha protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. J. Biol. Chem. *274*, 9108-9115.

Rothblum,L.I., Mamrack,P.M., Kunkle,H.M., Olson,M.O., and Busch,H. (1977). Fractionation of nucleoli. Enzymatic and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic analysis. Biochemistry *16*, 4716-4721.

Ryabova,L.V., Virtanen,I., Olink-Coux,M., Scherrer,K., and Vassetzky,S.G. (1994). Distribution of prosome proteins and their relationship with the cytoskeleton in oogenesis of Xenopus laevis. Mol. Reprod. Dev. *37*, 195-203.

Ryan,K.J. and Wente,S.R. (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. Curr. Opin. Cell Biol. *12*, 361-371.

Salomoni,P. and Pandolfi,P.P. (2002). The role of PML in tumor suppression. Cell *108*, 165-170.

Sathasivam,K., Woodman,B., Mahal,A., Bertaux,F., Wanker,E.E., Shima,D.T., and Bates,G.P. (2001). Centrosome disorganization in

fibroblast cultures derived from R6/2 Huntington's disease (HD) transgenic mice and HD patients. Hum. Mol. Genet. *10*, 2425-2435.

Schardin,M., Cremer,T., Hager,H.D., and Lang,M. (1985). Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. Hum. Genet. *71*, 281-287.

Scheer,U. and Hock,R. (1999). Structure and function of the nucleolus. Curr. Opin. Cell Biol. *11*, 385-390.

Scheffner,M., Werness,B.A., Huibregtse,J.M., Levine,A.J., and Howley,P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell *63*, 1129-1136.

Schubert,U., Anton,L.C., Gibbs,J., Norbury,C.C., Yewdell,J.W., and Bennink,J.R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. Nature *404*, 770-774.

Seeger,M., Ferrell,K., Frank,R., and Dubiel,W. (1997). HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. J. Biol. Chem. *272*, 8145-8148.

Seksek,O., Biwersi,J., and Verkman,A.S. (1997). Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. J. Cell Biol. *138*, 131-142.

Shin,J. (1998). P62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism. Arch. Pharm. Res. *21*, 629-633.

Shirangi,T.R., Zaika,A., and Moll,U.M. (2002). Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage. FASEB J. *16*, 420-422.

Shou,W., Seol,J.H., Shevchenko,A., Baskerville,C., Moazed,D., Chen,Z.W., Jang,J., Shevchenko,A., Charbonneau,H., and Deshaies,R.J. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent

release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. Cell *97*, 233-244.

Song,X., Mott,J.D., von,K.J., Pramanik,B., Tanaka,K., Slaughter,C.A., and DeMartino,G.N. (1996). A model for the quaternary structure of the proteasome activator PA28. J. Biol. Chem. *271*, 26410-26417.

Spector,D.L. (2001). Nuclear domains. J. Cell Sci. *114*, 2891-2893.

Spence,J., Sadis,S., Haas,A.L., and Finley,D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. Mol. Cell Biol. *15*, 1265-1273.

Stein,R.L., Melandri,F., and Dick,L. (1996). Kinetic characterization of the chymotryptic activity of the 20S proteasome. Biochemistry *35*, 3899-3908.

Stoffler,D., Fahrenkrog,B., and Aebi,U. (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. Curr. Opin. Cell Biol. *11*, 391-401.

Stohwasser,R., Salzmann,U., Giesebrecht,J., Kloetzel,P.M., and Holzhutter,H.G. (2000). Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. Eur. J. Biochem. *267*, 6221-6230.

Strahl,B.D. and Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. Nature *403*, 41-45.

Tanahashi,N., Murakami,Y., Minami,Y., Shimbara,N., Hendil,K.B., and Tanaka,K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. J. Biol. Chem. *275*, 14336-14345.

Tanaka,K., Kumatori,A., Ii,K., and Ichihara,A. (1989). Direct evidence for nuclear and cytoplasmic colocalization of proteasomes (multiprotease complexes) in liver. J. Cell Physiol *139*, 34-41.

Tanaka,K., Yoshimura,T., Ichihara,A., Kameyama,K., and Takagi,T. (1986). A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. II. Properties of the purified enzyme. J. Biol. Chem. *261*, 15204-15207.

Tanaka,K., Yoshimura,T., Tamura,T., Fujiwara,T., Kumatori,A., and Ichihara,A. (1990). Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. FEBS Lett. *271*, 41-46.

Terrell,J., Shih,S., Dunn,R., and Hicke,L. (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. Mol. Cell *1*, 193-202.

Tomoda,K., Kubota,Y., and Kato,J. (1999). Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. Nature *398*, 160-165.

Tsuneoka,M. and Mekada,E. (1992). Degradation of a nuclear-localized protein in mammalian COS cells, using Escherichia coli beta-galactosidase as a model protein. J. Biol. Chem. *267*, 9107-9111.

van,H.T., Sijts,A., Camps,M., Offringa,R., Melief,C., Kloetzel,P.M., and Ossendorp,F. (2000). Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. J. Exp. Med. *192*, 483-494.

Vijay-Kumar,S., Bugg,C.E., Wilkinson,K.D., Vierstra,R.D., Hatfield,P.M., and Cook,W.J. (1987). Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. J. Biol. Chem. *262*, 6396-6399.

Viscidi,R.P., Mayur,K., Lederman,H.M., and Frankel,A.D. (1989). Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. Science *246*, 1606-1608.

von,M.A., Zhang,S., Montminy,M., Tan,E.M., and Hemmerich,P. (2000). CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II

colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. J. Cell Biol. *150*, 265-273.

Vousden,K.H. and Woude,G.F. (2000). The ins and outs of p53. Nat. Cell Biol. *2*, E178-E180.

Wang,H.R., Kania,M., Baumeister,W., and Nederlof,P.M. (1997). Import of human and Thermoplasma 20S proteasomes into nuclei of HeLa cells requires functional NLS sequences. Eur. J. Cell Biol. *73*, 105-113.

Wansink,D.G., Sibon,O.C., Cremers,F.F., van,D.R., and de,J.L. (1996). Ultrastructural localization of active genes in nuclei of A431 cells. J. Cell Biochem. *62*, 10-18.

Wente,S.R. (2000). Gatekeepers of the nucleus. Science *288*, 1374-1377.

Werner,E.D., Brodsky,J.L., and McCracken,A.A. (1996). Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *93*, 13797-13801.

Wojcik,C. (1997a). An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the proteasome (PSI) induces similar morphological changes in various cell lines. Folia Histochem. Cytobiol. *35*, 211-214.

Wojcik,C. (1997b). On the spatial organization of ubiquitin-dependent proteolysis in HeLa cells. Folia Histochem. Cytobiol. *35*, 117-118.

Wojcik,C. and DeMartino,G.N. (2003). Intracellular localization of proteasomes. Int. J. Biochem. Cell Biol. *35*, 579-589.

Wojcik,C., Paweletz,N., and Schroeter,D. (1995). Localization of proteasomal antigens during different phases of the cell cycle in HeLa cells. Eur. J. Cell Biol. *68*, 191-198.

Yewdell,J.W., Anton,L.C., and Bennink,J.R. (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? J. Immunol. *157*, 1823-1826.

Zeng,C., Kim,E., Warren,S.L., and Berget,S.M. (1997). Dynamic relocation of transcription and splicing factors dependent upon transcriptional activity. EMBO J. *16*, 1401-1412.

Zhang,Y. and Xiong,Y. (2001). Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. Cell Growth Differ. *12*, 175-186.

Zhang,Z., Krutchinsky,A., Endicott,S., Realini,C., Rechsteiner,M., and Standing,K.G. (1999). Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG alpha/REG beta hetero-oligomers are heptamers. Biochemistry *38*, 5651-5658.

Zhong,S., Salomoni,P., and Pandolfi,P.P. (2000). The transcriptional role of PML and the nuclear body. Nat. Cell Biol. *2*, E85-E90.

VIII Anhang

Die Nomenklatur der Proteasomenuntereinheiten ist nicht standardisiert und unterscheidet sich in den untersuchten Spezies. In der vorliegenden Arbeit wird die von Baumeister et al. und Coux et al. vorgeschlagene systematische Nomenklatur für Proteasomenuntereinheiten verwendet (Baumeister et al., 1998; Coux et al., 1994):

Für die Untereinheiten des 20 Proteasoms:

Systematic nomenclature[1]	Gene name Human	Gene name Yeast (S.c.)	NCBI Accession # Human	NCBI Accession # Yeast (S.c.)	'Old' nomenclature	Seq. length (amino acids)	MW (Da)	Theoretical pI	Chromosomal locus (human)	Coux *et al.*[2] nomenclature	Groll *et al.*[4] nomenclature	Miscellaneous nomenclature
20S α-type subunits												
20S proteasome subunit α-6	PSMA1	PRE5	P25786	P40302	C2	263	29556	6.15	11q15.1	Pro-α5	α6_sc	nu, Pros 30, p30k, Pre5
20S proteasome subunit α-2	PSMA2	PRS4	P25787	P23639	C3	233	25767	7.12	6q27	Pro-α2	α2_sc	Pre8, Prs4, Y7
20S proteasome subunit α-7	PSMA3	PRS1	P25788	P21242	C8	254	28302	5.19	14q23	Pro-α7	α7_sc	Pre10, Prs1, C1, Prc1
20S proteasome subunit α-3	PSMA4	PRS5	P25789	P23638	C9	261	29483	7.58		Pro-α4	α3_sc	Pre9, Prs5, Y13
20S proteasome subunit α-5	PSMA5	PUP2	P28066	P32379	zeta	241	26469	4.69		Pro-α1	α5_sc	Pup2, Doa5
20S proteasome subunit α-1	PSMA6	PRS2	P34062	P21243	iota	246	27399	6.35	14q13	Pro-α6	α1_sc	Pros27, p27k, C7, Prs2, Y8, Prc2, Srl1
20S proteasome subunit α-4	PSMA7	PRE6	AAB81515	P40303	C6-S C6-L	248	27887	8.60		Pro-α3	α4_sc	XAPC-7, Pre6
20S β-type subunits												
20S proteasome subunit β-6	PSMB1	PRS3	P20618	P23724	C5	241	26489	8.27	7p12-13	Pro-β5	β6_sc	gamma, Pre7, Prs3, C5, Pts1
20S proteasome subunit β-4	PSMB2	PRE1	P49721	P22141	C7	201	22836	6.52	1p34.2	Pro-β4	β4_sc	Pre1, C11
20S proteasome subunit β-3	PSMB3	PUP3	P49720	P25451	C10	205	22931	6.14	2q35	Pro-β6	β3_sc	theta, Pup3
20S proteasome subunit β-7	PSMB4	PRE4	P28070	P30657	N3	219	24380	5.47	1q21	Pro-β7	β7_sc	beta, Pros26, Pre4 epsilon, Lmp17,
20S proteasome subunit β-5	PSMB5	PRE2	P28074	P30656	X	204	22458	8.66	14q11.2	Pro-β1	β5_sc	MB1, Pre2, Doa3, Pnn1
20S proteasome subunit β-1	PSMB6	PRE3	P28072	P38624	Y	205	21862	4.91	17p13	Pro-β3	β1_sc	delta, Lmp9, Pre3 Lmp19, MC14,
20S proteasome subunit β-2	PSMB7	PUP1	Q99436	P25043	Z	277	29965	7.58	9q34.11-q34.12	Pro-β2	β2_sc	Pup1
20S proteasome subunit β-5i	PSMB8	-	P28062	-	Lmp7-E1 Lmp7-E2	204	22660 30354	7.59 7.18	6p21.3 6p21.3	Pro-β1		Ring10, Y2, C13
20S proteasome subunit β-1i	PSMB9	-	P28065	-	Lmp2	199	21276	4.80	6p21.3	Pro-β3		Ring12
20S proteasome subunit β-2i	PSMB10	-	P40306	-	MECL-1	234	24648	6.07	16q22.1	Pro-β2		Lmp10

Für die Untereinheiten des 19S Regulators:

Systematic nomenclature[2]	Gene name Human	Gene name Yeast (S.c.)	NCBI Accession # Human	NCBI Accession # Yeast (S.c.)	Dubiel *et al.*[3] 'human' nomenclature	Seq. length (amino acids)	MW (Da)	Theoretical pI	Chromosomal locus	Miscellaneous nomenclature		
19S (PA700) regulator ATPase subunits												
19S regulator subunit Rpt2	PSMC1	YTA5	Q03527	P40327	S4	440	49185	5.68	19p13.3	p56	Yhs4, Yta5, Mts2	
19S regulator subunit Rpt1	PSMC2	CIM5	P35998	P33299	S7	433	48634	5.71	7q22.1-q22.3	p48	Mss1, Yta3, Cim5	
19S regulator subunit Rpt5	PSMC3	YTA1	P17980	P33297	S6a	439	49118	5.08	11p11.2	p50	Tbp1, Yta1	
19S regulator subunit Rpt3	PSMC4	YTA2	P43686	P33298	S6b	418	47336	5.09	19q13.11-q13.13	p48	Tbp7, Yta2, Ynt1, MS73	
19S regulator subunit Rpt6	PSMC5	SUG1	P47210	Q01939	S8	406	45653	8.23	17q23.1-q23.3	p45	Trip1, Sug1, Cim3, Crl3, Tby1, Tbp10, m56	
19S regulator subunit Rpt4	PSMC6	SUG2	Q92524	P53549	S10b	389	44161	7.09	12q15	p42	Sug2, Pcs1, Crl13, CADp44	
19S (PA700) regulator non-ATPase subunits												
19S regulator subunit Rpn2	PSMD1	SEN3	Q99460	S48369	S1	953	105866 (90512	5.25 5.47	2q37.1-q37.2	p112-L p112-S)	Sen3	
19S regulator subunit Rpn1	PSMD2	HRD2	Q13200	S46779	S2	909	100217	5.10		p97	Trap2, Nas1, Hrd2, Rpd1, Mts4	
19S regulator subunit Rpn3	PSMD3	SUN2	O43242	S50479	S3	534	61005	8.47		p58	Sun2	
19S regulator subunit Rpn4		SON1	S41986	S41986		531	60152				Son1, Ufd5	
19S regulator subunit Rpn10	PSMD4	SUN1	P55036	S46677	S5a	377	40737	4.68		p54	ASF1, Sun1, Mcb1, Mbp1	
	PSMD5		Q16401		S5b	504	56196	5.35		p50.5		
19S regulator subunit Rpn7	PSMD6		Q15008	S59773	S10a	389	45531	5.34		p44	HUMORF07	
19S regulator subunit Rpn8	PSMD7	YOR261C	P51665	S67158	S12	324	37060	6.11	16q22.2	p40	Mov-34, Nas3	
19S regulator subunit Rpn12	PSMD8	NIN1	P48556	S27434	S14	257	30004	6.85		p31	Nin1, Mts3	
	PSMD9	NAS2	O00233		S15	209	22764	5.38	12q24.31-q24.32	p27-L		
	PSMD10		O75832			226	24428	5.71		p28	p27, Nas2	
19S regulator subunit Rpn6	PSMD11	YDL097C	O00231	S67639	S9	422	47464	6.08		p44.5	Nas4/67	
19S regulator subunit Rpn5	PSMD12	YDL147W	O00232	S67695		456	52904	7.53		p55	Nas5	
19S regulator subunit Rpn9	PSMD13		O75831	S69708	S11	376	42945	5.53		p40.5	Les1, Nas7	
19S regulator subunit Rpn11	PSMD14	MPR1	O00487	S56259	S13	310	34577	6.06			Poh1, Mpr1, Pad1	

Für die Untereinheiten des PA28 Regulators:

Systematic nomenclature	Gene name Human	NCBI Accession # Human	Seq. length (amino acids)	MW (Da)	Theoretical pI	Chromosomal locus	Miscellaneous nomenclature		
11S regulator subunit α	PSME1	P97371	249	28703	5.73	14q11.2	PA28α	REGα	
11S regulator subunit β	PSME2	P97372	239	27083	5.54	14q11.2	PA28β	REGβ	
11S regulator subunit γ	PSME3	P97373	254	29416	5.68	17q21.32-q21.33	PA28γ	REGγ	Ki antigen

Literatur

1. Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. and Seemüller, E. Cell, **92**, 367-380 (1998)
2. Coux, O., Northwang, H.G., Silva Pereira, I., Recillas Targa, F., Bey, F. and Scherrer, K. Mol. Gen.Genet., **245**, 769-780 (1994)
3. Dubiel, W., Ferrell, K. and Rechsteiner, M. Mol. Biol. Reports, **21**, 27-34 (1995)
4. Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. Nature, **386**, 463-471 (1997)
5. Finley, D. *et al*., TIBS, **23**, 244-245 (1998)
6. Tanaka, K. Biochem. Biophys. Res. Commun., **247**, 537-541 (1998)
7. Deng, X-W., Dubiel, W., Wei, N., Hoffman, K., Mundt, K., Colicelli, J., Kato, J., Naumann, M., Segal, D., Seegar, M., Glickman, M., Chamovitz, D.A., Carr, A. Trends in Genetics, 16, 202-203 (2000)

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle PD. Dr. Anna von Mikecz für die gute wissenschaftliche Betreuung und die konstruktive Kritik.

Herrn Prof. Joachim Ernst vom Institut für Mikrobiologie der Universität Düsseldorf danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und dessen Begutachtung.

Prof. Helmut Sies und Dr. Dominik Stuhlmann vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie I in Düsseldorf danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Einführung in die Mikroinjektionstechnik.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des IUF, insbesondere an meine Kollegen Min und Andrea für zahllose wissenschaftliche Anregungen und stetige Hilfsbereitschaft.

Großen Dank schulde ich auch Kasi, Maryam, Tobias, Conny und den anderen Doktoranden, Diplomanden und Assistenten die nicht nur die Arbeit an der Laborfront erledigen, sondern sich auch für die gute Stimmung verantwortlich zeichnen.

Ich danke dem Verlag des 'Journal of Cell Science', the Company of Biologists, Cambridge, England, für die Abdruckgenehmigung der bereits veröffentlichten Forschungsergebnisse.

Ganz besonders herzlich Danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Vater Hartmut und seiner Frau Christa, meinen Freunden und meiner Freundin Nicole für den Rückhalt, die Unterstützung und die nötige Ablenkung außerhalb des Instituts.

Die Promotionsarbeit wurde von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG)
im Rahmen des Sonderforschungsbereiches (SFB) 503 „Exogene Noxen“ unterstützt.

Teile der Dissertation sind in der Novemberausgabe des ‚Journal of Cell Science‘
veröffentlicht.[J Cell Sci. 2005 Nov 15; 118(Pt 22):5231-42. Epub 2005 Oct 25.]