

Technische Universität München

**Isolierung und Kristallisation des  
20S-Proteasoms  
aus *Saccharomyces cerevisiae***

Diplomarbeit

vorgelegt von  
Michael Groll

München, 1995

Für meine Eltern.

Da ich oft nur wenig über mein Studium und meine Arbeit gesprochen habe, möchte ich mich mit den in der Diplomarbeit und im Diplomzeugnis erhaltenen sehr guten Resultaten bei Euch herzlich bedanken; — ohne Euer andauernde Unterstützung in all den Jahren wäre eine Laufbahn als Naturwissenschaftler lediglich ein nicht realisierbarer Wunschtraum gewesen.

Technische Universität München

Diplomarbeit

Thema:

Isolierung und Kristallisation des

20S-Proteasoms

aus *Saccharomyces cerevisiae*

vorgelegt von: Michael Groll

am: 17.12.1995

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. R. Huber



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Robert Huber in der Zeit vom Mai 1995 bis November 1995 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Herrn Prof. Dr. Robert Huber, deren Unterstützung ich mir ständig und in jeglicher Hinsicht gewiß sein konnte. Ohne deren Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau D. Stock und Herrn L. Ditzel danke ich für die Einführung in die Thematik.

Mein Dank gilt Herrn Dr. H. Bartunik für die Betreuung während der Meßzeit am Deutschen Elektronen Synchrotron in Hamburg.

Herrn J. Löwe danke ich für die Zusammenarbeit in der Datenauswertung.

Für die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese und die Bestimmung der Proteinsequenzen möchte ich mich bei der Abteilung für Proteinchemie am Max-Planck-Institut bedanken.

Frau U. Santarius danke ich für die Hilfe in der Elektronenmikroskopie und für das Überlassen von Bildmaterial.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Huber möchte ich mich für die Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>3</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1    Das Proteasom - eine nicht-lysosomale Proteinase .....	6
1.1    Das Proteasom - Steuerkomponente für eine geregelte Zellteilung .....	6
1.2    Antigen-Präsentation über das Proteasom.....	7
2    Charakterisierung des Proteasoms .....	9
2.1    Entdeckung einer hochmolekularen multikatalytischen Proteinase .....	9
2.2    Aufbau und Funktionsweise des Proteasoms .....	11
<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>14</b>
<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>15</b>
1    Materialien .....	15
1.1    Chemikalien .....	15
1.2    Geräte .....	15
1.3    Sonstige Materialien .....	15
1.4    Lösungen und Puffer .....	16
2    Proteinnachweismethoden .....	16
2.1    Gelelektrophorese .....	16
2.1.1    Elektrophorese .....	16
2.1.2    Proteinfällung.....	18
2.1.3    Färbemethoden.....	18
2.1.3.1    Coomassiefärbung .....	18
2.1.3.2    Silberfärbung.....	19
2.2    Smart-System.....	20
3    Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	20
3.1    Bestimmung der Proteinkonzentration über die Extinktion.....	20
3.2    Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Methode nach Lowry .....	21
4    Proteinreinigung .....	22
4.1    Aufschluß der Hefezellen.....	22
4.2    Säulenchromatographie .....	22
4.2.1    Q-Sepharose .....	22
4.2.2    Hydroxylapatit .....	22
4.2.3    Mono Q .....	23
4.2.4    Superose 6 .....	23
5    Aktivitätstest .....	24
5.1    Nachweis der CL- und TL-Aktivität .....	24
5.2    Nachweis der PGPH-Aktivität .....	24
5.3    Inhibierung der Proteasomaktivität .....	24
6    Kristallisationsbedingungen.....	25
7    Bestimmung der Kristallgittermetrik.....	25

<b>Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
1    Reinigung des 20S-Proteasoms.....	26
2    Charakterisierung des 20S-Proteasoms.....	31
2.1  Nachweis der verschiedenen Untereinheiten im Hefeproteasom .....	31
2.2  Molekulargewichtsbestimmung des Proteasoms.....	31
2.3  Elektronenmikroskopische Aufnahmen des 20S-Proteasoms.....	33
3    Kristallisation des 20S-Proteasoms .....	34
4    Bestimmung der Elementarzelle der 20S-Proteasomkristalle .....	35
5    Identifizierung des zweiten isolierten Proteins als $\beta\gamma$ -Elongationsfaktor .....	38
<b>Diskussion</b> .....	<b>40</b>
1    Das 20S-Proteasom aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	40
2    Der $\beta\gamma$ -Elongationsfaktor aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
2.2  Eigenschaften des $\beta\gamma$ -Elongationsfaktors .....	45
2.2  Funktionen von Elongationsfaktoren .....	45
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>47</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>48</b>

## Abkürzungen

Å	Angström (= 0.1 nm)
AMC	7-Aminomethylcoumarin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
βNA	2-Naphtylamid
BrAAP	<i>Branched chain aminoacid-prefering</i>
BSA	Rinder-Serum-Albumin
CL	<i>Chymotrypsin-like</i>
DESY	Deutsches Elektronen Synchrotron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Choli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Elongationsfaktor
EtOH	Ethanol
γ-IFN	γ-Interferon
GTP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
kDa	Kilodalton (1000 u)
LMP	<i>Low molecular weight proteins</i>
μ	Mikro-(10 <sup>-6</sup> )
m	Milli-(10 <sup>-3</sup> )
M	Mol/l
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonat
M <sub>w</sub>	Molekulargewicht
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MPD	1-Methyl-1,4-pentadiol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NIN	<i>Nuclear integrity</i>
OD	Optische Dichte
PGPH	<i>Peptidylglutamyl peptide hydrolase</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SnAAp	<i>Small-neutral aminoacid-prefering</i>
Suc	Succinyl
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TL	<i>Trypsin-like</i>
tRNA	Translations-Ribonukleinsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	vereingte Proteinfraktionen
V <sub>M</sub>	Matthews-Koeffizient
(v/w)	Volumenprozent
(w/v)	Masse pro Volumen (g/100 ml)
(w/w)	Masseanteil an der Gesamtmasse
Z	Carbobenzoxy

## Einleitung

### 1 Das Proteasom - eine nicht-lysosomale Proteinase

In eukaryontischen Zellen wird die Mehrzahl der Proteine sowohl im Cytosol als auch im Nukleus über einen Adenosintriphosphat (ATP) abhängigen Reaktionsmechanismus abgebaut<sup>[1]</sup>. Bevor die Proteolyse einsetzen kann, werden die Proteine kovalent an ein in der Zelle ebenfalls vorkommendes Polypeptid (Ubiquitin) unter ATP-Verbrauch gebunden<sup>[2]</sup>. Dieses Addukt repräsentiert eine Verbindung, die schnell von einem 26S Komplex ( $M_w = 2000$  kDa) hydrolysiert wird<sup>[3]</sup>. Die proteolytische Schlüsselkomponente dieses multifunktionellen Enzyms ist das 20S-Proteasom (Abbildung 1).

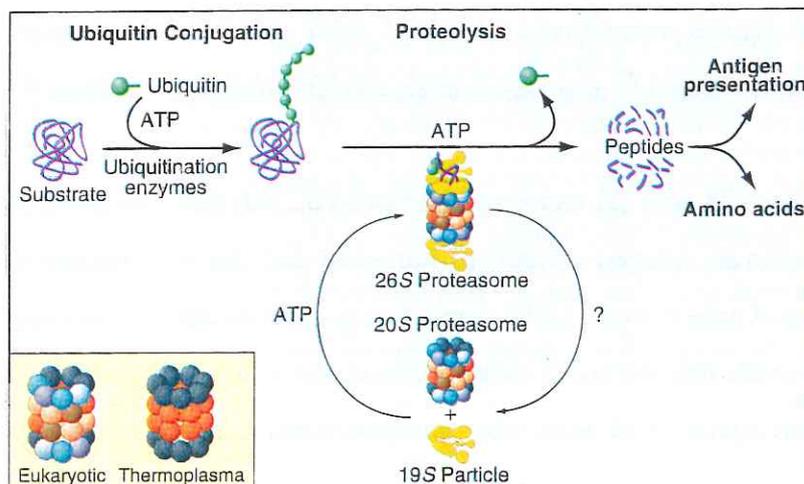


Abbildung 1: Abbau von Proteinsubstraten durch das Proteasom<sup>[4]</sup>.

Dieser nicht-lysosomale Abbauweg konnte erstmals 1976 anhand der sehr schnellen Eliminierung von fehlgefalteten Proteinen, welche aufgrund von Mutationen oder posttranslationalen Beschädigungen in der Zelle auftreten, nachgewiesen werden<sup>[4]</sup>.

Heute ist bekannt, daß die Zelle über obigen Reaktionsmechanismus in kurzer Zeit viele Regulatorproteine inaktiviert, sodaß ein normales Zellwachstum sowie ein geregelter Metabolismus in der Zelle gewährleistet ist.

Eine weitere Aufgabe des 20S-Proteasoms ist die Spaltung von Fremdproteinen in spezifische Oligopeptide, welche das Immunsystem aktivieren, indem sie die Synthese von Antikörpern induzieren<sup>[4]</sup>.

## 1.1 Das Proteasom - Steuerkomponente für eine geregelte Zellteilung

Die Regulation des Zellwachstums gehört zu den wichtigsten physiologischen Vorgängen aller Lebewesen. Im ausgewachsenen Organismus behalten bestimmte Organe ihre unveränderte Größe, indem ebenso viele Zellen entstehen wie absterben.

*Cycline* sind Proteine, die den Beginn der Zellteilung und den Übergang der G<sub>1</sub>- in die S-Phase einleiten. Appliziert man diese Regulatorproteine in Form einer nicht abbaubaren Mutante, so findet keine Mitose in den Zellen statt. Damit ist deren Abbau ein entscheidender Vorgang für einen geregelten Zellzyklus<sup>[5-7]</sup>.

Ghislain *et al.* konnten in Hefen zeigen, daß eine Funktion des Proteasoms die Hydrolyse dieser Regulatorproteine ist. Durch Isolation und Verwendung von Mutanten der 20S-proteasom-spezifischen Untereinheiten<sup>[8]</sup> wird die auf die Interphase folgende M-Phase nicht eingeleitet, sodaß kein Zellwachstum stattfinden kann. Der Abbau der *Cycline* erfolgt über den bereits beschriebenen ATP gesteuerten ubiquitinabhängigen Abbauweg<sup>[9]</sup> (siehe *Abbildung 1*).

Kominami *et al.* bewiesen, daß das 26S-Proteasom ebenso für eine Chromosomensegregation in der M-Phase erforderlich ist. Sie isolierten in *Saccharomyces cerevisiae* ein NIN1-Gen (*nuclear integrity*) und zeigten, daß das translatierte NIN1 Protein eine Komponente des 26S-Proteasoms ist. So entstehen durch Mutationen dieses Gens bei den darauffolgenden Zellteilungen Symptome wie Chromosomeninstabilität oder eine hohe Empfindlichkeit gegenüber UV-Bestrahlung<sup>[10]</sup>.

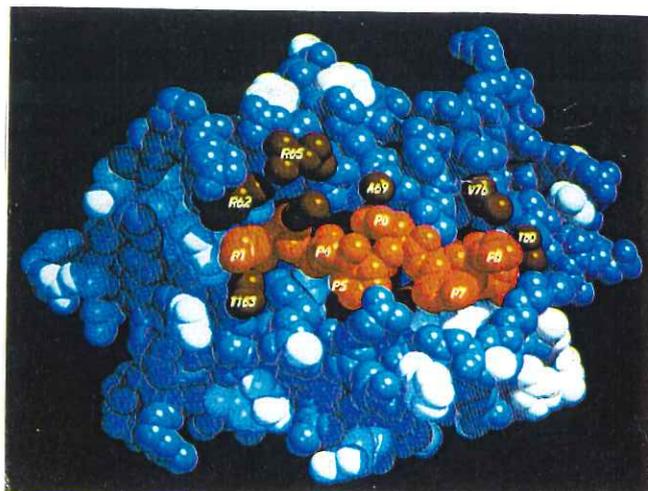
Über die eigentliche Aufgabe des 26S-Komplexes in der Anaphase ist bis jetzt nur wenig bekannt.

Wie gezeigt muß der Abbau der Regulatorproteine sowie eine Chromosomensegregation zeitlich festgelegt sein. Ein Fehlverhalten des Steuerungssystems bewirkt, daß kein kontrollierter Ablauf der Zellteilung stattfindet und infolgedessen eine Tumorbildung einsetzen könnte<sup>[6]</sup>. Damit bildet das Proteasom eine Schlüsselkomponente für eine geregelte Steuerung der Zellteilung.

## 1.2 Antigen-Präsentation über das Proteasom

1982 beschrieben Monaco und McDevitt einen Proteinkomplex, den sie *LMP* (low molecular weight proteins) nannten <sup>[11]</sup>. Sie erkannten, daß der *LMP*-Komplex eine wesentliche Rolle in der Antigenprozessierung spielt <sup>[12]</sup>, indem er Oligopeptide dem MHC I (major histocompatibility complex) zur Verfügung stellt. Weitere Studien am *LMP* ergaben sehr viele Ähnlichkeiten mit dem Proteasom. So ist das Molekulargewicht ca. 700 kDa und die Anzahl der 14 nicht identischen Untereinheiten liegt im Bereich von 20 bis 30 kDa. 1991 zeigten Brown *et al.* mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, daß die Proteasom- und die *LMP*-Polypeptiduntereinheiten identisch sind; beispielsweise können *LMP2* und *LMP7* Komponenten des 20S-Proteasoms sein <sup>[13]</sup>.

Goldberg *et al.* bewiesen, daß das Proteasom für die Erzeugung von antigenen Peptiden, die dem Immunsystem über den MHC I-Komplex zur Verfügung stehen, verantwortlich ist <sup>[14]</sup>. Die Immunantwort wird eingeleitet, indem endogene oder extrazelluläre Proteine in kleine Fragmente, die 8 bis 9 Aminosäurereste enthalten, gespalten werden. Den Prozeß bezeichnet man als *antigen processing* <sup>[15]</sup>. Die durch das Proteasom erzeugten kleinen Oligopeptidstücke werden in das endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie mit den MHC Molekülen assoziieren <sup>[16]</sup> (*Abbildung 2* <sup>[17]</sup>).



**Abbildung 2:** Antigenoberfläche von einem Oktapeptid (orange) und MHC-Atomen (blau, konserviert; rot, polymorph; hellblau nicht konserviert oder polymorph) <sup>[17]</sup>.

Der MHC I-Peptidkomplex wird über das trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche gebracht. Wenn das Peptid vom Immunsystem nicht toleriert wird (z.B. eine virale oder mutierte Sequenz (orange Atome in *Abbildung 2*)), findet eine Zellyse durch cytolytische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten statt <sup>[17]</sup>. Somit kann es einerseits zum Tod virusbefallener Zellen und damit zur Krankheitsheilung, andererseits aber auch zur Abstoßung von Organtransplantaten kommen.

Yang *et al.* zeigten, daß die Behandlung von Zellen mit  $\gamma$ -Interferon ( $\gamma$ -IFN) einen Einfluß auf die Proteasomuntereinheiten besitzt <sup>[18-20]</sup>. So bewirkt dieses Cytokin, das von T-Lymphozyten sezerniert wird, einen multiplen Austausch der Untereinheiten im Proteasom. Als Beispiel können hier die Untereinheiten LMP2 und LMP7 aufgeführt werden. Sie bewirken die Hydrolyse von Proteinen in Oligopeptiden deren terminale Reste mit den MHC I Molekülen wechselwirken können. Damit haben sowohl das 26S- als auch das 20S-Proteasom die Fähigkeit, Peptide für eine Präsentation an MHC I-Molekülen zu produzieren.

In Mäusemutanten, in denen die  $\gamma$ -IFN-Gene oder die  $\gamma$ -IFN-Rezeptorgene inaktiviert sind, zeigt sich eine Vielfalt an Defekten in der Immunantwort <sup>[21]</sup>.  $\gamma$ -IFN besitzt die Eigenschaft, die Konzentration von LMP2 und LMP7 in der Zelle zu erhöhen und diese Polypeptide durch Austausch der Untereinheiten Y und X in den 20S-Proteasomkomplex einzubauen.  $\gamma$ -IFN ändert hingegen weder die Konzentration des Proteasoms in der Zelle, die Abbaugeschwindigkeit von Proteinsubstraten noch die Hydrolyse von lang- oder kurzlebigen Zellproteinen.

## 2 Charakterisierung des Proteasoms

### 2.1 Entdeckung einer hochmolekularen multikatalytischen Proteinase

Proteasomen (EC 3.4.99.46) sind hochmolekulare, multikatalytische nicht-lysosomale Proteinasekomplexe. Die höchsten Proteasomkonzentrationen (bis zu ein Prozent der löslichen Zellproteine) werden in der Leber und in der Niere gefunden. Das Molekulargewicht ( $M_r$ ) der eukaryontischen 20S-Proteasome beträgt ungefähr 700 kDa<sup>[22, 23]</sup>. Das Protein setzt sich dabei aus einer Vielzahl von verschiedenen Untereinheiten im Bereich von 22 - 34 kDa zusammen und ist seit 1968 aus vielen Eukaryonten unter verschiedenen Bezeichnungen isoliert worden<sup>[24]</sup>.

**Tabelle 1**

Cylindrin	Harris, 1968.
High Molecular Weight Enzyme	Hardy <i>et al.</i> , 1981.
Low Molecular Weight Polypeptides (LMP)	Monaco & McDevitt, 1982.
Prosome	Schmid <i>et al.</i> , 1984.
Ingensin	Ishiura <i>et al.</i> , 1985.
Multifunctional Protease	Tanaka <i>et al.</i> , 1986.
20S Particle	Arrigo <i>et al.</i> , 1987.
Multicatalytic Proteinase	Dahlmann <i>et al.</i> , 1988.
Multicatalytic Proteinase Complex	Orlowski & Wilk, 1988.
Proteasome	Arrigo <i>et al.</i> , 1988.

Tabelle 1: Unterschiedliche Bezeichnungen für das Proteasom.

Erstmals wurde der Komplex bei einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von lysierten, humanen Erythrozyten als ein zylinderförmiges Molekül beschrieben. Dieses ist aus vier einzelnen, übereinanderliegenden Ringen aufgebaut, und es wurde aufgrund seiner charakteristischen Struktur 1968 von Harris als Cylindrin bezeichnet<sup>[28]</sup>. In *Abbildung 3a,b* sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Thermoplasma acidophilum*-20S-Proteasomen gezeigt<sup>[29]</sup>.

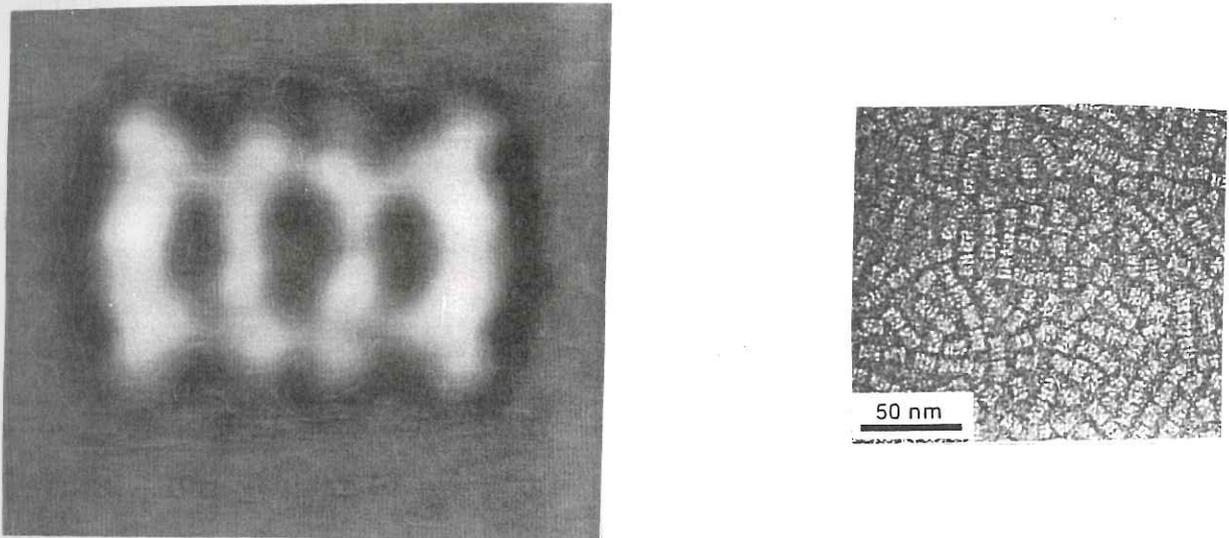


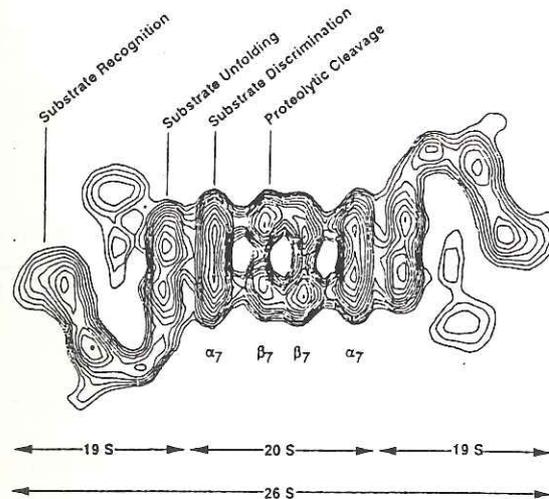
Abbildung 3a,b: Elektronenmikroskopie von 20S-Proteasomen aus *Thermoplasma acidophilum* <sup>[29]</sup>.

1988 stellten drei unabhängig durchgeführte Untersuchungen fest, daß all diese verschiedenen Namen den gleichen Proteinkomplex beschreiben, und es wurde die heute gebräuchliche Bezeichnung **Proteasom** als neuer gemeinsamer Name vorgeschlagen <sup>[25-27]</sup>.

Später wurden Proteasomen auch aus Kernen von Rattenleber und Dictyostehlium isoliert. Die ubiquitäre Verbreitung des Proteasoms in eukaryontischen Zellen wurde durch Isolation des Proteins aus verschiedenen Pflanzen, wie Tabak, Weizen, Kartoffel und Bohne, sowie aus Hefe, Xenopus und Drosophila belegt <sup>[30-36]</sup>.

## 2.2 Aufbau und Funktionsweise des Proteasoms

Das 20S-Proteasom bildet den katalytischen Kern des 26S-Proteasoms, einer Protease mit einem Molekulargewicht von 2000 kDa. Während das 20S Partikel nicht-ubiquitinierte, falsch gefaltete oder teilweise entfaltete Proteine ATP-unabhängig abbaut, degradiert das 26S-Proteasom ubiquitinierte Proteine in einer ATP-abhängigen Reaktion <sup>[37]</sup>. Wie *Abbildung 4* zeigt, wird das 26S-Proteasom von dem 20S Zylinder und zwei an beiden Enden des katalytischen Kerns sehr schwach bindenden, sogenannten *19S-Cap-Komplexen* aufgebaut.



*Abbildung 4:* Konturzeichnung des 26S-Proteasoms und dessen Aufgaben in den einzelnen Regionen <sup>[37]</sup>.

Die 19S-Caps bestehen jeweils aus 15 verschiedenen Proteinuntereinheiten ( $M_r$  von 30 - 110 kDa), von denen einige ATPase-Aktivität besitzen und in vitro unter ATP-Verbrauch mit dem 20S-Proteasom zum funktionellen 26S-Proteasom assemblieren können. Die 19S-Caps weisen dabei Konsensussequenzen für ATP-Bindungsstellen auf und gehören einer ubiquitär verbreiteten Familie von ATPasen an. Es wird vermutet, daß die 19S-Caps des 26S Komplexes unter ATP-Spaltung die Substratproteine entfalten <sup>[38]</sup>.

Das 20S-Proteasom des eukaryontischen 26S Komplexes setzt sich aus 14 verschiedenen Untereinheiten zusammen. Die Proteinsequenzen der einzelnen Untereinheiten besitzen keine Sequenzverwandtschaft zu anderen bekannten Proteinen. Sie bilden eine neue Protein-Superfamilie <sup>[39]</sup>.

Die Aufgabe des Proteasoms ist es Proteine abzubauen. Dem Komplex wurden nach Charakterisierung der proteolytischen Aktivität mit synthetischen Peptidsubstraten und Proteinaseinhibitoren fünf verschiedene proteolytische Aktivitäten zugeschrieben <sup>[40]</sup>.

Tabelle 2

Aktivität	Aminosäurespaltstellen
Chymotrypsin-like (CL)	spaltet nach aromatischen AS-Resten (Y, F)
Trypsin-like (TL)	spalten nach geladenen AS-Resten (K, R)
Peptidylglutamyl peptide hydrolase (PGPH)	spaltet nur nach E
Branched chain aminoacid-prefering (BrAAP)	spaltet nach verzweigten AS-Resten (L, I)
Small neutral aminoacid-prefering (SNAAP)	spaltet nach kleinen AS-Resten (A, G)

Tabelle 2: Unterschiedliche Proteaseaktivitäten im Proteasom <sup>[40]</sup>.

Die hohe Anzahl an unterschiedlichen Proteinaseaktivitäten und die Untersuchung von Proteinabbauprodukten zeigt, daß das Proteasom eine breite Spezifität besitzt und die Peptidbindung in Proteinen nach fast jeder Aminosäure gespalten werden kann. Da die Vielzahl der entstandenen Fragmente trotzdem in einen engen Größenbereich fallen (6 bis 9 Aminosäuren) gibt es im Proteasom einen molekularen Maßstab, der die Länge der Abbauprodukte vorgibt <sup>[41, 48]</sup>.

Durch eine Beeinflussung der proteolytisch spaltenden aktiven Zentren treten für die Zelle lebenswichtige Veränderungen ein. Beispielsweise erhöhen langkettige alifatischen Carbon- bzw. Sulfonsäuren die PGPH- und BrAAP -Aktivität um das zwanzigfache, während sie die CL- und die TL-Aktivität vollständig inhibieren <sup>[42]</sup>. Durch Zugabe von Leupeptin kann selektiv die TL-Aktivität gestoppt werden, während der Einsatz von N-Ethylmaleinimid sowohl die TL- als auch die CL-Aktivität blockiert. Der bisher am stärksten wirksame Proteasominhibitor ist 3,4-Dichloroisocoumarin, womit sämtliche katalytischen Aktivitäten im Molekül gestoppt werden <sup>[43]</sup>.

Corey *et al.* konnten erstmals den natürlich vorkommenden *Streptomyces*-Metaboliten, Lactacystin, isolieren <sup>[44]</sup>. Sie zeigten, daß diese Verbindung in *Saccharomyces cerevisiae* unterschiedlich starken Inhibitoreinfluß auf die CL-, TL- und PGPH-Aktivität besitzt. Die Aufgabe

von Lactacystin ist es, einerseits den fortschreitenden Zellzyklus durch die Inhibierung der Proteasomaktivität zu blockieren, andererseits die Neuritenausbildung in Neuroblasten zu induzieren<sup>[44]</sup>.

Hauptanwendungsgebiet der synthetischen Inhibitoren ist der medizinischen Bereich.

Beispielsweise konnten Wilk *et al.* zeigen, daß die TL-Aktivität des 20S-Proteasoms für die Spaltung der Gln-His-Bindung in der oxidierten Insulin B-Kette verantwortlich ist<sup>[45]</sup>.

Goldberg *et al.* wiesen an Mäusen nach, daß während des Hungerstadiums das Proteasom für die Energieaufrechterhaltung der Zellen durch Abbau von Muskelfasern sorgt<sup>[46]</sup>. Aufgrund dieses Ergebnisses wird vermutet, daß das Proteasom einen wesentlichen Einfluß auf Muskelschwund hat. Durch die Bestimmung der Lage und der Umgebung der katalytisch aktiven Zentren im 20S-Proteasom könnten in der medizinischen Forschung wertvolle Mimetika gegen Diabetes und Muskeldystrophie entwickelt werden.

Synthetische Inhibitoren des Multikatalytischen Proteinasekomplexes ermöglichen ebenso Aussagen über die funktionelle Bedeutung der aktiven Zentren sowie über den katalytischen Mechanismus.

So blockieren Peptidaldehydinhibitoren wie LLnL (Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal) die Proteasomaktivität. Der 26S Komplex ist unter diesen Voraussetzungen nicht mehr in der Lage, eine Vielzahl an zellulären Proteinen abzubauen und eine Peptidgenerierung für MHC-Klasse I-Moleküle findet ebenfalls nicht statt<sup>[47]</sup>.

## Aufgabenstellung

Vor kurzem konnten Löwe *et al.* die Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus dem Archebakterium *Thermoplasma acidophilum* bestimmen <sup>[48-50]</sup>.

Das 20S Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum* hat in Bezug auf Geometrie, Symmetrie sowie Anzahl der Untereinheiten große Ähnlichkeiten mit dem eukaryontischen Proteasom. Dies konnten verschiedene elektronenmikroskopische Studien in Verbindung mit digitaler Bildverarbeitung verdeutlichen <sup>[51]</sup>.

In Hefe kennt man zur Zeit 14 Gene der Komponenten des 20S-Proteasoms, entsprechend den 14  $\alpha_7\beta_7$ -Untereinheiten. Der Austausch von Untereinheiten in Hefezellen konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Durch eine Isolierung des Proteins erhalte man somit einheitlich aufgebaute Proteasommoleküle. Für eine anschließende Kristallisation und Strukturbestimmung gäbe es keine Inhomogenitätsprobleme.

Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie dessen Kristallisation. Mit den Kristallen könnte die Struktur des eukaryontischen 20S-Proteasoms bestimmt werden.

In eukaryontischen Systemen herrscht zwischen den 20S Proteasomen nahezu Sequenzhomologie <sup>[22]</sup>. Mit der Kristallstruktur des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* wird die Lage der Untereinheiten mit den katalytischen aktiven Zentren für eukaryontische Systeme festgelegt. Dadurch gewinnt man einen Einblick in die räumlichen Umgebungen der aktiven Zentren und man könnte versuchen, neue Inhibitoren zu finden.

## Materialien und Methoden

### 1 Materialien

#### 1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen und im Reinheitsgrad *zur Analyse* eingesetzt. Der Molekulargewichtsmarker für 12.4-700 kDa (Cytochrom c, Carboanhydrase, Albumin, Alkohol Dehydrogenase,  $\beta$ -Amylase, Apoferritin, Thyroglobulin, Blue Dextran) wurde bei der Firma Sigma gekauft. Die Aminomethylcoumarin- (AMC) und  $\beta$ -Naphthylamid-Peptidsubstrate ( $\beta$ NA) wurden von der Firma Bachem bezogen. Die Säulenmaterialien Q-Sepharose und Hydroxylapatit wurden von den Firmen Sigma und Biorad, MonoQ- und Superose 6-Säulen für die FPLC-Anlage von Pharmacia gekauft.

#### 1.2 Geräte

Fluorimeter (Kontron Instruments), FPLC LCC-500 (Pharmacia), Fraktionssammler 211 Multirack (Pharmacia), Schreiber REC 1 (Pharmacia), Smart<sup>TM</sup>System (Pharmacia), Heizblock Techne Dri-Block DB 2A, peristaltische Pumpe Miniplus 2 (Abimed/Gilson), Spannungsquelle Elektrophoresis Power Supply EPS 500/400 (Pharmacia), UV-VIS-Spektralphotometer Lambda 17 (Perkin Elmer), Ultrazentrifuge L7-55 Ultracentrifuge, (Beckman), Tischzentrifuge 2K15 (Sigma), Zentrifuge J2-21 M, J6 ME (Beckman), Zentrifuge RC5C (Sorvall), Zentrifuge 5403 (Eppendorf), Zentrifuge Biometik<sup>TM</sup>1000 Automatical Work Station (Beckman), UV-Detektor Variable Wavelength Monitor (Knauer), Desintegrator S (Biomatik).

#### 1.3 Sonstige Materialien

Amicon-Rührzelleinheit (Amicon), Centricon 10 Mikrokonzentratoren (Amicon), Centriprep Mikrokonzentratoren (Amicon), Glaskugeln, mit  $\varnothing$  0.5-0.7 mm (Biomatik), Image Plate-System (MarResearch), RTP300 RC-Generator (Rigaku), Linbro Plates (ICN), MonoQ (5/5) für FPLC (Pharmacia), MonoQ für Smart (Pharmacia), Partikelfilter Millex HA, 22  $\mu$ m-Filter (Millipore), Partikelfilter Millex HA, 45  $\mu$ m-Filter (Millipore), PH-Meter PHM 62 Standard PH Meter (Radiometer), Quarzglasküvette Suprasil QS 1000 (Hellma), Rotor JA-10

Lösung A:

48% (w/v) Acrylamid (48 g), 1.5% (w/v) Bisacrylamid (1.5 g), bidest. Wasser ad 100 ml.

Lösung B:

3M Tris (36.3 g), 0.3 % (w/v) SDS (0.3 g), bidest. Wasser ad 100 ml / pH 8.9 mit HCl.

Anodenpuffer 10x:

200 mM Tris (48 g), bidest. Wasser ad 200 ml. / pH 8.9 mit HCl.

Kathodenpuffer 10x:

100 mM Tris (24 g), 100 mM Tricine (36 g), 1 (w/v) % SDS (2 g), bidest. Wasser ad 200 ml.

Probenpuffer 1:1:

100 mM Natriumcarbonat (0.11 g), 100 mM Dithiothreitol (0.15 g), 4 % (w/v) SDS (0.40 g), 20 % (w/v) Saccharose (2.0 g), 5 mM EDTA (0.02 g), Bromphenolblau (0.01 g), bidest. Wasser ad 10 ml / pH 6.8 mit  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ .

Man verwendet 8 cm x 10 cm Glasplatten, die mit Ethanol gereinigt werden. Nach dem Trocknen werden diese mit den Spacern zusammen in einen Gießblock eingespannt.

Trenngel 16 % für 8 Minigele:

30 ml Lösung A, 30 ml Lösung B, 15 ml bidest. Wasser, 15 ml Glycerin, entgasen,  
60  $\mu\text{l}$  TEMED, 200  $\mu\text{l}$  10 % (w/v) APS (0.1g APS/ 1 ml bidest. Wasser),  
überschichten mit Butanol/Wasser 1:1 (2 ml pro Gel).

Trenngel 12 % für 8 Minigele:

22.5 ml Lösung A, 30 ml Lösung B, 22.5 ml bidest. Wasser, 15 ml Glycerin, entgasen,  
60  $\mu\text{l}$  TEMED, 200  $\mu\text{l}$  10 % (w/v) APS (0.1g APS/ 1 ml bidest. Wasser),  
überschichten mit Butanol/Wasser 1:1 (2 ml pro Gel).

Nach ca. 2 h wird das Butanol/Wasser-Gemisch abgeschüttet und das darunterliegende Trenngel mit Filterpapier getrocknet. Darauf gibt man das Sammelgel und fügt im Anschluß die Kämme ein.

Sammelgel für 8 Minigele:

8 ml Lösung A, 16 ml Lösung B, mit bidest. Wasser ad 48 ml, entgasen,  
20  $\mu\text{l}$  TEMED, 150  $\mu\text{l}$  10 % APS (0.1g APS/ 1 ml bidest. Wasser).

### 2.1.2 Proteinfällung

Befindet sich das Protein in einem kaliumhaltigen Puffer, müssen die Kaliumionen abgetrennt werden, da diese sonst mit dem SDS aus dem Gel und dem Probenpuffer als Kaliumdodecylsulfat präzipitieren. Dadurch wird das Protein durch SDS nicht denaturiert. Ebenso findet keine Proteinkomplexierung über SDS statt, sodaß bei Anlegen einer Spannung das Protein nicht durch das Gel laufen kann.

Um die Kaliumionen abzutrennen fügt man zu der Proteinlösung 60 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA), stellt anschließend die Polypeptid-Lösung für eine vollständige Fällung für 10 min auf Eis und zentrifugiert den ungelösten Rückstand ab. Die Endkonzentration des Überstandes soll ca. 12 % (w/v) an TCA betragen. Man wäscht nun das Pellet so lange mit einer durch Bromphenolblau angefärbten 25 % Ethanol-Wasser-Mischung, bis der Indikator nicht mehr nach gelb umschlägt, fügt ca. 10 µl Probenpuffer hinzu und verfährt wie unter 2.1 beschrieben.

### 2.1.3 Färbemethoden

#### 2.1.3.1 Coomassiefärbung <sup>[54]</sup>

Nachdem der Bromphenolfarbstoff als Frontmarker das Gel durchlaufen hat, werden die Glasplatten und Spacer entfernt und das Trenngel in eine Coomassie brilliant Blue G-250-Färbelösung eingelegt. Für eine optimale Anfärbung erhitzt man die Lösung mit dem Gel kurzzeitig auf ca. 80 °C und schüttelt bei RT ca. 15 min. Anschließend ersetzt man die Färbelösung durch eine Entwicklerlösung. Nachdem das Gel weitere 4 h auf dem Schüttler mit der Entfärbelösung behandelt worden ist, kann man die einzelnen Banden auf dem Gel erkennen. Die Coomassiebanden geben nur ein grobes Bild des Reinheitsgrades wieder, da nur Banden mit Proteinkonzentrationen in µg-Bereich sichtbar werden.

#### Coomassie brilliant Blue Färbelösung:

0.1 % Coomassie Blue R250, 25 % Ethanol, 8 % Eisessig, 67 % Wasser.

#### Entwicklerlösung:

10 % Ethanol, 40 % Eisessig, 50 % Wasser.

### 2.1.3.2 Silberfärbung

Durch diese Methode lassen sich Peptidkonzentrationen in ng nachweisen<sup>[55]</sup>. Es werden jeweils 50 ml der folgenden Lösungen eingesetzt:

Fixierlösung      1h:

300 ml Ethanol, 150 ml Eisessig, bidest. Wasser ad 1000 ml.

Inkubationslösung      1-3 h:

41 g Natriumacetat in wenig bidest. Wasser lösen, 250 ml Ethanol, bidest. Wasser ad 1000 ml.

Kurz vor Gebrauch:

0.1 g Natriumthiosulfat, 250 µl Glutaraldehyd.

Färbelösung      30 min:

1 g Silbernitrat, bidest. Wasser ad 1000 ml.

Kurz vor Gebrauch:

15 µl Formaldehyd.

Entwicklerlösung      1-10 min:

25 g Natriumcarbonat, bidest. Wasser ad 1000 ml, pH 11.5 mit Carbonat/Hydrogencarbonat.

Kurz vor Gebrauch:

15 µl Formaldehyd.

Stopplösung:

18.6 g EDTA, bidest. Wasser ad 1000 ml.

Das SDS-Schäggel wird 1 h in die Fixier- und danach 1-3 h in die Inkubationslösung gegeben. Daraufhin wäscht man dreimal 10 min mit 50 ml bidestillierten Wasser nach und behandelt das Gel 30 min mit der Färbelösung. Anschließend gießt man diese ab, wäscht kurz mit bidestillierten Wasser (entfernt überflüssige Färbelösung) und entwickelt. Sobald die gewünschte Färbungsintensität erreicht ist, wird der Entwickler abgeschüttet und die Stopplösung hinzugegeben. Das Gel ist in dieser Lösung längere Zeit lagerfähig.

## 2.2 Smart-System

Mit dem Smart<sup>TM</sup> System von Pharmacia wurde eine abschließende Kontrolle der Proteinreinheit durchgeführt. Dieses System ermöglicht durch den eindeutigen Nachweis von g-Konzentrationen eine Bestimmung von Probenverunreinigungen. Als Säulen wurden Mono Q und Superose 6 verwendet. Um neben der Proteinreinheit auch etwas über die Assoziationsbildung auszusagen, wurde die Superose 6- Säule mit unterschiedlichen Molekulargewichtsmarkern kalibriert.

Superose 6: (Material: Monobeats: Säulenvolumen: 2.4 ml)  
Eingesetztes Probenvolumen: ca. 20 µl, Puffer: TEN, Konz.: 1 mg/ml; Flußgeschw.: 40 µl/min.

Mono Q: (Material: Monobeats: Säulenvolumen: 100 µl)  
Proteinmenge: 20 µg; Puffer: TEN; Flußgeschw.: 100 µl/min; Konzgrad.: 1.2 Säulenvolumen für eine Erhöhung der Natriumchloridkonz. um 10 mM.

## 3 Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration

### 3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration über die Extinktion

Mit dem UV-Spektrometer von Perkin Elmer, Lamda 17 wird in einer Quarzküvette die Extinktion (E) der Proteinlösung bei 280 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Aminosäurereste Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin besonders gut, sodaß mit dem Lambert Beer'schen Gesetz die Proteinkonzentration ermittelt werden kann.

es gilt:

$$I = I_0 e^{-\epsilon cd} \quad (\text{mit } I = \text{Intensität des durchgehenden Strahls, } I_0 = \text{Anfangsintensität,} \\ \epsilon = \text{Extinktionskoeffizient, } d = \text{Küvettdicke und } c = \text{Konzentration})$$

Eine Vereinfachung obiger Gleichung ergibt folgende Näherung:

$$\text{Konzentration [mg/ml] an 20S-Proteasom} = E_{280} \times 0.66$$

### 3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Methode nach Lowry

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird bei dieser Methode <sup>[56]</sup> jedesmal eine neue Standardgerade erstellt. Das eingesetzte Protein ist Rinder-Serum-Albumin (BSA) und die zu verwendenden Mengen für die Kalibrierung betragen 0, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µg. Man legt BSA sowie das zu bestimmende Protein in 300 µl bidestillierten Wasser vorfügt 1 ml Lowry C hinzu und läßt 15 min inkubieren. Anschließend fügt man 100 µl der Lösung D hinzu und beendet nach 3 min die Färbereaktion mit 100 µl der Lösung E. Die Konzentration der Lösung wird in Einmal-Plastikküvetten mit dem Perkin Elmer Lambda 17 Spektrometer bei 740 nm bestimmt. Grundlage hierfür ist das bereits in 3.1 erwähnte Lambert Beer'sche Gesetz. Um die auftretenden Fehler möglichst gering zu halten werden drei unterschiedliche Proteinkonzentrationen eingesetzt und über die erhaltenen Werte gemittelt. Der Lowry-Test ermöglicht eine Proteinkonzentrationsbestimmung im Bereich von 30 - 120 µg/ml zu bestimmen.

#### Lowry A Lösung:

2 (w/v) % Natriumcarbonat, 0.1 M Natriumhydroxid, 0.16 % (w/v) Natriumtartrat, 87.84 % (w/v) bidest. Wasser.

#### Lowry B Lösung:

0.5 % (w/v) Kupfersulfat, 99.5 % bidest. Wasser.

#### Lowry C Lösung:

98 % (v/v) Lowry A - und 2 % (v/v) Lowry B-Lösung.

#### Lowry D Lösung:

50 % (v/v) Folin Ciocalteon's Reagenz Reagenz, 50 % bidest. Wasser.

#### Lowry E Lösung:

6.2 mg Dithiothreitol in 2 ml bidest. Wasser (muß vor Gebrauch frisch angesetzt werden).

## 4 Proteinreinigung

### 4.1 Aufschluß der Hefezellen

Die eingesetzte Hefe wurde von Hefe-Mayr, Riesenfeldstraße 78, 80809 München bezogen. Bei den Hefezellen handelte es sich um *Saccharomyces cerevisiae*. Es wurde 1 l einer 40 % (w/v) Zellsuspension in TEN-Puffer hergestellt, der 100 mg PMSF, gelöst in wenig Ethanol, zugesetzt wurde. Der Aufschluß der Hefezellen erfolgte mit einer Glasperlenmühle (Zelldesintegrator). Die eingesetzte Menge an Zellsuspension betrug 50 ml pro Lauf. Die optimale Größe der verwendeten Glasperlen richtet sich nach der Zellart und der ideale Durchmesser für Hefen liegt bei 0.5 - 0.7 mm. Das spezifische Gewicht der Glasperlen war 2.7 g/cm<sup>3</sup>. Hier wurde ein Verhältnis von Glasperlen- zu Zellsuspensionsvolumen von 1.5 zu 1 verwendet. Für die Hefezellen wurde eine Glasperlengeschwindigkeit von 10 m/s (entspricht einer Drehzahl von 3500 min<sup>-1</sup>) eingesetzt und die Aufschlußdauer betrug ca. 10 min.

Das Zellysats wurde in Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und diese in einem Ti-55,2 Rotor zentrifugiert (35000 min<sup>-1</sup>, 2 h, 4 °C). Der stark gelbe, trübe Überstand wird dekantiert und bei 4 °C einer Ionenaustauschchromatographie unterworfen.

### 4.2 Säulenchromatographie

#### 4.2.1 Q-Sephrose (Säulenvolumen: 1 l)

Es werden 400g Trockenzellen aufgeschlossen und im Kühlraum bei 4 °C auf eine mit TEN-Puffer voräquilibrierte Q-Sepharosesäule aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 1.0 ml/min. Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wurde auf 2.56/100 mV und die Schreibergeschwindigkeit auf 0.2 mm/min eingestellt. Nach dem Auftragen des gesamten Zellysats wurde bis zum Erreichen der Anfangsextinktion mit TEN-Puffer gespült (ca. 15 h). Anschließend wurden die noch gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Das dabei verwendete Gradientenvolumen betrug 1 l, die Konzentration belief sich auf 0-1M NaCl in TEN-Puffer. Es wurden 15 ml Fraktionen gesammelt, die auf die unterschiedlichen 20S-Proteasomaktivitäten untersucht wurden.

#### 4.2.2 Hydroxylapatit (Säulenvolumen: 100 ml)

Die Fraktionen, in denen man das 20S-Proteasom durch Aktivitätstest und Elektrophorese nachwies, wurden vereinigt und mittels einer Amicon-Zelle (Membran 40 kDa) bei 4 °C ent-

salzt. Die Endkonzentration an NaCl betrug ca. 50 mM in TEN. Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wird auf 1.28/100 mV und die Schreibergeschwindigkeit auf 0.2 mm/min eingestellt. Nach Auftrag wurde mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.5 bis zum Erreichen der Anfangsextinktion gewaschen. Die Durchflußgeschwindigkeit war 0.8 ml/min. Anschließend wurden die noch gebundenen Proteine mit einem linearen Phosphat-Gradienten eluiert. Das dabei verwendete Gradientenvolumen betrug 1 l, die Konzentration belief sich auf 0-400 M Phosphat-Puffer. Es wurden 16 ml Fraktionen aufgefangen und in diesen der Aktivitätstest durchgeführt. Des Weiteren wurde das Protein über Schäggergelelektrophorese in den Fraktionen charakterisiert.

#### 4.2.3 Mono Q (Säulenvolumen: 1 ml)

Die Fraktionen, in denen man das 20S-Proteasom durch Aktivitätstest und Elektrophorese nachwies, wurden vereinigt und mittels einer Amicon-Zelle auf ca. 30 ml eingengt. Mit dem Lowry-Test wurde die Proteinkonzentration ermittelt, und anschließend trug man das Gemisch an der FPLC-Anlage bei Raumtemperatur mit ca. 5-8 mg pro Lauf auf. Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert und entgast. Die Flußgeschwindigkeit durch die Säule betrug 0.5 ml/min. Die Empfindlichkeit des UV-Detektors (Pharmacia) wurde auf 2.0, die Schreibergeschwindigkeit auf 0.3 mm/min eingestellt. Nach Auftrag des Proteingemisches wusch man mit 5ml 150 mM NaCl in TEN und eluierte das 20S-Proteasom. Das hierfür verwendete Gradientenvolumen belief sich auf 15 ml. Anhand des Schäggergels konnte eine vereinigte Fraktion als 20S-Proteasom charakterisiert werden.

#### 4.2.4 Superose 6 (Säulenvolumen: 24 ml)

Die vereinigten 20S-Proteasomenfraktionen wurden mit Hilfe von Centripreps (10 kDa Membran, Endvolumen: 3 ml) und Centricons (10 kDa Membran) auf ca 1 ml eingengt. Die Proteinendkonzentration betrug hierbei ca. 20 mg/ml (siehe Lowry-Test 2.2). Es wurden jeweils 300 µl auf die Superose 6-Säule aufgetragen. Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert und entgast. Die Flußgeschwindigkeit mit der die Säule betrieben wurde war 0.3 ml/min. Die Empfindlichkeit des UV-Detektors (Pharmacia) wurde auf 2.0 und die Schreibergeschwindigkeit auf 0.3 mm/min eingestellt. Die Reinheit des erhaltenen Proteasomenpeaks wurde anhand der Schäggergelelektrophorese (2.1) und dem Smartsystem (2.2) überprüft und die 20S-Proteasomendkonzentration über den Lowry-Test (3.2) bestimmt.

## **5 Aktivitätstest**

Der Aktivitätstest ist eine Methode zur Bestimmung der Enzymaktivität. Durch Überschneidung der CL-, TL- und PGPH-Aktivität konnten die Fraktionen, in denen sich das 20S-Proteasom befand, ermittelt werden.

### **5.1 Nachweis der CL- und TL-Aktivität**

Es wurden 10  $\mu\text{l}$  einer 10 mM Substratlösung (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC für CL-Aktivität und Z-Val-Gly-Arg-AMC für TL-Aktivität) in DMSO mit 5 ml TEN-Puffer verdünnt. 50  $\mu\text{l}$  davon wurden mit 50  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Enzymlösung vermischt und in einen Heizblock (37 °C) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h fügte man 1 ml Stoppuffer A hinzu und beendete damit die Reaktion.

Das 20S-Proteasom spaltete nach den Tyr- bzw. Arg-Resten spezifisch die AMC-Gruppe ab. Das Coumarinderivat wurde mit Licht der Wellenlänge 360 nm angeregt und fluoreszierte bei einer Wellenlänge von 460 nm, die detektiert wurde. Die Kalibrierung des Fluorimeters auf 100 % erfolgte mit 10  $\mu\text{l}$  0.2 mM AMC in DMSO, 200  $\mu\text{l}$  TEN-Puffer und 1 ml Stoppuffer. 0 % Aktivität erhielt man durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Substratlösung zu 150  $\mu\text{l}$  TEN und 1 ml Stoppuffer in Abwesenheit einer Enzymlösung.

### **5.2 Nachweis der PGPH-Aktivität**

10  $\mu\text{l}$  der 1 mM Substratlösung (Z-Leu-Leu-Glu- $\beta$ NA, gelöst in DMSO) wurden mit 50  $\mu\text{l}$  Enzymlösung vermischt und in einen Heizblock (60 °C) für 2 h gegeben. Anschließend beendete man die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Stoppuffer B.

Das 20S-Proteasom spaltete nach dem Glu-Rest spezifisch die  $\beta$ NA-Gruppe ab. Das  $\beta$ -Naphthylamid wurde mit einem Fluoreszenzlicht von 355 nm angeregt und emittierte eine Wellenlänge von 410 nm, die detektiert wurde. Die Kalibrierung des Fluorimeters auf 100 % erfolgte mit 10  $\mu\text{l}$  einer 10 mM  $\beta$ -Naphthylamidlösung in DMSO, 200  $\mu\text{l}$  TEN-Puffer und 1 ml Stoppuffer B. 0 % Aktivität erhielt man, in dem man statt Enzymlösung 150  $\mu\text{l}$  TEN-Puffer zu 50  $\mu\text{l}$  Substratlösung und 1 ml Stoppuffer B zugab.

### **5.3 Inhibierung der Proteasomaktivität**

Durch Zugabe von Lactacystin <sup>[44]</sup> wurde selektiv die 20S-Proteasomaktivität inhibiert. Die erneute Durchführung des Aktivitätstests (5.2) unter Zusatz von 1  $\mu\text{l}$  Lactacystin ließ einen deutlichen Aktivitätsverlust in den 20S-Proteasomfraktionen erkennen.

## **6 Kristallisation**

Zur Kristallisation wurde die Methode der Dampf-Diffusion im hängenden Tropfen verwendet. Alle Kristallisationsexperimente wurden in Linbro Plates (*ICN*) durchgeführt. Um ein Austrocknen des Tropfens zu verhindern, wurden die Ränder der 24 Vertiefungen plangeschliffen und ölte diese mit einer Abdichtungsmasse (Rotitherm H 250). Für ein optimales Kristallwachstum wurden die Deckgläser siliconisiert (Silikonimprägnierer (*Roth*) in Wasser in einem Mischungsverhältnis von 1 zu 50, zehnminütige Inkubation und Trocknung bei 110 °C) eingetaucht. Nach zehnminütiger Inkubation wusch man die Gläser mit Wasser und trocknete diese bei 110 °C. Auf das hydrophobisierte Deckglas wurden 2 µl Proteinlösung mit 2 µl Fällungslösung vermischt und über 1 ml Reservoirlösung plaziert. Die eingesetzten Pufferlösungen wurden nach Kim / Jancarić<sup>[57]</sup> hergestellt. Die Proteinkonzentration betrug 15 mg/ml in TEN-Puffer. Die Kristallisationsexperimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

## **7 Bestimmung der Kristallgittermetrik**

Die erhaltenen Kristalle wurden an der Strahlführung BW-6 der MPG-Außenstelle am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY), Hamburg vermessen. Die Belichtungszeit der Kristalle mit Synchrotronstrahlung betrug 5000 Counts und die eingestellte Wellenlänge betrug 1.2 Å. Der Abstand zwischen Image Plate-Detektor und Kristall betrug 1400 mm. An dem Kristall wurden Rotationsaufnahmen durchgeführt.

## Ergebnisse

### 1 Reinigung des 20S-Proteasoms

Das 20S-Proteasom wurde aus dem Mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert und charakterisiert.

Der Aufschluss der Hefezellen erfolgte mit einer Glasperlenmühle und der Aufschlußgrad wurde lichtmikroskopisch ermittelt. Von den eingesetzten Zellen wurden ca. 70 % aufgeschlossen. In der Ultrazentrifuge trennte man die groben Zellfragmente ab und bestimmte über die Extinktion die ungefähre Proteinmenge im Extrakt zu 8.5 g. Im ersten Trennschritt trug man den trüben, gelben Überstand auf eine Q-Sepharosesäule auf. Es entstand folgendes Elutionsprofil (Abbildung 5a):

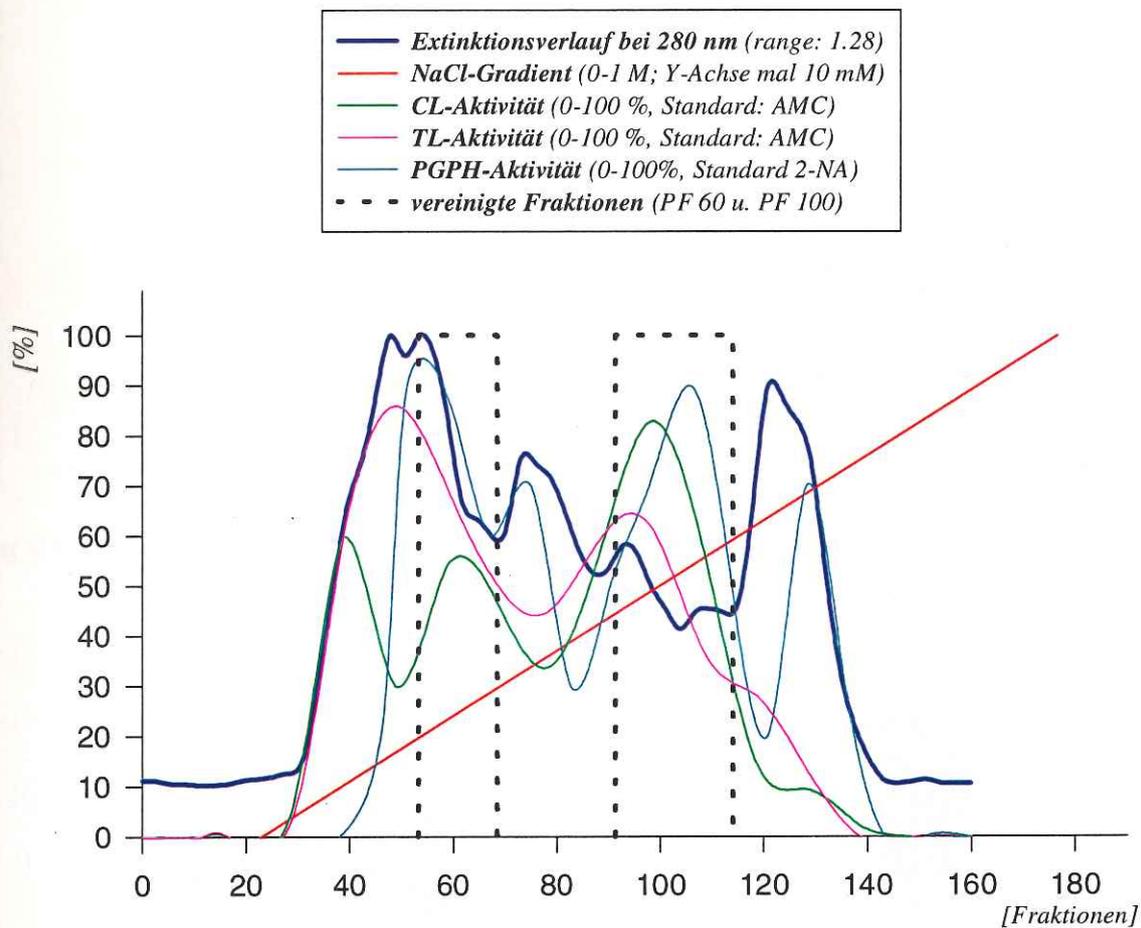
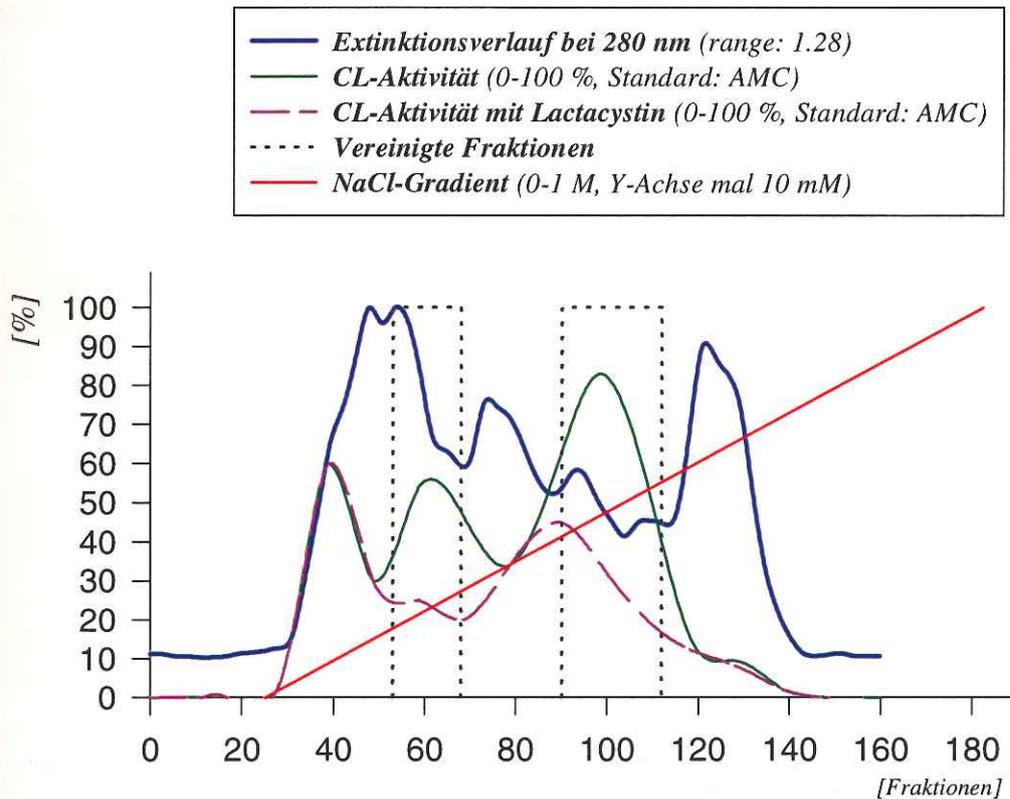


Abbildung 5a: Q-Sepharose-Chromatogramm mit CL-, TL- und PGPH-Aktivität.

Die verschiedenfarbigen Kurven zeigen dabei die CL-, TL- und PGPH-Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen. Da jedoch Überlagerungen der Aktivitäten in allen Bereichen des Chroma-

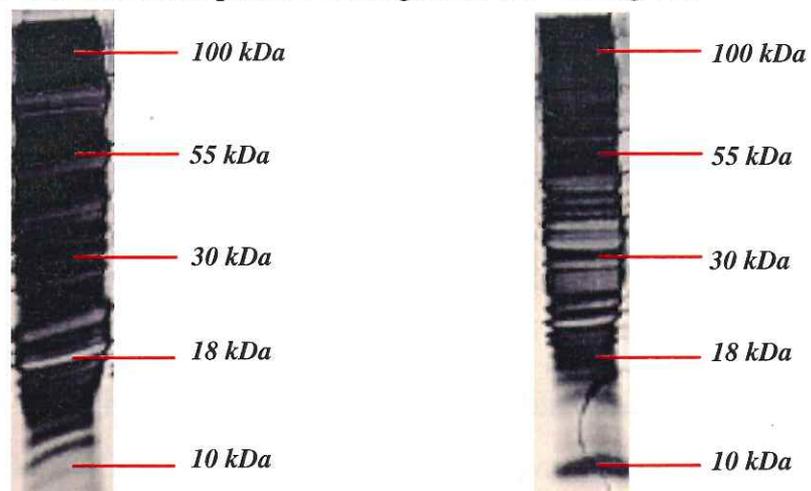
togramms entstanden, wurde durch Zugabe des proteasomspezifischen Inhibitors Lactacystin die CL-Aktivität erneut vermessen.

Die unterbrochene Kurve in *Abbildung 5b* zeigt eine Abnahme der Intensität in der CL-Proteaseaktivität um Fraktion 60 sowie 100, sodaß um diesen Bereich die Fraktionen vereinigt wurden (VP 60 [54-70] und VP 100 [90-115]).



*Abbildung 5b:* Q-Sepharose-Chromatogramm mit CL-Aktivität unter Zusatz von Lactacystin.

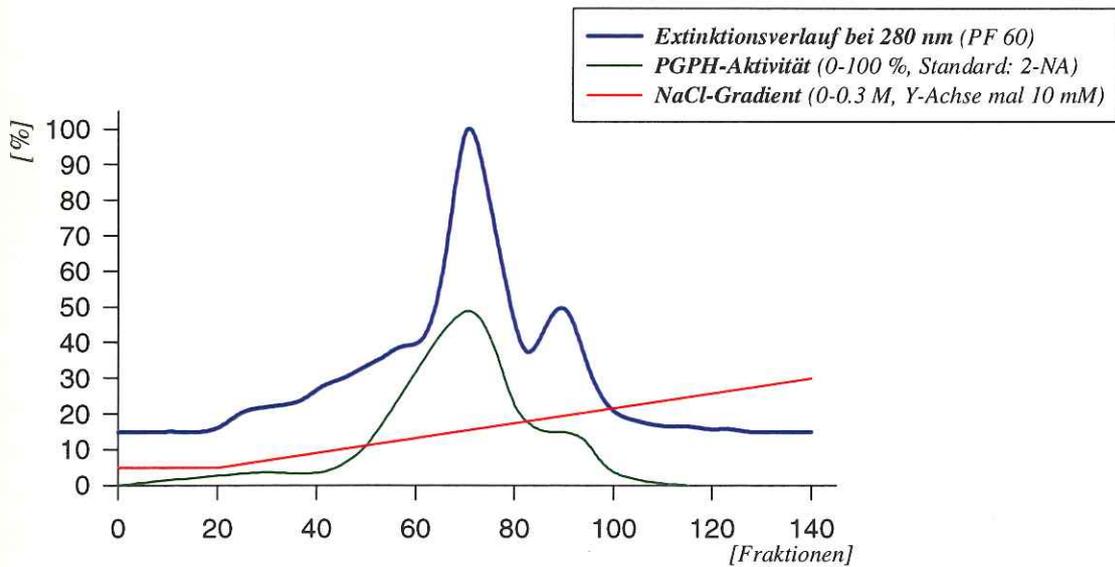
Von VP60 und VP 100 wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (*Abbildung 5c*).



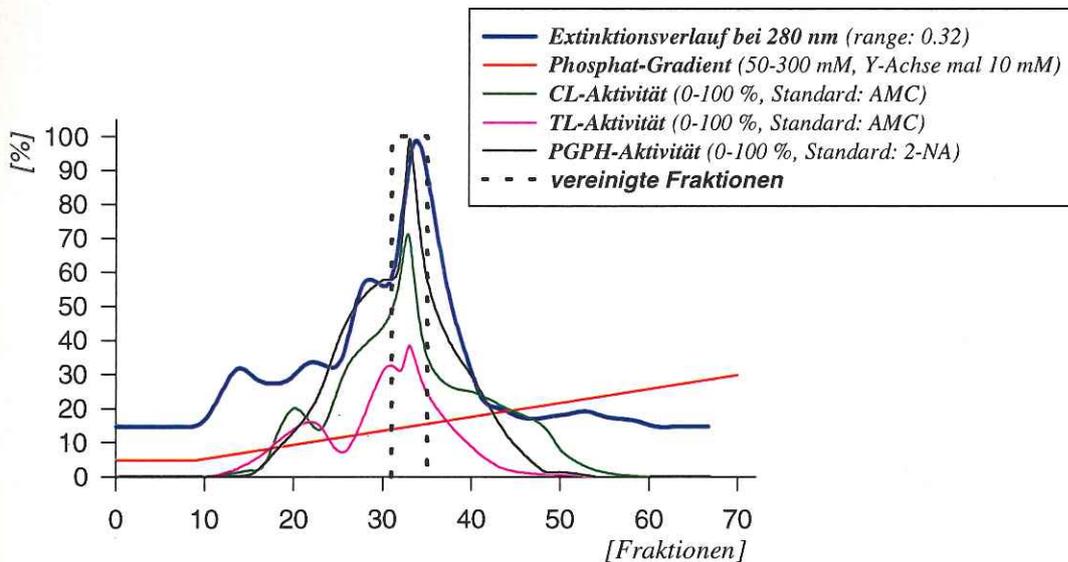
*Abbildung 5c:* 12 % Schäggergel von VP 60 (links) und VP 100 (rechts).

Aufgrund der hohen Anzahl an unterschiedlichen Proteinen auf dem Gel konnte nach dem ersten Reinigungsschritt noch keine Auswahl getroffen werden, in welchen Fraktionen sich das 20S-Proteasom befand.

Für den nächsten Trennschritt wurden die vereinigten Fraktionen VP60 und VP100 jeweils gegen TEN dialysiert und anschließend bei 4 °C auf eine Hydroxylapatitsäule aufgetragen. Als Elutionspuffer wurde Kaliumphosphat verwendet. *Abbildung 6a* und *6b* zeigen die jeweiligen Chromatogramme mit den Aktivitätskurven.



*Abbildung 6a:* VP 60-Hydroxylapatit-Chromatogramm mit PGPH-Aktivität.



*Abbildung 6b:* VP 100-Hydroxylapatit-Chromatogramm mit den Aktivitätstests.

Durch diesen weiteren Reinigungsschritt konnte eine Vielzahl an Fremdproteinen abgetrennt werden.

Die Schäggergelelektrophorese identifizierte das 20S-Proteasom in VP 100. VP 60 hingegen wies keine proteasomtypischen Banden auf (*Abbildung 6c*).

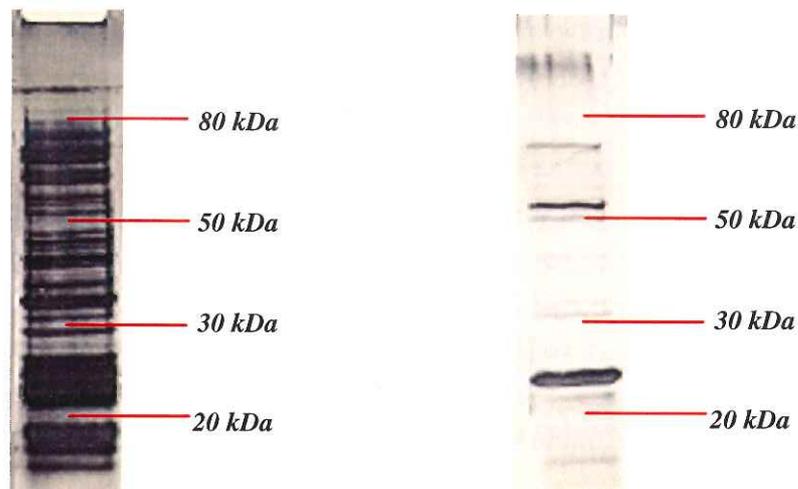


Abbildung 6c: 12 % Schäggergel von VP 60 (links) und VP 100 (rechts) nach der zweiten Trennsäule.

Damit betrug die Natriumchloridkonzentration, mit der das 20S-Proteasom von der Q-Sepharosesäule eluiert wurde, ca. 350 mM, die Phosphatkonzentration, mit der man das Protein von der Hydroxylapatitsäule erhielt, 140 mM.

Der Lowry-Test ergab nach der Ionenaustauschsäule eine Proteinmenge für die vereinigten 20S-Proteasomfraktionen von 500 mg, nach der Hydroxylapatitreinigung eine Proteinmenge von 80 mg. Damit konnte durch diese beiden Schritte die Hauptmenge an Zellbestandteilen bereits abgetrennt werden.

Die von der Hydroxylapatitchromatographie erhaltenen Fraktionen 31-37 wurden mit der Amicon-Zelle auf ca. 10 ml eingengt und auf die MonoQ-Säule an der FPLC-Anlage aufgetragen. Das dabei entstehende Chromatogramm, sowie das dazugehörige Schäggergel zeigen *Abbildung 7a* und *7b*.

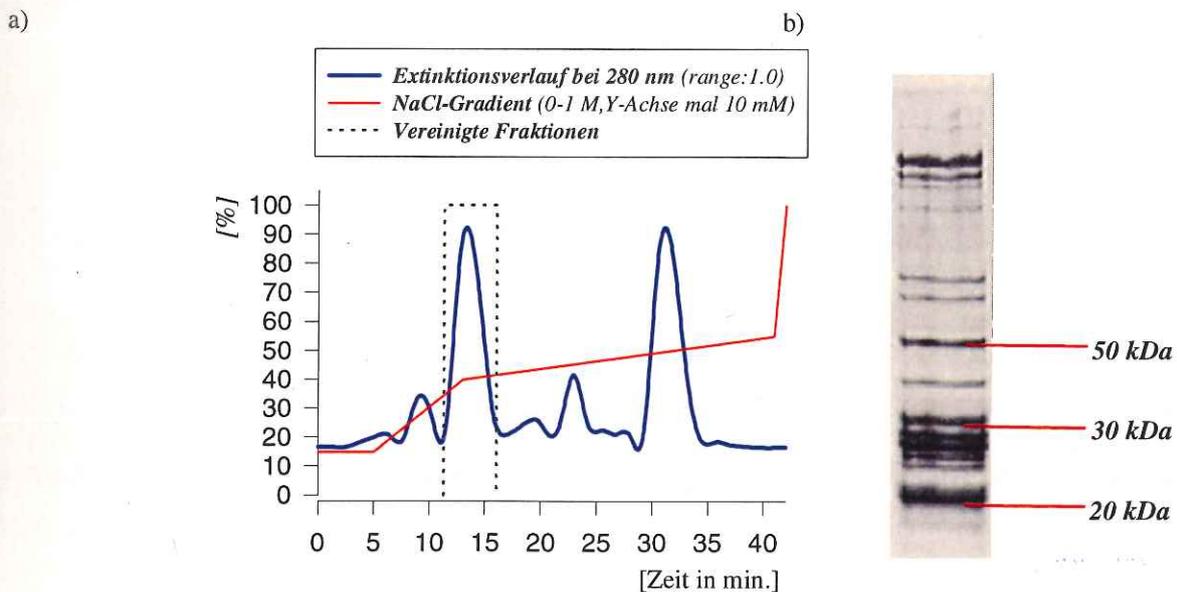
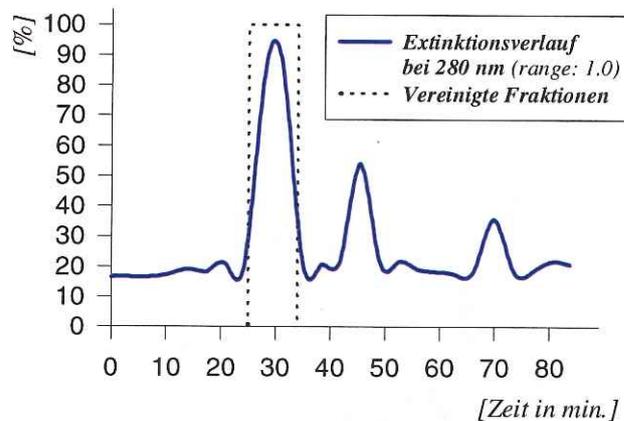


Abbildung 7a,b: MonoQ-Chromatogramm an der FPLC-Anlage / SDS-Gel des 20S-Proteasoms.

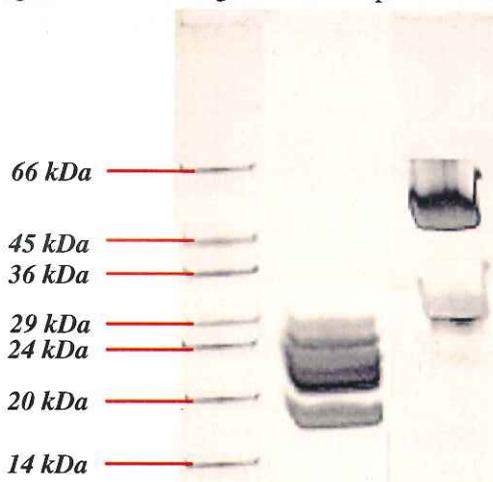
Nach diesem Trennverfahren betrug die Proteinmenge 29 mg. Neben dem als 20S-Proteasom identifizierten Peak (445 mM Natriumchlorid) konnte noch ein weiteres Protein in hohen Menge (10 mg) isoliert werden. Das Schäggergel zeigte (Abbildung 8b(3)), daß es sich dabei um ein dem Proteasom nichtverwandtes Protein handelte.

Der letzte Reinigungsschritt wurde mit einer Superose 6-Säule an der FPLC-Anlage durchgeführt. Hier konnten alle restlichen Verunreinigungen abgetrennt und das 20S-Proteasom zusätzlich entsalzt werden. Dafür wurde das Proteingemisch auf ca. 20 mg/ml aufkonzentriert und in Proteinmengen bis zu 10 mg auf die Säule aufgetragen. Das hierbei erhaltene Chromatogramm, sowie das Schäggergel zeigen *Abbildung 8a* und *8b(Spur 2)*.

Von dem zweiten gereinigten Protein konnte man anhand des Chromatogramms und des Schäggergels keine weitere Erhöhung der Reinheit feststellen (*Abbildung 8 b(3)*).



**Abbildung 8a:** Chromatogramm von Superose 6 an der FPLC-Anlage.



**Abbildung 8b:** Schäggergel von (1) Marker mit 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14.2 kDa, (2) 20S-Proteasom und (3) unbekanntes Protein

Die Ausbeute des 20S-Proteasoms belief sich auf 14 mg, die des unbekanntes Proteins auf 10 mg.

## 2 Charakterisierung des 20S-Proteasoms

### 2.1 Nachweis der verschiedenen Untereinheiten im Hefeproteasom

Die Schäggergelelektrophorese bestimmte den Molekulargewichtsbereich der verschiedenen Untereinheiten des aufgereinigten 20S-Proteasoms zwischen 20 und 35 kDa (*Abbildung 8b(1) und (2)*). Anhand des Gels kann man ferner erkennen, daß das gereinigte Protein keine Verunreinigungen im Hoch- (>40 kDa) bzw. Niedermolekularbereich (<20) besaß.

Die Durchführung der zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese und die anschließende Silberfärbung ergab mehr als 14 Proteinbanden. Dies bedeutete, daß die Anzahl der verschiedenen Untereinheiten im aufgereinigten Protein von den Literaturwerten abwich. (*Abbildung 9*).

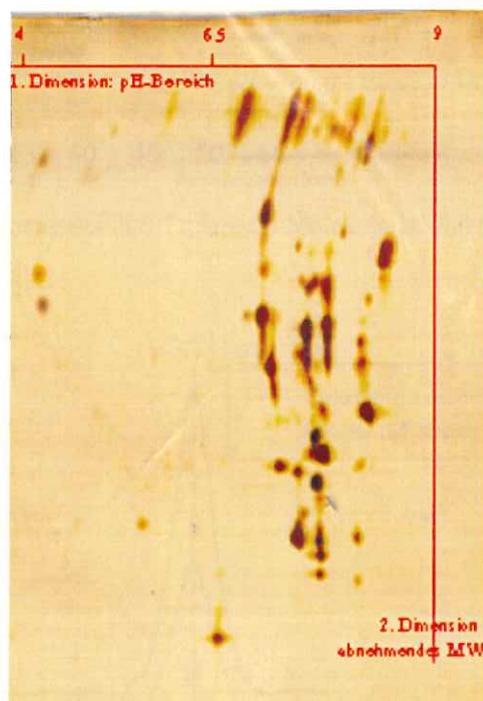


Abbildung 9: Zweidimensionales SDS-Gel (14 %) von 20S-Proteasom.

### 2.2 Molekulargewichtsbestimmung des Proteasoms

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde mit Hilfe des Smart<sup>TM</sup>Systems von Pharmacia durchgeführt. Dabei wurde die verwendete Superose 6 Säule zuvor kalibriert. Als Molekulargewichtsmarker wurden Dextran Blue (2000 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa),  $\beta$ -Amylase (200 kDa), Albumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom c

(12.4 kDa) eingesetzt (Abbildung 10a). Das daraus ermittelte Molekulargewicht des Proteasoms belief sich auf ca. 700 kDa. Das Chromatogramm des 20S-Proteasoms wies einen einzelnen, symmetrischen Peak mit einem Retentionsmaximum von 33.33 min auf (Abbildung 10b). Damit lieferte dieser analytische Nachweis zusätzlich eine gute Proteinreinheitskontrolle.

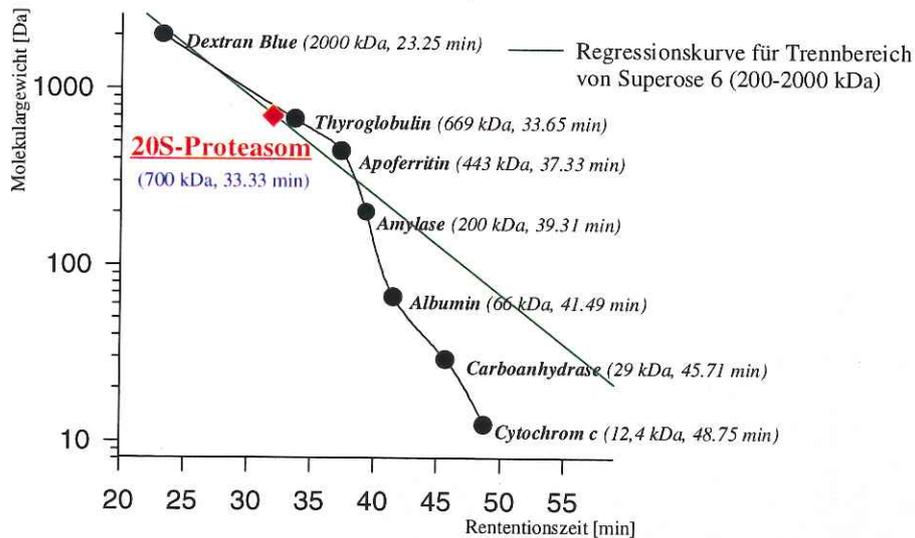


Abbildung 10a: Bestimmung des 20S-Proteasom-Molekulargewichts mit dem Smart™ System.

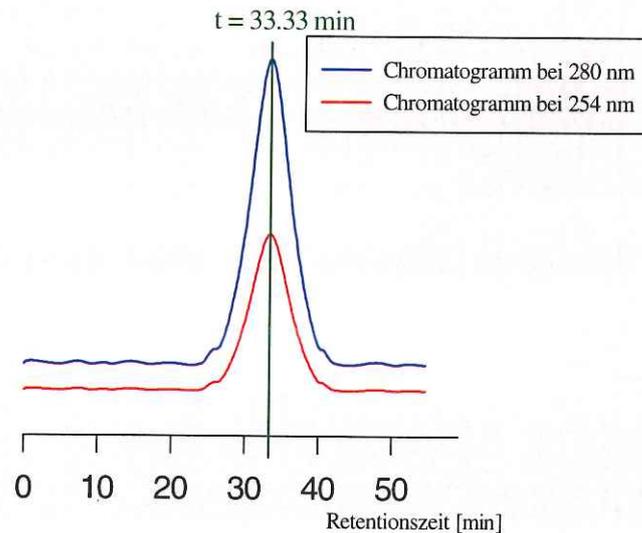


Abbildung 10b: Chromatogramm des 20S-Proteasoms an dem Smart™ System.

### 2.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des 20S-Proteasoms

Das gereinigte 20S-Proteasom wurde mit Uranylacetat *negativ stained* und unter dem Elektronenmikroskop bei einer 49.000-fachen Vergrößerung untersucht. *Abbildung 11* zeigt die zylindrische Struktur des 20S-Proteasoms, die sich aus den  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Scheiben zusammensetzt.

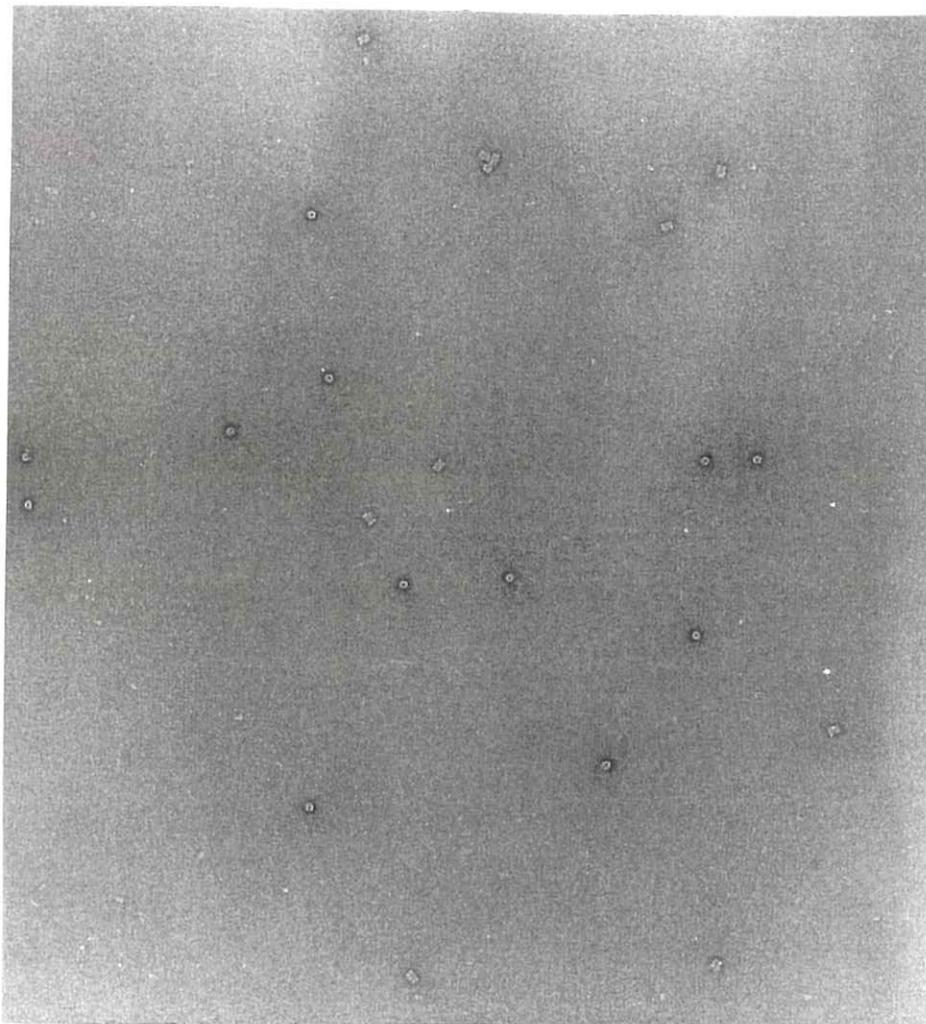


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme des 20S-Proteasoms bei 49.000-facher Vergrößerung.

Die Charakterisierung des 20S-Proteasoms zeigte eine hohe Proteinreinheit, sodaß dieses für Kristallisationsversuche eingesetzt werden konnte.

### 3 Kristallisation des 20S-Proteasoms

Für die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen des 20S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden ca. 200 Lösungen getestet. Als Grundlage für die eingesetzten Reservoirlösungen dienten die von Jancarik und Kim entwickelten Stammlösungen<sup>[56]</sup>. Dabei entstanden bei einer MPD-Konzentration von 50 % sehr feine, dünne Nadeln. Um diese Bedingungen wurden weitere Kristallisationsansätze durchgeführt und es zeigte sich, daß bei Raumtemperatur in einer Reservoirlösung von 31 % MPD, 0.1 M MES / pH 6.2 und 0.15 M Magnesiumacetat hexagonale Kristalle in Plattenform wuchsen. Die Dauer der Kristallisation belief sich auf 4-6 Tage. Die Kristallabmessungen waren  $0.4 \times 0.4 \times 0.2 \text{ mm}^3$  (Abbildung 12). Unter ähnlichen Bedingungen konnten bereits Kristalle des 20S-Proteasoms aus Rinderleber erhalten werden<sup>[57]</sup>.

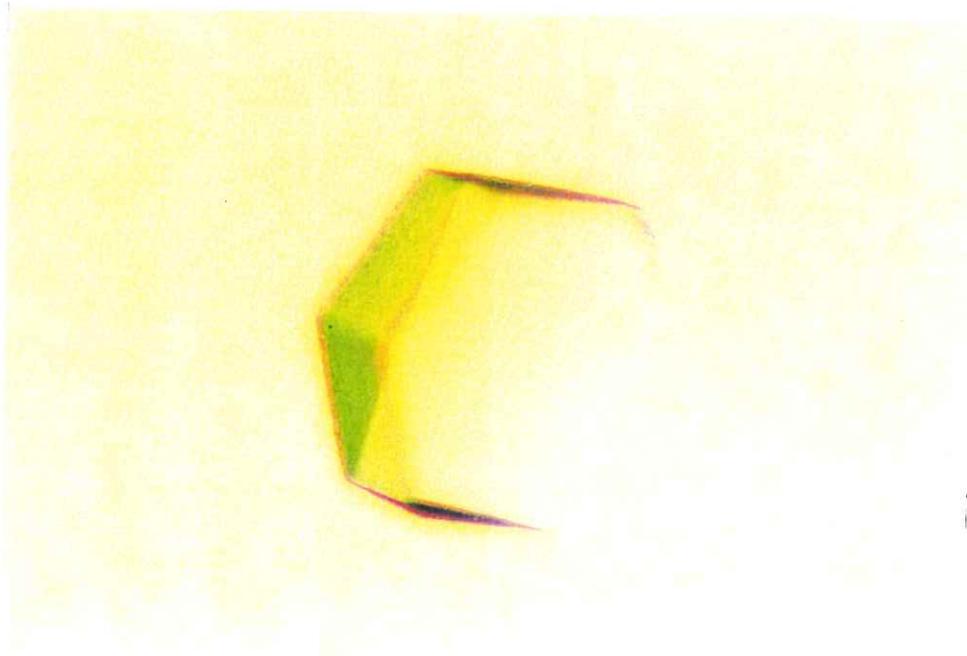


Abbildung 12: Kristallbildaufnahme eines eukaryontischen 20S Hefeproteasoms.

Die MPD-Konzentration hatte auf die Kristallisation einen entscheidenden Einfluß. So entstanden bei MPD-Konzentrationen bis 29 % keine, bei MPD-Konzentrationen ab 33 % nur sehr kleine Kristalle. Der pH-Wert hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Kristallmorphologie. Bei einer Abweichung der Magnesiumacetat-Konzentration von 0.15 M entstanden verwachsene Kristalle.

#### 4 Bestimmung der Elementarzelle des 20S-Proteasoms

Die 20S-Proteasomkristalle wurden an der Strahlführung BW-6 der MPG-Außenstelle am Deutschen Elektronensynchrotron, Hamburg Synchrotronstrahlung ausgesetzt. Durch den großen Abstand des Image Plate-Detektors zum Kristall (1400 mm) entstanden Beugungsbilder mit maximalen Auflösungen von 11 Å. Anhand der Reflexmuster konnten die unterschiedlichen Achsen in der Elementarzelle berechnet werden. Nach ca. 12 Bildern nahm die Streukraft des Kristalls auf ca. 20 Å ab und es wurde ein neuer Kristall eingesetzt.

Abbildung 13a zeigt Beugungsaufnahmen der beiden kleineren Achsen die zu 120 Å bestimmt wurden. Zusätzlich konnte eine hexagonale Anordnung der Reflexpunkte erkannt werden und die Winkel in der Elementarzelle ergaben  $\alpha = \beta = 90^\circ$  und  $\gamma = 120^\circ$ .

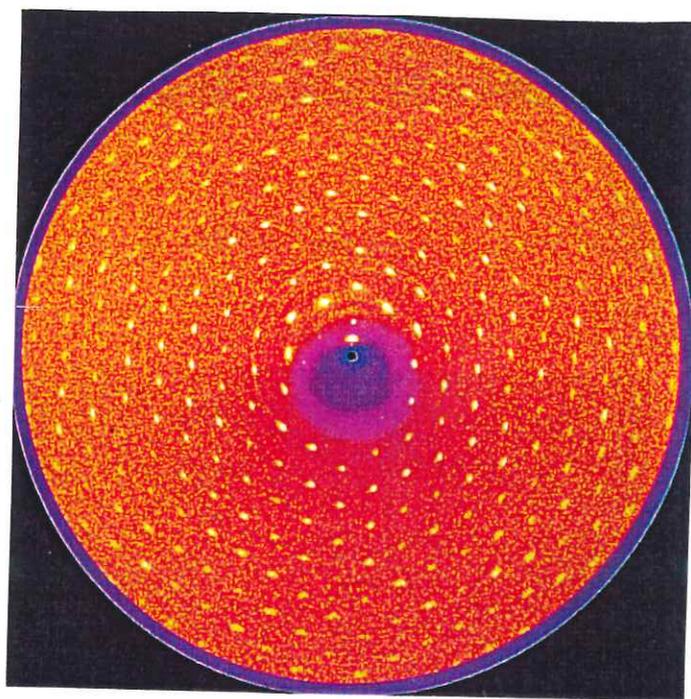


Abbildung 13a: Rotationsaufnahme:  $\Delta\psi = 0.5^\circ$ ,  $t = 5000$  Counts,  $d = 120$  Å, maximale Auflösung = 11 Å.

Für die Reflexauswertung der langen Achse betrug die Entfernung der Image Plate zum Kristallzentrum 1400 mm (Abbildung 13b und c).

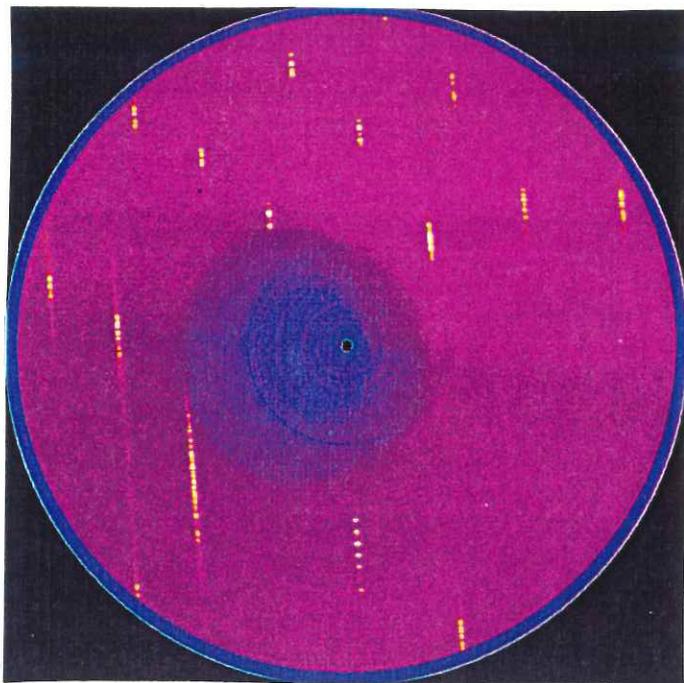


Abbildung 13b: Rotationsaufnahme:  $\Delta\psi = 0.5^\circ$ ,  $t = 5000$  Counts,  $d = 1944 \text{ \AA}$ , maximale Auflösung =  $11 \text{ \AA}$ .

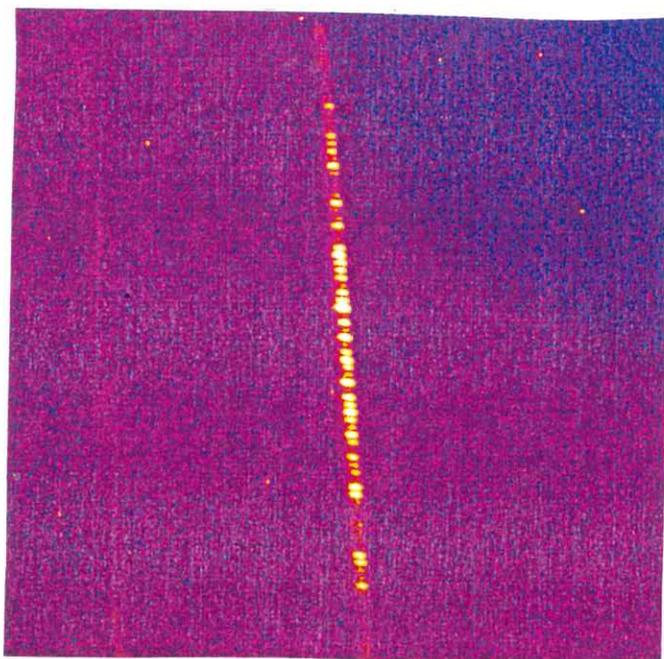


Abbildung 13c: Vergrößerter Ausschnitt von *Abbildung 13b*.

Das Beugungsbild aus *Abbildung 13c* ermöglicht die Berechnung der langen Achse zu:

Abstand der Image Plate : 1400 mm.

Anzahl der Reflexe in der Markierung : 37.

Wellenlänge : 1.2 Å.

Länge der 36 Spots : 31.11 cm.

$$\text{Bestimmung von } \Phi: \quad \tan(2\Phi) = \frac{31.11 \text{ cm}}{1400 \text{ cm}}, \quad \Phi = \underline{1.2733^\circ}$$

$$\text{Bestimmung der Achse} : \quad d = \frac{\lambda}{2 \sin(\Phi)}, \quad \underline{d = 1944 \text{ \AA}}$$

### 5 Identifizierung des zweiten isolierten Proteins als $\beta$ -Elongationsfaktor

Mit der Gelelektrophorese konnte das Molekulargewicht der beiden Untereinheiten des zusätzlich isolierten Proteins zu 25 und 50 kDa bestimmt werden (Abbildung 14(Spur 1) und 14(Spur 3)). Das Gel zeigte keine Verunreinigungen im Hoch- (>40 kDa) bzw. Niedermolekularbereich (<20).

Die Banden des Gel wurden N-Terminal ansequenziert. Es zeigte sich bei beiden Untereinheiten eine Blockierung des N-Terminus. Ein tryptischer Verdau lieferte Peptidfragmente deren Sequenz folgende Zusammensetzung aufwiesen:

#### 50 kDa-Protein:

**Fragment A:** VVTPDAAAQFARD  
**Fragment B:** LTEAMAINYYLV  
**Fragment C:** IVDIFENRLK

Ein Sequenzvergleich mit der Proteindatenbank identifizierte das unbekannte Protein als  $\gamma$ -Elongationsfaktor aus *Saccharomyces cerevisiae*: 415 AS,  $M_w = 47$  kDa

Sequenz:

MSQGTLYANFRIRTWVPRGLVKALKLDVKVVVTPDAAAQFARDPLKKVPAFVGPVKYKLT  
 AMAINYYLVKLSQDDKMKTLGADDDLNAQAIRWQLSANSDLCIQIANTIVPLKGGAYPNKKSVD  
 AMDAVDKIVDIFENRLKKNYTYLATENISLADLVAASIFTRYFESLFGTEWRAQHPAIVRCFNTVRASPFL  
 KDEYKDFKFADKPLSPQKKKEKAPAAAPAASKKKEAKPAATETSKPKKHLELLGKSTFVLDDWKRK  
 YSNEDTRPVALPWFWEHYNPEEYSLWKVTKYKNDLTLTFMDNNLVGGFFNRLSASTKYMFGCLVVY  
 GENNNNGIVGAVMVRGQDYVPAFDVADPWESYDYAKLDPTNDDDKEFINNMWAWAWDKPVSVNGE  
 PKEIVDGKVLK

#### 25 kDa-Protein:

**Fragment A:** AIEMEGLTWGAHQFIPIGFIK

Ein Sequenzvergleich mit der Proteindatenbank identifizierte das unbekannte Protein als  $\beta$ -Elongationsfaktor aus *Saccaromyces cerevisiae*: 205 AS,  $M_w = 22.69$  kDa

Sequenz:

ASTDFSKIETLKQLNASLADKSYIEGTAVSQADVTVFKAFQSAYPEFFRWFNHIAFKADEFDSFPA  
 ASAAAEEEEEDDDVDFGSDDEEADAEAKWKAERIAAYNGROLLKPAKPAKSIVTLDVKPWDETNL  
 EEMVANVKAIEMEGLTWGAHQFIPIGFIKQLQINCVEDDKVSLDDLQQSIEEDEDHVQSTDIAAM  
 QKL

Das Molekulargewicht des  $\beta$ -Elongationsfaktors belief sich auf ca. 420 kDa und wurde wie beim 20S-Proteasom mit dem Smart<sup>TM</sup> System bestimmt.

Das bedeutete, daß es sich bei dem Protein um einen hexameren Komplex aus  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheiten handelt.

---

Das Chromatogramm des Proteins wies einen einzelnen, symmetrischen Peak mit einem Retentionsmaximum von 37.8 min auf. Damit lieferte dieser analytische Nachweis zusätzlich eine gute Reinheitskontrolle über das erhaltene Protein.

Durch die Elektronenmikroskopie erhielt man eine 49.000-fache Vergrößerung einer mit Uranylacetat *negativ gestainten*  $\beta\gamma$ -Elongationsfaktorprobe.

## Diskussion

### 1 Das 20S-Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae*

Das 20S-Präparativ aus *Saccharomyces cerevisiae* ist mit dem im Ergebnisteil beschriebenen Verfahren zugänglich. Es ist möglich, das Protein innerhalb einer Woche zu isolieren und zu charakterisieren.

Hefezellen besitzen eine stabile Zellwand und lassen sich deshalb nur schwer aufschließen. Mit dem Desintegrator konnte dieses Problem gelöst werden. Durch die hohe Geschwindigkeit der Glasperlen, verbunden mit einem ständigen Richtungswechsel, treten in der Zellsuspension starke Scherkräfte auf, welche zur Zellyse führen. Da das eukaryontische 20S-Proteasom ein multimerer Komplex verschiedener Untereinheiten ist, war die Geschwindigkeit der Glasperlen nicht höher als 10 m/s. Damit wurde eine Proteindenaturierung vermieden. Da Hefezellen einen hohen Anteil an Proteasen besitzen, die im Lysat schnell andere Proteine abbauen können, wurde der Zellsuspension PMSF als Proteaseinhibitor zugesetzt. Aus dem durch Ultrazentrifugation abgetrennten Hefeextrakt wurde das 20S-Proteasom erhalten.

Für die Suche nach den Fraktionen, welche das 20S-Proteasom enthalten, wurden die Gele einer Silberfärbung unterworfen. Diese Methode ist sehr empfindlich, da Proteinmengen im Nanogramm-Bereich nachgewiesen werden können. Der Nachteil der Methode ist der hohe Zeitaufwand für die Durchführung (ca. 8h). Nachdem das Protein erstmals gereinigt werden konnte, standen die Elutionsbedingungen für die Chromatographiesäulen fest. Für die nächsten Isolierungen wurde die schneller durchzuführende, Coomassie brilliant Blue-Färbungsmethode verwendet.

Problematisch bei der Reinigungsmethode ist die Hydroxylapatit-Chromatographie. Um mit dem Hydroxylapatitmaterial Wechselwirkungen eingehen zu können, muß das Proteingemisch nach der Ionenaustauschchromatographie mit einer 30 kDa-Membran dialysiert werden. Wie *Abbildung 11c (rechts)* zeigt, besitzen die vereinigten Fraktionen (VP 100) nach der Q-Sepharose noch eine große Anzahl an Proteinen, unter denen auch Proteasen zu finden sind. Da die Dialyse viel Zeit in Anspruch nimmt, wird das 20S-Proteasom von den noch vorhandenen Proteasen abgebaut, sodaß viel Protein verloren geht.

Ferner müssen für die Hydroxylapatitsäule die vereinigten Fraktionen stark eingengt werden. Der Grund hierfür ist der Puffer, in dem das Protein nach der ersten Säulenchromatographie vorliegt. Dieser enthält EDTA, das als Chelatbildner metallische Ionen in Proteasen komplexiert und diese damit inaktiviert. Durch Auftragen großer Volumina an EDTA auf die Hydroxylapatitsäule wird das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Material gelöst und die Trennwirkung geht verloren.

Im Gegensatz zum Hydroxylapatit bindet das Phenylsepharosematerial Proteine bei einer hohen Salzkonzentration (> 500 mM Natriumchlorid). Mit einem linear abnehmenden Natriumchloridgradienten können die gebundenen Proteine eluiert werden. Vorversuche zeigten, daß die Hydrophobizität des Phenylsepharosematerials für eine 20S-Proteasomdenaturierung nicht ausreicht, sodaß die Hydroxylapatitsäule gegen die Phenylsepharosesäule ausgetauscht werden könnte.

Der Vorteil hiervon wäre, daß die von der Q-Sepharose erhaltenen Fraktionen nicht mehr dialysiert werden müßten, was die Aufarbeitung erheblich verkürzt und den Proteinverlust vermindert. Ferner könnte man das Säulenmaterial mehr als einmal verwenden, sodaß die Kosten für die Proteingewinnung gesenkt werden.

Die Proteinendreinigung erfolgt mit einer MonoQ und Superose 6-Säule an der FPLC. Ein Versuch, das 20S-Proteasom bei hoher Salzkonzentration (450 mM Natriumchlorid in TEN-Puffer) zu lagern, bewirkt dessen Inaktivierung. Somit eignet sich besonders als letzter Trennschritt die Superose 6-Säule, da diese neben der restlichen Abtrennung von Verunreinigungen das Protein zusätzlich entsalzt. Die 20S-Proteasomfraktionen nach der Gelfiltrationssäule sind in TEN-Puffer bei 4 °C für zwei Wochen lagerbar.

Das SDS-Schäggel des gereinigten 20S-Proteasoms zeigt Banden der 14 verschiedenen Untereinheiten in einem Bereich von 20-35 kDa. Der von der Literatur erhaltene Wert dieser Polypeptide liegt zwischen 21 und 32 kDa und stimmt gut mit den Molekulargewichtsergebnissen aus dem SDS-Schäggel überein. Man erkennt, daß Proteine im Hoch- bzw. Niedermolekularbereich fehlen. Damit steht fest, daß das Proteasom keine weiteren Peptidfragmente gebunden hat und nach der Reinigung als 20S-Proteasom vorliegt. Da die Molekulargewichte einiger Untereinheiten ähnlich sind erscheinen die Banden auf dem Gel verbreitert. Eine Erhöhung der SDS-Konzentration im Gel und eine zusätzliche längere Laufzeit führten nicht zur Trennung der 14 verschiedenen Banden. In dem Bereich von 20 - 35 kDa kann auch keine Aussage über eine Anwesenheit von Fremdprotein getroffen werden.

Das zweidimensionale Gel zeigt eine weitaus höhere Anzahl an Banden.

Man weiß, daß unterschiedliche Hefearten Punktmutationen in den Proteasompeptidsequenzen besitzen können. Beispielsweise findet durch Austausch von Asp gegen Ala in einer Untereinheit eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes statt.

Ferner ist bekannt, daß bei einer isoelektronischen Fokussierung einzelne Aminosäurereste einer Hydrolyse ausgesetzt sind (beispielsweise Asn zu Asp) und damit besitzen viele gereinigte Proteine mehr als eine Bande bei einer isoelektronischen Fokussierung.

Bei der 2D-SDS-Gelelektrophorese wird in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Die Silberfärbung ist eine genaue Nachweismethode, mit der kleinste Mengen an Verunreinigung sichtbar werden.

Die Gelfiltrationschromatographie mit der Superose 6-Säule am Smart<sup>TM</sup> System zeigte, daß das 20S-Proteasom sehr sauber isoliert werden konnte. Der optimale Trennbereich der Superose 6 Säule liegt zwischen 200 und 2000kDa, sodaß mit dieser analytischen Methode kleine Mengen an Fremdprotein mit ähnlichen Molekulargewichten nachweisbar sind. Das aufgereinigte 20S-Proteasom wies einen symmetrischen Peak mit einer Retentionszeit von 33.3 min auf. Das dazugehörige Molekulargewicht beträgt ca. 700 kDa und stimmt mit den in der Literatur gefundenen Werten sehr gut überein. Damit liegt das 20S-Proteasom nach der Reinigung als monomerer Komplex vor.

Seit längerer Zeit wird vermutet, daß das 20S-Proteasom mit RNA-Fragmenten Wechselwirkungen eingehen kann. Dies wurde bei dem aus *Saccharomyces cerevisiae* gereinigten Protein nicht bestätigt. Hierfür wurde dieses einem TEN Puffer mit hoher Natriumchlorid-Konzentrationen (800 mM) ausgesetzt und auf die ebenfalls unter diesen Bedingungen vorequilibrierte Superose 6-Säule gegeben. Die Wellenlänge des Detektors stellte man auf eine RNA-typische Wellenlänge von 218 und 254 nm ein. Das Chromatogramm enthielt hierbei neben dem Hauptpeak bei 33.3 min zwei weitere Signale mit Retentionszeiten von 49 und 54 min. Die Signale wurden über eine Sequenzanalyse als 20S-Proteasomabbauprodukte und nicht als RNA-Fragmente identifiziert.

Anhand der in *Abbildung II* dargestellten elektronenmikroskopischen Aufnahme konnte gezeigt werden, daß sich das Protein aus vier regelmäßigen Scheiben zusammensetzt und damit einen geordneten zylindrischen Komplex bildet. Bei genauerer Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahme eines  $\alpha$ -Rings erkennt man zusätzlich eine regelmäßige Anordnung der Untereinheiten unter Ausbildung des Eingangskanals zum aktiven Zentrum. Damit wird bei dieser Reinigungsmethode das 20S-Proteasom nicht beschädigt und kann für Kristallisationsversuche verwendet werden.

Die unter den Bedingungen 31 % MPD, 0.1 M MES / pH 6.2 und 0.15 M Magnesiumacetat erhaltenen hexagonalen plattenförmigen Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von 3.4 Å unter Verwendung einer Kupferdrehanode mit einer monochromatischen Kupfer  $K_{\alpha}$ -Strahlung von  $\lambda = 1.5418$  Å und einer Image Plate (*Daten nicht gezeigt*). Bei Verwendung von Synchrotronstrahlung könnte die Auflösung zunehmen, die Lebensdauer des Kristalls ist aber durch die hohe Intensität verkürzt.

Die Elementarzelle des 20S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg mit Synchrotronstrahlung zu  $a = b = 120$  Å und  $c = 1944$  Å mit  $\alpha = \beta = 90^\circ$  und  $\gamma = 120^\circ$  bestimmt. Für eine ausreichende Trennung der Reflexe wurde die Image Plate 1400 mm vom Kristallzentrum plaziert. Dadurch konnten Aufnahmen bis zu einer Auflösung von 11 Å erhalten werden. Für die Aufzeichnung von Reflexen bei höherer Auflösung müßte die Image Plate seitlich versetzt werden. Intensitäten von Rotationsaufnahmen wurden bislang nicht ausgewertet, sodaß nur Vermutungen über Packung und Raumgruppe gemacht werden können.

Die hexagonale Kristallmorphologie (*Abbildung 18*) und die aus den Beugungsaufnahmen erhaltenen Winkel legen eine hexagonale Elementarzelle nahe. Aus *Abbildung 19b* erkennt man eine regelmäßige Reflexauslöschung, was auf eine Schraubenachse hindeutet ( $x = 1-5$ ).

Für eine hexagonale Elementarzelle, kommen als Raumgruppe  $P6_x$  und  $P6_x22$  in Frage. Für die Raumgruppe  $P6_x$  besitzt der Matthews-Koeffizient in Abhängigkeit von der Anzahl an Proteasommolekülen in der asymmetrischen Einheit folgende Werte:

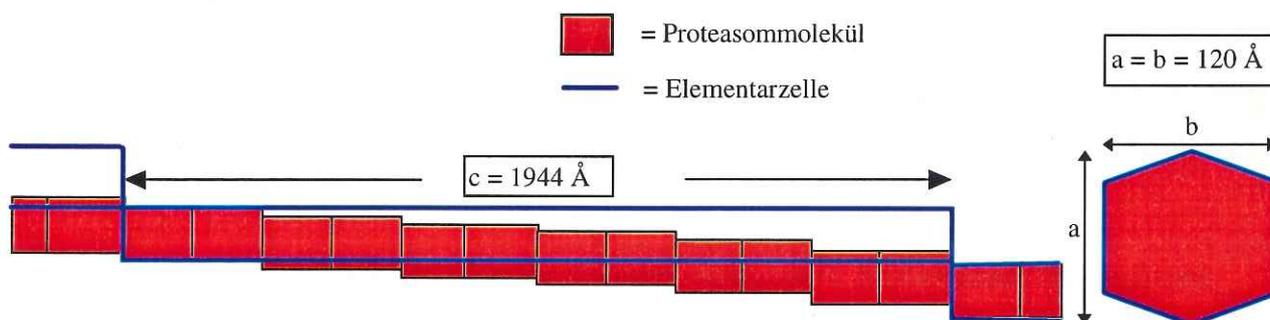
$V_M$  in [ $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ]:

- 5.8 für ein 20S-Proteasommolekül in der asymmetrischen Einheit (1).
- 2.9 für zwei 20S-Proteasommoleküle in der asymmetrischen Einheit (2).
- 1.9 für drei 20S-Proteasommoleküle in der asymmetrischen Einheit (3).

Eine Packung mit zwei 20S-Proteasomen in der asymmetrischen Einheit ergibt bei einer Raumgruppe von  $P6_x$  einen Matthews-Koeffizienten von 2.9. Damit würde der Solvensgehalt 57 % betragen. Matthews-Koeffizienten kleiner 2 und größer 4 sind eher unwahrscheinlich.

Dividiert man die 1944  $\text{\AA}$ -Achse durch die Länge eines 20S-Proteasoms, so ergibt sich der Wert 12. Der Durchmesser des Proteins ist ca. 120  $\text{\AA}$  und entspricht damit den restlichen beiden Zellabmessungen. Somit würde eine Elementarzelle 12 Moleküle aufweisen.

*Abbildung 21* zeigt ein mögliches Vorliegen der 20S-Proteasommoleküle in der Elementarzelle  $P6_x$  unter obigen Voraussetzungen.



*Abbildung 21:* Packung des 20S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae* in die Elementarzelle mit  $P6_x$ .

Versuche von Brown *et al.* zeigten, daß der eukaryontische zylindrische 20S Komplex von beiden Seiten mit Antikörpern Bindungen einging, sodaß eine  $C_2$ -Molekülsymmetrie postuliert wurde <sup>[13]</sup>.

Der Vorteil von zwei 20S-Proteasomen in der asymmetrischen Einheit ( $P6_x$ ) wäre aufgrund der zusätzlichen nichtkristallographischen Symmetrie ein vierfaches Mitteln der Elektronendichte über die Proteasomuntereinheiten. Damit könnte das Signal-Rauschverhältnis verbessert werden, sodaß die Abweichungen der Untereinheiten bei einer niedrigen Auflösung von etwa 3.2  $\text{\AA}$  leicht erkennbar wären.

Löwe *et al.* konnten vor kurzem die Kristallstruktur des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* lösen. Da zwischen der eukaryontischen und prokaryontischen 20S-Proteasomsequenz Homologie besteht, müßte die Phasenbestimmung über Pattersonsuchmethoden möglich sein.

Anhand der Streuaufnahmen konnte keine Aussage über senkrecht zur sechszählig-stehenden zweizähligen Achsen gemacht werden. Neben  $P6_x$  ist somit ebenso die Raumgruppe  $P6_x22$  möglich. Bei dieser Anordnung würde bei einem 20S-Proteasommolekül in der asymmetrischen Einheit der Matthews-Koeffizient zu 2.9 bestimmt. Durch die Reduzierung der asymmetrischen Einheit auf ein Molekül würde das vierfache Mitteln der Elektronendichte über die 20S-Proteasomuntereinheiten verloren gehen. Das Ergebnis wäre eine Verschlechterung der Elektronendichte und ein erschwertes Einbauen der Aminosäurereste.

Bislang zeigte sich, daß die Kristalle bei Raumtemperatur im Röntgenstrahl begrenzt haltbar sind und nach kurzen Belichtungszeiten an Streukraft verlieren. Durch Schockfrieren des Kristalls könnte ein hochaufgelöster kompletter Nativdatensatz des eukaryontischen 20S-Proteasoms erhalten werden. Das Problem dieser Methode ist die Suche nach einem geeigneten Puffer, der die Auskristallisation des Solvens im Kristall und damit dessen Zerstörung verhindern soll.

Für die 20S-Proteasomkristalle aus *Thermoplasma acidophilum* existiert bereits ein solcher Puffer, der es ermöglicht, komplette Datensätze aus einem einzigen Kristall zu erhalten.

Der Vorteil des Schockfrierens ist also die Erhöhung der Lebensdauer des Kristalls im Röntgenstrahl. Als Nachteil könnte eine hohe Mosaizität auftreten, die eine Datenauswertung erschwert.

Ohne das Schockfrieren müßten die Daten von verschiedenen Kristallen gesammelt und kombiniert werden. Das mögliche Auftreten von Nichtisomorphie zwischen verschiedenen Kristallen würde die Datenqualität erniedrigen und die Strukturlösung erschweren.

Die sehr lange Achse in der Elementarzelle bedeutet einen hohen Meßaufwand für einen nativen Datensatz am DESY-Zentrum. Eine Alternative wäre eine Datensammlung in Grenoble an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF).

## 2 Der $\beta\gamma$ -Elongationsfaktor aus *Saccaromyces cerevisiae*

### 2.1 Eigenschaften des $\beta\gamma$ -Elongationsfaktors

Neben dem 20S-Proteasom konnte aus *Saccaromyces cerevisiae* ein zweites Protein isoliert und als  $\beta\gamma$ -Elongationsfaktor identifiziert werden.

Das Protein wurde längere Zeit in einer Natriumchloridkonzentration von 550 mM in TEN-Puffer aufbewahrt und erst nach ca. zwei Wochen über eine Superose 6-Säule an der FPLC-Anlage entsalzt. Anhand des Chromatogramms der Gelfiltrationssäule konnte man erkennen, daß keine Abbaubanden entstanden waren. Damit kann aus dem Heferohextrakt innerhalb von drei Trennsäulen das Protein isoliert werden. Dieses liegt nach der MonoQ-Säule in 550 mM Natriumchlorid vor und kann in dieser Lösung gelagert werden.

Das SDS-Schäggergel des Proteins zeigt zwei Banden. Die daraus gewonnene Sequenzanalyse identifizierte diese als den  $\beta$ - und den  $\gamma$ -Elongationsfaktor und bestimmte das Molekulargewicht der Untereinheiten zu 23 ( $\beta$ -Untereinheit) und 47 kDa ( $\gamma$ -Untereinheit).

Die Gelfiltrationschromatographie mit der Superose 6-Säule an dem Smart<sup>TM</sup> System zeigte, daß es sich bei dem Protein um einen einzigen oligomeren Komplex handelt, der sich aus je sechs  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten zusammensetzt. Das gereinigte Protein wies einen symmetrischen Peak mit einer Retentionszeit von 37.8 min auf. Das dazugehörige Molekulargewicht beträgt ca. 450 kDa. Die Literatur beschreibt lediglich, daß es Multimere der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht bis zu 2000 kDa geben kann. Hier konnte eindeutig ein Komplex der aus sechs  $\beta$ - und sechs  $\gamma$ -Untereinheiten besteht isoliert werden.

Die Elektronenmikroskopie zeigt einheitliche kugelförmige Partikel (*Bild nicht gezeigt*), sodaß davon ausgegangen werden kann, daß der gereinigte  $\beta\gamma$ -Elongationsfaktor durch die Trennmethode nicht beschädigt wurde.

Bislang konnten noch keine Kristallisationsbedingungen gefunden werden.

### 2.2 Funktionen von Elongationsfaktoren

Die Funktion des  $\beta\gamma$ -Elongationsfaktors ist die Steuerung der Proteinbiosynthese<sup>[57]</sup>. Die Zusammensetzung von AS zu Polypeptidsequenzen findet an den Ribosomen unter Ablesen der mRNA statt. Dieser Prozeß wird durch sogenannte Elongationsfaktoren unterstützt. Man unterscheidet dabei den EF-Tu- vom EF-Ts-Komplex.

Ein korrektes Binden der Aminoacyl tRNA zu den translatierenden Ribosomen wird über den Elongationsfaktor EF-Tu geregelt. Dieses Protein besitzt die Fähigkeit einen ternären Komplex mit der Aminoacyl tRNA und GTP zu bilden. Unter gleichzeitiger Hydrolyse von GTP in GDP und  $P_i$  wird die dazugehörige Aminoacyl tRNA an den mRNA-Komplex im Ribosom gebunden<sup>[58]</sup>. Das Ersetzen von GDP im EF-Tu-GDP-Komplex wird über einen weiteren Separationsfaktor, dem sogenannten Nukleotid-Austausch-Faktor EF-Ts eingeleitet.

Der  $\alpha$ -Elongationsfaktor ersetzt nun den EF-Tu-Komplex und das Dimere aus den zwei Polypeptiduntereinheiten, EF-1 $\beta$  und EF-1 $\gamma$  bildet den EF-Ts-Komplex. Die aktuelle Austauschgeschwindigkeit hängt von der Phosphorylierung des Ser<sup>89</sup>-Restes im EF1- $\beta$ -Faktor ab<sup>[59]</sup>. Über die Eigenschaft von EF-1 $\gamma$  im  $\beta\gamma$ -Elongationskomplex ist bis heute nahezu nichts bekannt. Es wird vermutet, daß die starke Hydrophobizität des  $\gamma$ Elongationsfaktors Effekte auf die Stimulation der Austauschaktivität von EF-1 $\beta$  besitzt<sup>[60]</sup>.

## Zusammenfassung

Eukaryontische 20S-Proteasome sind hochmolekulare, multikatalytische nicht-lysosomale Proteinasekomplexe ( $M_w = 700$  kDa), die aus vier übereinanderliegenden, siebenzähligen Ringen ( $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ ) aufgebaut sind. Ihre Aufgabe ist der Abbau von Proteinen im Cytosol und im Nukleus. Das 20S-Proteasom besitzt Steuerfunktionen für Zellzyklus und Immunsystem.

Das Molekül hat mit *Chymotrypsin-like* (CL), *Trypsin-like* (TL), *Peptidylglutamyl Peptide Hydrolase* (PGPH), *Small Neutral Aminoacid-prefering* (SnAAP) und *Branched Chain Aminoacid-prefering* (BrAAP) fünf verschiedene Proteaseaktivitäten. Die einzelnen aktiven Zentren im 20S-Proteasom können unterschiedlich stark inhibiert oder aktiviert werden, sodaß die Zelle auf äußere Umfeldveränderungen reagieren kann.

Das Protein konnte aus dem Organismus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert werden. Der Aufschluß der Zellen gelang mit einer Glasperlenmühle. Aus dem Zellysate konnte mit Säulenchromatographie (Q-Sepharose, Hydroxylapatit, MonoQ und Superose 6) das 20S-Proteasom isoliert werden.

Über eine analytische Gelfiltrationschromatographie wurde das Molekulargewicht des 20S-Proteasoms zu 700 kDa bestimmt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß das Protein nach der Reinigung als  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Komplex vorlag und für Kristallisationsexperimente eingesetzt werden konnte.

Aus einer Lösung von 31 % MPD, 0.1 M MES, pH 6.2, und 0.15 M Magnesiumacetat wurden hexagonale plattenförmige Kristalle erhalten, die unter Verwendung einer Kupferdrehanode mit einer monochromatischen Kupfer- $K_\alpha$ -Strahlung von  $\lambda = 1.5418$  Å bis zu einer Auflösung von 3.4 Å streuten.

Die Elementarzellenparameter wurden am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg mit Synchrotronstrahlung zu  $a = b = 120$  Å und  $c = 1944$  Å mit  $\alpha = \beta = 90^\circ$  und  $\gamma = 120^\circ$  ermittelt. Aufgrund der Kristallmorphologie und der Winkel handelt es sich wahrscheinlich um eine hexagonale Zelle. Als Raumgruppen kämen hierfür  $P6_x$  oder  $P6_x22$  in Frage ( $x = 1-5$ ).

Die bekannte Struktur des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* könnte für das 20S-Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae* die Phasen mittels Patterson-Such-Methoden liefern. Damit wird eine Kristallstrukturbestimmung möglich.

Neben dem 20S-Proteasom konnte noch ein weiteres Protein isoliert werden. Durch Sequenzanalyse der Untereinheiten und Molekulargewichtsbestimmung konnte das Molekül als hexamerer Komplex des  $\beta\gamma$ -Elongationsfaktor charakterisiert werden.

Die Aufgabe von Elongationsfaktoren ist es, die Reaktion von Aminosäuren zu Polypeptidsequenzen an den Ribosomen zu unterstützen.

## Literaturverzeichnis

- [1] A. Ciechanover, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway, *Cell* **79**, 13-21 (1994).
- [2] J. M. Peters, Z. Cejka, J. R. Harris, J. A. Kleinschmidt, W. Baumeister, Structural features of the 26S-proteasome, *J. Mol. Biol.* **234**, 932-937 (1993).
- [3] A. J. Rivett, Proteasomes: multikatalytic proteinase complexes *Biochem J.* **291**, 1-10 (1993).
- [4] A. L. Goldberg, Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel, *Science.* **268**, 522-523 (1995).
- [5] J. Darnell, H. Lodish, B. Baltimore, An Introduction to Genetics Analysis, *W. H. Freeman and Company - New York*, 5. Auflage, S. 53, (1993).
- [6] J. Darnell, H. Lodish, B. Baltimore, Molekulare Zellbiologie, *Walter de Gruyter* 2. Auflage, S. 1092, (1994).
- [7] M. Glotzer, A. W. Murray, M. W. Kischner, Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway, *Nature* **349**, 132-138 (1991).
- [8] M. Ghislain, A. Udvardy, 26S-Protease mutants arrest cell division in G<sub>2</sub>/Metaphase, *Nature* **366**, 358-362 (1993).
- [9] W. Hilt, W. Heinemeyer, D. H. Wolf, Studies on the yeast proteasomes: uncover its basic structural features and multiple in vivo functions, *Enzyme Protein* **47**, 189-201 (1993).
- [10] K. Konimani, G. N. DeMartino, C. Moomaw, C. A. Slaughter, N. Shimbara, M. Fujimuro, H. Yokosawa, H. Hisamatsu, N. Tanahashi, Y. Shimizu, K. Tanaka, A. Toh-e, Nin1p, a regulatory subunit of the 26S-proteasome, is necessary for activation of cdc28p kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.* **14**, 3105-3115 (1995).
- [11] J. J. Monaco, H. O. McDevitt, Identification of a fourth class of proteins linked to the murine MHC-complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3001-3005 (1982).
- [12] J. J. Monaco, H. O. McDevitt, The LMP antigens: A stable MHC-controlled multisubunit protein complex, *Hum. Immunol.* **15**, 416-426 (1986).
- [13] M. G. Brown, J. Driscoll, J. J. Monaco, Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome, *Nature* **353**, 355-357 (1991).
- [14] K. L. Rock, C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, A. L. Goldberg, 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 (1991).

- [15] M. Gaczynska, K. L. Rock, A. L. Goldberg, Role of proteasomes in antigen presentation, *Enzyme Protein* **47**, 354-369 (1993).
- [16] L. J. Harris, S. B. Larson, K. W. Hasel, J. Day, A. Greenwood, A. McPherson, The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma, *Nature* **360**, 389-375 (1992).
- [17] J. Darnell, H. Lodish, B. Baltimore, Molekulare Zellbiologie, *Walter de Gruyter* 2. Auflage, S. 1183, (1994).
- [18] T. T. Lah, M. Hawley, K. L. Rock, A. L. Goldberg, Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsin B and L, in macrophages, *FEBS Letters* **363**, 85-89 (1995).
- [19] Y. Yang, J. B. Waters, K. Fruh, P. A. Peterson, Proteasomes are regulated by interferon gamma: Implications for antigen processing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 4828-4932 (1992).
- [20] M. Gaczynska, K. L. Rock A. L. Goldberg, Gamma-interferon and expression of MHC-genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes, *Nature* **365**, 264-267 (1993).
- [21] S. Huang, W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, L. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, M. Aguet, Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor, *Science* **259**, 1742-1747 (1993).
- [22] J. M. Peters, Proteasomes: protein degradation machines of the cell, *Trends Biochem. Sci.* **19**, 377-382 (1994).
- [23] P. Zwickl, Das Proteasom aus *Thermoplasma acidophilum*: Primärstruktur der beiden Untereinheiten, funktionelle Expression in *Escherichia coli* und Untersuchungen zur Assemblierung, Dissertation am MPI für Biochemie-Martinsried (1995).
- [24] C. R. Woese, O. Kandler, M. L. Wheelis, Towards a natural system of organismus: proposal for the domains *archaea*, *bacteria* and *eucarya*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579 (1990).
- [25] A. P. Arrigo, M. Simon, J. L. Darlix, P. F. Spahr, A 20S Particle ubiquitous from yeast to human, *J. Mol. Evol.* **25**, 141-150 (1987).
- [26] P. E. Falkenburg, C. Haass, P. M. Kloetzel, B. Niedel, F. Kopp, L. Kuehn, B. Dahlmann, Drosophila small cytoplasmic 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase, *Nature*. **331**, 190-192 (1988).
- [27] J. A. Kleinschmidt, C. Escher, D. Wolf, Proteinase yscE of yeast shows homology with the 20S cylinder particles of *Xenopus laevis*, *FEBS Lett.* **293**, 35-40 (1988).

- [28] J. R. Harris, Release of a macromolecular protein component from human erythrocytes ghosts, *Indian J. Biochem. Biophys. Acta* **150**, 534-537 (1968).
- [29] G. Pühler, S. Weinkauff, L. Bachmann, S. Müller, A. Engel, R. Hegerl, W. Baumeister, Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*, *EMBO J.* **11**, 1607-1616 (1992).
- [30] M. Orłowski, S. Wilk, Multicatalytic proteinase complex or multicatalytic proteainase: a high-M<sub>r</sub> endopeptidase, *Biochem. J.* **255**, 751 (1990).
- [31] K. Tanaka, A. Ichihara, Autodegradation of rat liver proteasomes (large multicatalytic proteinase complexes), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 548-554 (1989).
- [32] M. Schliephacke, A. Kremp, H. P. Schmid, K. Köhler, U. Kull, Prosomes of higher plants, *Eur. J. Cell Biol.* **55**, 114-121 (1989).
- [33] T. Schauer, M. Nesper, M. Kehl, F. Lottspeich, A. Müller-Taubenberger, G. Gerisch, W. Baumeister, Proteasomes from dictyosthelium discoideum: characterisation of structure and function, *J. Struct. Biol.* **111**, 135-147 (1993).
- [34] K. Fujinami, N. Tanahashi, K. Tanaka, A. Ichihara, Z. Cejka, W. Baumeister, M. Miyawaki, T. Sato, H. Nikagawa, Purification and characterisation of the 26S proteasom from spinach leaves, *J. Biol. Chem.* **269**, 25905-25910 (1994).
- [35] A. Udvardy, Purification and characterisation of a multiprotein component of drosophila 26S (1500) kDa proteolytic complex, *J. Biol. Chem.* **268**, 9055-9062 (1993).
- [36] M. Fischer, W. Hilt, B. Richter-Ruoff, H. Gonen, A. Ciechanover, D. Wolf, The 26S proteasome of the yeast *saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett.* **355**, 69-75(1994).
- [37] A. Lupas, A. J. Koster, W. Baumeister, Structural features of 26S and 20S proteasomes, *Enzyme Protein* **47**, 252-373 (1993).
- [38] B. Dahlmann, L. Kuehn, H. Reinauer, Studies on the activation by ATP of the 26S proteasome complex from rat skeletal muscle, *Biochem.J.* **309**, 195-202 (1995).
- [39] K. Tanaka, T. Tamura, T. Yoshimura, A. Ichihara, Proteasomes:protein and gene structure, *New Biol.* **4**, 173-187 (1992).
- [40] D. L. Mykles, Lobster muscle proteasome and the degradation of myofibrillar proteins, *Enzyme Protein* **47**, 220-231 (1993).
- [41] T. Wenzel, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, W. Baumeister, Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products, *FEBS Lett.* **349**, 205-209 (1993).
- [42] T. Shibatani, W. F. Ward, Sodium dodecyl sulfate (SDS) activation of the 20S proteasome in rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.* **321**, 160-166 (1995).

- [43] M. F. Haire, J. J. Clark, M. E. Jones, K. B. Hendil, L. M. Schwartz, D. L. Mykles, The multicatalytic proteinase (proteasome) of the hawkmoth, *manduca sexta*, *Arch. Biochem. Biophys.* **318/1**, 15-24 (1995).
- [44] G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino terminal threonine modification by Lactacystin, *Science*. **268**, 726-731 (1995).
- [45] S. Wilk, M. E. Figureiredo-Pereira, Synthetic inhibitors of the multicatalytic proteinase complex (proteasome), *Enzyme Protein* **47**, 306-313 (1993).
- [46] R. Medina, S. S. Wing, A. L. Goldberg, Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy, *Biochem. J.* **307**, 631-637 (1995).
- [47] E. Seemüller, A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber, W. Baumeister, Proteasome from *thermoplasma acidophilum*: a threonine protease, *Science* **268**, 579-582 (1995).
- [48] J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, Crystal structure of the 20S-Proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å, *Science* **268**, 533-539 (1995).
- [49] J. Löwe, Röntgenstrukturanalyse des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum*, Dissertation an der TU-München (1995).
- [50] B. Dahlmann, F. Kopp, L. Kuehn, A. Grziewa, P. Zwickl, W. Baumeister, The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria, *FEBS Lett.* **251**, 125-131 (1995).
- [51] A. Grziewa, W. Baumeister, B. Dahlmann, F. Kopp, Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy, *FEBS Lett.* **290**, 186-190 (1995).
- [52] H. Schägger, G. Jagow, Tricine-sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoreses for the separations of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **166**, 368-379 (1987).
- [53] U. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- [54] T. G. Cooper, Biochemische Arbeitsmethoden, *Walter de Gruyter*, 1. Auflage, S. 200-201 (1981).
- [55] B. R. Oakley, D. R. Kirsch, N. R. Morris, A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gel, *Anal. Biochem.* **115**, 361-363 (1980).
- [56] T. G. Cooper, Biochemische Arbeitsmethoden, *Walter de Gruyter*, 1. Auflage, S. 51-52 (1981).

- 
- [57] Y. Morimoto, T. Mizushima, A. Yagi, n. Tanahashi, K. Tanaka, A. Ichihara, T. Tsukihara, Ordered structure of the crystallized bovine 20S proteasome, *J. Biochem.* **117**, 471-474 (1976).
- [58] J. Jancarik, S. H. Kim, Sparse Matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins, *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 409-411 (1976).
- [59] G. Janssen, G. Maessen, R. Amons, Phosphorylation of elongationfactor 1 $\beta$  by an endogenous kinase affects its nucleotide exchange activity, *J. Bio. Chem.* **263**, 11063-11066 (1988).
- [60] G. M. Janssen, J. Morales, A. Schipper, J. Labbe, O. Mulner-Lorillon, R. Belle, W. Moller, A major substrate of maturation promoting factor identified as elongation factor 1 beta gamma delta in xenopus laevis, *J. Bio. Chem.* **266**, 14885-14888 (1991).
- [61] H. van Damme, R. Amons, W. Moller, Identification of the sites in the eukaryotic elongation factor 1 alpha involved in the binding of elongation factor 1 beta and aminoacyl-tRNA, *Eur. J. Biochem.* **207**, 1025-1034 (1992).
- [62] H. van Damme, R. Amons, G. Janssen, W. Moller, Mapping of the functional domains of eukaryotic elongation factor 1 beta gamma, *Eur. J. Biochem.* **197**(2), 505-511 (1991).