

---

# *Biochemie*

**Michael Groll**

**Kristallographische und biochemische  
Untersuchungen am 20S-Proteasom  
aus *Saccharomyces cerevisiae***



*Typoskript-Edition*

---

**HIERONYMUS**

**MÜNCHEN**

Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Strukturforschung

**Kristallographische und biochemische Untersuchungen  
am 20S-Proteasom  
aus *Saccharomyces cerevisiae***

Michael Groll

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie, Biologie und  
Geowissenschaften der Technischen Universität München zur Erlangung  
des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Prof. Dr. Dr.h.c. R. Huber  
2. Univ.-Prof. Dr. E. Grill  
3. Univ.-Prof. Dr. W. Staudenbauer

Die Dissertation wurde am 11.12.1998 bei der Technischen  
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie, Biologie und  
Geowissenschaften am 01.03.1999 angenommen.

---

# *Biochemie*

Michael Groll

**Kristallographische und biochemische  
Untersuchungen am 20S-Proteasom  
aus *Saccharomyces cerevisiae***



*Typoskript-Edition*

---

HIERONYMUS

MÜNCHEN

Dissertation an der Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften  
der Technischen Universität München

© 1999 by Michael Groll

Alle Rechte vorbehalten!

ISBN 3-89791-038-1

Als Typoskript gedruckt

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwendung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes. Sollten in diesem Werk Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. ohne besondere Kennzeichnung wiedergegeben sein, so berechtigt dies nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- oder Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Xerokopie und binden: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Printed in Germany

Meinen Eltern

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 1995 bis November 1998 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Prof. Dr. Robert Huber durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, sein fortwährendes Interesse an dem Projekt und für viele wertvolle Anregungen herzlich danken. Seine stete Diskussionsbereitschaft und sein Wohlwollen waren eine große Hilfe und schafften eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Ebenso bin ich ihm und Herrn Dr. Lars Ditzel für die außerordentlich gute Zusammenarbeit bei der Strukturaufklärung des 20S-Proteasoms äußerst dankbar.

Herrn Dr. Wolfgang Heinemeyer der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dieter Wolf, Universität Stuttgart, und Herrn Dr. Hansjörg Schild der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, Universität Tübingen, danke ich besonders für die vorbildliche Zusammenarbeit bei den 20S-Proteasom-Mutationsexperimenten und den Untersuchungen zum Abbau von Enolase durch das 20S-Proteasom. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Günther Loidl und Herrn Prof. Dr. Luis Moroder, der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Luis Moroder, Max-Planck-Institut, München, für die zielstrebige Planung und Synthese von verschiedenen 20S-Proteasominhibitoren bedanken.

Danken möchte ich Dr. Jan Löwe und Dr. Daniela Stock für die Strukturbestimmung des 20S-Proteasoms aus *T. acidophilum*. Dieses Modell konnte in der vorliegenden Arbeit zur Phasierung eingesetzt werden und lieferte eine entscheidende Hilfe für die Bestimmung der 20S-Proteasomkristallstruktur aus *S. cerevisiae*.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Thomas Langer und Herrn Prof. Dr. Walter Neupert der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Walter Neupert, Universität München, für eine exzellente Einführung in das molekularbiologische Arbeiten mit Hefekulturen bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Hans Bartunik und Herrn Dr. Gleb Bourenkow für die gute Unterstützung bei den Aufenthalten am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

Bei Herrn Matthias Bochtler und Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode möchte ich mich an dieser Stelle für fachkundigen Rat zum 20S-Proteasom und für einen Überblick auf dem Gebiet der Proteasen bedanken.

Auch bei allen Kollegen der Abteilung für Strukturforschung möchte ich mich für die stets angenehme Zusammenarbeit bedanken. Mein Dank gilt besonders Frau Monika Schneider, Frau Renate Rüller, Frau Gina Beckmann, Herrn Werner Dersch und Herrn Herbert Fischer für Ratschläge und Hilfestellungen.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor K302/303 bedanke ich mich bei den Arbeitskollegen herzlich. Der gesamten Abteilung Huber danke ich für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ich danke besonders meinen lieben Eltern für das Vertrauen und die stete Unterstützung über all die Jahre hinweg. Danken möchte ich auch den Oberärzten Herrn Dr. Tomschi und Herrn Dr. Mostić, die mich nach einem schweren Verkehrsunfall gerettet und mir schnell wieder auf die Beine geholfen haben. Für den starken Rückhalt und die Toleranz in schwierigen Situationen sowie für viele aufregende Diskussionen danke ich Frau Karin Entenmann, Herrn Franz Freudenstein, Herrn Konrad Zwicklbauer, Herrn Bernd Krause, Herrn Andreas Jörg und Herrn Walter Wilhelm.

Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten bzw. beinhalteten werden:

M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik and R. Huber (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* **386**, 463-471.

M. Bochtler, L. Ditzel, M. Groll and R. Huber (1997). Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6070-6074.

A. Escherich, L. Ditzel, H. Musiol, M. Groll, R. Huber and L. Moroder (1997). Synthesis, kinetic characterization and X-ray analysis of peptide aldehyds as inhibitors of the 20S proteasom from *T. acidophilum* and *S. cerevisiae*. *Biol. Chem.* **378**, 893-898.

L. Ditzel, R. Huber, K. Mann, W. Heinemeyer, D. H. Wolf and M. Groll (1998). Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J. Mol. Biol.* **279**, 1187-1191.

A. K. Nussbaum, T. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanović, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H. Rammensee and H. Schild (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome  $\beta$  subunits deduced from digests of enolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12504-12509.

T. Dick, A. K. Nussbaum, M. Deeg, W. Heinemeyer, M. Groll, M. Schirle, W. Keilholz, S. Stevanović, D. H. Wolf, R. Huber, H. Rammensee and H. Schild (1998). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* **273**, 25637-25646.

G. Loidl, M. Groll, H. Musiol, L. Ditzel, R. Huber and L. Moroder. Bifunctional inhibitors for the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes. Für *Chemistry & Biology* eingereicht.



# Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung . . . . .	1
2 Einleitung	
2.1 Proteolytische Enzyme . . . . .	3
2.2 Das Proteasom . . . . .	4
2.2.1 Funktion und Aufgabe des Proteasoms . . . . .	4
2.2.2 Vorkommen des 20S-Proteasoms . . . . .	5
2.2.3 Struktur und Aufbau von Proteasomen . . . . .	6
2.2.4 Substratspezifität des 20S-Proteasoms . . . . .	9
2.2.5 Aufgaben der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten . . . . .	10
2.2.6 Regulierte Expression von 20S-Proteasom-Untereinheiten in Säugern . . . . .	11
2.2.7 Reaktionsmechanismus des 20S-Proteasoms aus <i>T. acidophilum</i> . . . . .	12
2.2.8 Regulation des 20S-Proteasoms in höheren Eukaryonten über PA28 . . . . .	13
2.3 Aufgabenstellung . . . . .	15
3 Materialien und Methoden	
3.1 Materialien . . . . .	16
3.1.1 Stämme . . . . .	16
3.1.2 Plasmide . . . . .	16
3.3.3 Chemikalien . . . . .	17
3.2 Arbeiten mit Bakterien und Hefen . . . . .	18
3.2.1 Vermehrung von Bakterien und Hefen . . . . .	18
3.3.2 Aufbewahrung von Bakterien und Hefen . . . . .	20
3.3.3 Herstellen transformationskompetenter Bakterien und Hefen . . . . .	21
3.3 Arbeiten mit DNA . . . . .	22
3.3.1 Charakterisierung von DNA . . . . .	22
3.3.2 Vermehrung und Präparation von DNA und DNA-Fragmenten . . . . .	23
3.3.3 Enzymatische DNA-Reaktionen . . . . .	25
3.4 Arbeiten mit Proteinen . . . . .	27
3.4.1 Charakterisierung von Proteinen . . . . .	27
3.4.2 Reinigung des 20S-proteasoms aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	32
3.5 Röntgenstrukturanalytische Methoden am 20S-Proteasom . . . . .	34
3.5.1 Kristallisation . . . . .	34

3.5.2	Datensammlung und Datenreduktion	34
3.5.3	Mittelung im direkten Raum	35
3.5.4	Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung	35
3.5.5	Graphische Darstellungen	35
4	Ergebnisse	
4.1	Mutagenese und Isolierung des 20S Proteasoms aus <i>S. cerevisiae</i>	37
4.2	Kristallisation	37
4.3	Röntgenstrukturanalyse	38
4.3.1	Datensammlung	38
4.3.2	Selbstrotationsfunktion	39
4.3.3	Pattersonsuche mit dem 20S-Proteasom aus <i>T. acidophilum</i>	39
4.3.4	Verfeinerung und Modellbau	39
4.4	Die Struktur des 20S-Proteasoms aus <i>S. cerevisiae</i>	41
4.4.1	Struktur der Untereinheiten	41
4.4.2	Der 20S-Proteasomkomplex	45
4.4.3	Die N-terminale Thr-Position	48
4.4.4	Mutagenesestudien am katalytisch aktiven Zentrum	50
4.4.5	Inhibitorbindung und Spezifität der S1-Tasche	51
4.4.6	Mechanismus der Autoproteolyse durch Charakterisierung der $\beta$ 1Thr1Ala-Mutante	54
4.4.7	Generierung der Oktapeptide durch das 20S-Proteasom	57
4.4.8	Partielle Hydrolyse der Propeptide	58
4.4.9	Eintritt in das und Austritt aus dem 20S-Proteasom	62
5	Diskussion	
5.1	Proteinpräparation und Strukturlösung	63
5.2	Struktureller Aufbau von eukaryontischen 20S-Proteasomen	64
5.3	Katalytisch aktive Zentren des 20S-Proteasoms	64
5.4	Zugang zu den katalytisch aktiven Zentren im 20S-Proteasom	67
5.5	Generierung von Oligopeptiden charakteristischer Längen	67
5.6	Funktion der proteasomalen Untereinheiten	68
5.7	Funktion der Propeptide	68
5.8	$\gamma$ -Interferon induzierter Austausch aktiver $\beta$ -Untereinheiten	69
6	Literaturverzeichnis	72
7	Abkürzungen	82

## Zusammenfassung

26S-Proteasome sind ubiquitäre, cytosolische makromolekulare Proteasekomplexe, die kontrolliert zelluläre Proteine hydrolytisch zerlegen und damit für einen regelmäßigen Ablauf zellulärer Prozesse sorgen. Sie setzen sich aus dem proteolytisch aktiven 20S-Proteasom und zwei 19S-Regulorkappen, die für die Substraterkennung verantwortlich sind, zusammen. Das 20S-Proteasom aus Hefe besteht aus vier Ringen zu je sieben Untereinheiten und besitzt einen zylinderförmigen Aufbau. Auf Sequenzebene fallen die Gene, die für Untereinheiten des 20S-Proteasoms codieren in zwei Klassen, jeweils sieben Untereinheiten die homolog zu den  $\alpha$ - und sieben Untereinheiten, die homolog zu den  $\beta$ -Untereinheiten des archaebakteriellen Proteasoms aus *T. acidophilum* sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein dreistufiges Chromatographie-Protokoll und eine Kristallisationsbedingung für das Hefe-20S-Proteasom aus *S. cerevisiae* ausgearbeitet und die Röntgenstruktur mit einer Auflösung von 1.9Å und einem R-Faktor von 25% bestimmt. Damit konnte gezeigt werden, daß aufgrund sequenzspezifischer Kontakte zwischen den Monomeren alle 14 Untereinheiten je zweimal an wohldefinierten Positionen im Partikel vorkommen. Identische Untereinheiten sind über eine zweizählige Achse miteinander verwandt, so daß der Komplex insgesamt eine  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie aufweist. Die Kristallstruktur zeigte analog zum *Thermoplasma*-Proteasom die Aufspaltung des Partikelinneren in drei Kammern. Der Zugang zu diesen Kammern ist im isolierten 20S-Proteasom aus Hefe verschlossen und wird vermutlich erst durch die Interaktion mit den 19S-Regulorkappen geöffnet. Die Proteolyse von Substraten findet innerhalb der Kammer der beiden  $\beta$ -Ringe statt. Die Kristallstruktur zeigte die geometrische Anordnung der sechs aktiven Untereinheiten. Diese Untereinheiten werden proteolytisch aktiv durch Autolyse eines Propeptids. Der Mechanismus der Selbstprozessierung konnte durch die Identifikation eines nukleophilen Wassermoleküls im aktiven Zentrum geklärt und durch selbstprozessierungsdefiziente Mutanten weiter charakterisiert werden. Ebenso konnten die S1-Taschen, die für die Spezifität bei der Spaltung chromogener Testsubstrate verantwortlich sind, beschrieben werden. Die Rolle einzelner Aminosäuren in der Umgebung des katalytisch aktiven Zentrums konnte durch ortsspezifische Mutagenese geklärt werden.

Die Spezifität des 20S-Proteasoms gegenüber kleinen Substraten wird nicht gegenüber großen entfalteten Substraten beobachtet. Statt dessen wird eine charakteristische Längenverteilung der Produkte um acht bis neun Aminosäuren gefunden. Ursprünglich wurde die charakteristische Länge der Proteasomprodukte mit dem Abstand zwischen den aktiven Untereinheiten oder zwischen einer aktiven Untereinheit und einer zusätzliche Hydrolysestelle postuliert. Diese Interpretation konnte ausgeschlossen werden durch Mutageneseexperimente bei denen vier der sechs aktiven Proteasomuntereinheiten inaktiviert wurden, so daß nur zwei aktive Untereinheiten im Abstand von 49Å übrig bleiben. Diese mutierten 20S-Proteasome liefern Hydrolyseprodukte die selbst in gestreckter Konformation den Abstand zwischen den verbleibenden aktiven Zentren nicht überbrücken können. Außerdem sind die in dieser Mutante beobachteten Propeptide zu lang um mit dem ‚*molecular ruler*‘ oder einer zusätzlichen Hydrolysestelle vereinbar zu sein.

Aufgrund der zentralen Rolle des Proteasoms bei vielen zellulären Prozessen und insbesondere bei der Immunantwort ist das Proteasom pharmakologisch interessant. Gegenüber Säugerproteasomen bietet das Hefe-Proteasom den technischen Vorteil homogen und damit für die Kristallstrukturbestimmung geeignet zu sein. Die aktiven Untereinheiten entsprechen konstitutiven Untereinheiten bei Säugern. Diese besitzen zusätzlich drei  $\gamma$ -Interferon-induzierbare Untereinheiten, die die Spezifität des Proteasoms verändern können. Diese für die Immunantwort relevanten Veränderungen können mit der Struktur des Hefeproteasoms vorhergesagt werden. Durch die hohe Homologie von Hefe und Säugerproteasom ist die Struktur des Hefeproteasoms auch für die Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren interessant. Der Bindungsmodus bekannter Inhibitoren konnte kristallographisch bestimmt und ein neuartiger Proteasominhibitor konnte entworfen werden.

## 2. Einleitung

### 2.1. Proteolytische Enzyme

Eukaryontische Zellen besitzen zwischen 6000 und 50000 verschiedene Enzyme, von denen jedes eine bestimmte chemische Reaktion katalysiert. Eine der am längsten bekannten Klasse von Enzymen stellen die Proteasen dar. Sie gehören systematisch zu den C-N-Hydrolasen und spalten Peptidbindungen. Je nach Angriffspunkt innerhalb der Peptidkette des Substrats unterscheidet man zwischen Exopeptidasen (spalten Aminosäuren vom N- oder C-Terminus ab, z.B. Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen) und Endopeptidasen (spalten innerhalb der Polypeptidkette, z.B. Pepsin, Trypsin). Heute sind mehr als 500 Proteasen bekannt, die anhand der reaktiven Gruppen des aktiven Zentrums wie folgt eingeteilt werden:

- |  |   |
|--|---|
| 1. <i>Serin-Proteasen:</i>               | Ser- und His-Rest im aktiven Zentrum<br>(häufigste Peptidaseklasse) |
| 2. <i>Cystein-Proteasen:</i>             | Cys-Rest im aktiven Zentrum   |
| 3. <i>Aspartat-Proteasen:</i>            | Asp-Reste im aktiven Zentrum  |
| 4. <i>Metallo-Proteasen:</i>             | Metallion im aktiven Zentrum  |
| 5. <i>Nicht klassifizierte Proteasen</i> |   |

Die meisten Proteasen sind spezifisch für bestimmte Sequenzen von Aminosäuren der zu spaltenden Polypeptidkette. Um einen regulierten Proteinabbau in der Zelle zu gewährleisten, werden viele Peptidasen in Form inaktiver Vorstufen, sogenannter Zymogene, synthetisiert. Die spezifische Spaltung des Zymogens führt über Konformationsänderungen von Aminosäuren im aktiven Zentrum zur katalytisch aktiven Protease.

Ursprünglich wurde der Proteinabbau als primär lysosomal angesehen (Darnell *et al.*, 1990). Lysosomen sind membranumschlossene Organellen, die etwa 50 verschiedene hydrolytische Enzyme, unter anderem Proteasen wie Cathepsine und Kollagenasen, enthalten. Diese Enzyme sind an den sauren pH-Wert der Lysosomen von 4.8 angepasst (Bainton, 1981) und bauen nach Fusion mit Endosomen und Autophagosomen exogene und endogene Substrate ab (Goldberg & St. John, 1974). Die Beobachtung, daß der Proteinabbau unter anaeroben Bedingungen inhibiert ist, führte zur Entdeckung eines cytosolischen, ATP-abhängigen Proteolysesystems, das vom lysosomalen System unabhängig ist (Etlinger *et al.*, 1977). Durch die Identifizierung von Zellen, die trotz des

Fehlens von Lysosomen, mutierte und fehlgefaltete Proteine selektiv verdauen (Hershko & Ciechanover, 1986) wurde gezeigt, daß Eukaryonten nicht nur einen lysosomalen sondern auch einen ATP-abhängigen Weg des Proteinabbaus besitzen. Die Analyse von Retikulozyten zeigte, daß bestimmte Proteine für den Abbau markiert (Waxman *et al.*, 1987) und durch einen Multiproteinkomplex schnell zu kleinen Fragmenten zerlegt werden (Hershko & Ciechanover, 1986). Dieser Multiproteinkomplex besitzt eine Masse von ca. 2000kDa und wird heute **26S-Proteasom** genannt (Orlowski & Wilk, 1981; Wilk & Orlowski, 1980).

## 2.2 Das Proteasom

### 2.2.1 Funktion und Aufgabe des Proteasoms

Mittlerweile ist bekannt, daß eukaryontische Zellen die Mehrzahl der Proteine über den ATP-abhängigen Mechanismus abbauen (Ciechanover *et al.*, 1994). Das 26S-Proteasom ist hierfür das wichtigste proteolytische Element (für eine Übersicht siehe Coux *et al.*, 1996). Es reguliert über seine verschiedenen aktiven Zentren die biologischen Prozesse in der Zelle wie z.B.:

- Abbau von mutierten und fehlgefalteten Proteinen
- Streßantwort (durch Prozessierung und Abbau von Transkriptionsfaktoren)
- Zell-Zyklus-Kontrolle (durch Abbau von Cyclinen)
- Zelldifferenzierung und metabolische Anpassung (durch Prozessierung und Abbau von Transkriptionsfaktoren)
- Zelluläre Immunantwort (über Generierung antigener Peptide, die den Haupthistokompatibilitäts-Klasse I (MHC I) Molekülen präsentiert werden)

Für die Proteolyse von Enzymen durch das Proteasom müssen diese über eine Isopeptidbindung kovalent mit Ubiquitin, einem Polypeptid von 76 Aminosäuren, verknüpft werden (Rechsteiner *et al.*, 1988). Erst die so markierten Moleküle werden vom 26S-Komplex erkannt und schnell hydrolysiert (Rivett, 1993).

Das 26S-Proteasom besteht aus dem zentralen 20S-Proteasom und zwei peripheren 19S-Kappen (auch PA-700-Komplex genannt (siehe 2.2.3)), welche für die Ubiquitinerkennung und die Proteinentfaltung verantwortlich sind. Die proteolytische Schlüsselkomponente des 26S-Proteasomkomplexes ist das 20S-Proteasom (E.C. Nummer 3.4.99.46 (Enzyme Nomenclature Recommendations, 1984)). Seine Bedeutung zeigt sich in der Lethalität der chromosomalen Deletion der einzelnen Untereinheiten in Hefe mit Ausnahme einer einzigen (Heinemeyer *et al.*, 1994).

### 2.2.2 Vorkommen des 20S-Proteasoms

In Säugern befindet sich der höchste 20S-Proteasomenanteil, mit Konzentrationen bis zu einem Prozent der löslichen Zellproteine, in Leber und in Niere (Peters, 1994). In eukaryontischen Zellen kann die Protease im Nukleus, im Cytosol und als Assoziat mit dem endoplasmatischen Retikulum sowie mit dem Zytoskelett nachgewiesen werden (Rivett *et al.*, 1992; Sherrer & Bey, 1994). Sie wurde bereits aus vielen Organismen unter verschiedensten Namen isoliert (Woese *et al.*, 1990; Tabelle I).

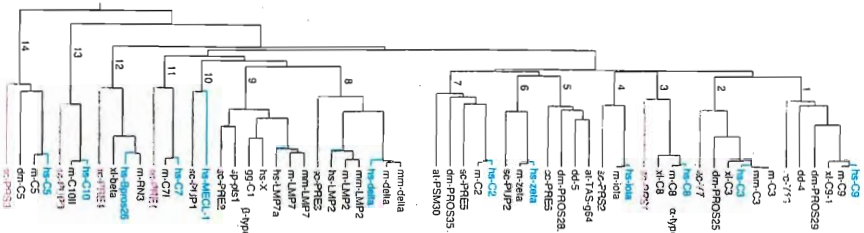
Tabelle I: Unterschiedliche Namen für das 20S-Proteasom.

Name:	Referenz:
Cylindrin	(Harris, 1968)
Small cytoplasmic particles	(Spohr <i>et al.</i> , 1970)
Minute-ring shaped particles	(Narayan & Round, 1973)
Cation-Sensitive Neutral Endopeptidase	(Wilk & Orłowski, 1980)
High Molecular Weight Enzyme	(Hardy <i>et al.</i> , 1981)
Low Molecular Weight Peptides (LMP)	(Monaco & McDevitt, 1982)
Proteinase YscE	(Achstetter <i>et al.</i> , 1984)
Prosome	(Schmid <i>et al.</i> , 1984)
Ingensin	(Ishiura <i>et al.</i> , 1985)
Multifunctional Protease	(Tanaka <i>et al.</i> , 1986)
Macropain	(McGuire & DeMartino, 1986)
20S-Particle	(Arrigo <i>et al.</i> , 1987)
Multicatalytic Proteinase	(Dahlmann <i>et al.</i> , 1988)
Multicatalytic Proteinase Complex	(Orłowski & Wilk, 1988)
Proteasome	(Arrigo <i>et al.</i> , 1988)

Heute hat sich die Bezeichnung 20S-Proteasom durchgesetzt (Arrigo *et al.*, 1987; Falkenburg *et al.*, 1988; Kleinschmidt *et al.*, 1988).

Die fundamentale Bedeutung des 20S-Partikels deutete sich bereits nach der Isolierung und Charakterisierung des Proteins aus Archaeobakterien wie *T. acidophilum* an (Dahlmann *et al.*, 1989). Bislang wurde angenommen, daß in Eubakterien keine proteasomverwandten Proteine vorkommen. Mit der Aufklärung des Genoms von *E. coli* wurde aber die Existenz eines Gens einer proteasomähnlichen  $\beta$ -Untereinheit ClpP (*hslV*) gefunden (Plunkett *et al.*, 1993). Homologe Sequenzen konnten daraufhin auch in den Organismen *Pasteurella haemolytica*, *Bacillus subtilis* und *Mycobacterium leprae* identifiziert werden (Lupas *et al.*, 1994), sowie in *Rhodococcus spec.* (Tamura *et al.*, 1995), womit sich eine ubiquitäre Verbreitung dieser Protease zeigt. Mittlerweile sind mehr als 70 Sequenzen von 20S-Proteasomuntereinheiten aus verschiedenen Organismen publiziert, die eine eigene Klasse von Proteinen darstellen. Sie weisen keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinfamilien auf. Obwohl

die Untereinheiten zueinander nur wenig Sequenzhomologien besitzen, deuten einige Strukturuntersuchungen auf einen gemeinsamen Vorläufer hin (Coux *et al.*, 1994; Lupas *et al.*, 1993; Heinemeyer *et al.*, 1994). Die 20S-Proteasomsequenzen werden bezüglich der archaebakteriellen Untereinheiten in zwei Gruppen,  $\alpha$  und  $\beta$ , klassifiziert (siehe Abb. 1) - das 20S-Proteasom aus dem Archaebakterium *T. acidophilum* wurde deshalb auch als 'Urproteasom' bezeichnet (Zwickel *et al.*, 1992a).



**Abb. 1:** Phylogenetischer Stammbaum der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten eukaryontischer 20S-Proteasome (aus Hilt & Wolf, 1996). at: *Arabidopsis thaliana*, dd: *Dicystostelium discoideum*, dm: *Drosophila melanogaster*, gg: *Gallus gallus*, hs: *Homo sapiens*, mm: *Mus musculus*, rn: *Rattus norvegicus*, sc: *Saccharomyces cerevisiae*, sp: *Schizosaccharomyces pombe*, xl: *Xenopus laevis*.

### 2.2.3 Struktur und Aufbau von Proteasomen

#### 20S-Proteasome

Das 20S-Proteasom ist ein multikatalytischer, nicht-lysosomaler Proteinasekomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 700kDa. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von humanen Erythrozyten zeigten das 20S-Partikel als ein zylinderförmiges Molekül mit den ungefähren Abmessungen von 120Å x 160Å (Harris, 1968;). Der Komplex setzt sich aus vier Lagen übereinanderliegender Ringe, von denen jeder einzelne aus je sieben Untereinheiten besteht, zusammen (Peters *et al.*, 1994). Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit digitaler Bildverarbeitung von der 20S-Protease aus Archaebakterien (wie z.B. *T. acidophilum*) und Eubakterien (wie z.B. *Rhodococcus spec.*) zeigten einen ähnlichen Aufbau für alle 20S-Proteasome (siehe Abb. 2) (Dahlmann *et al.*, 1989; Hegerl *et al.*, 1991; Pühler *et al.*, 1992).



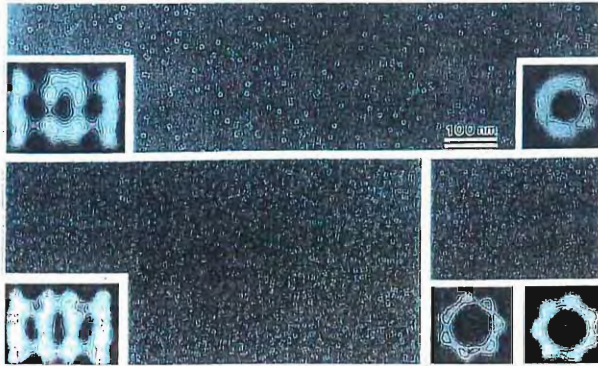


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 20S-Proteasomen aus Rattenmuskulatur (obere Abbildung) und *T. acidophilum* (untere Abbildung); Dahlmann *et al.*, 1989.

Elektronenmikroskopische Studien mit Gold-markierten Antikörpern gegen das archaebakterielle 20S-Proteasom ergaben, daß die beiden äußeren Ringe aus den  $\alpha$ -Untereinheiten und die beiden inneren aus den  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut sind (Schauer *et al.*, 1993). Der Komplex besitzt eine  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$  Stöchiometrie mit einer 72 Punktgruppensymmetrie (Grziwa *et al.*, 1991; Jap *et al.*, 1993). Obwohl die Primärsequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten nur eine geringe Homologie aufweisen, ist deren Tertiärstruktur ähnlich (Löwe *et al.*, 1995; Stock *et al.*, 1996). Die  $C_\alpha$ -Atome können mit nur geringfügiger Abweichung übereinander gelegt werden. Dabei besteht jede Untereinheit aus einem fünfsträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt. Die Topologie ist S8, S1, S2, S9 und S10 im *oberen* und S7, S6, S5, S4 und S3 im *unteren*  $\beta$ -Faltblatt. Diese werden von den Helices H3, H4 und H5 sowie von den Helices H1 und H2 flankiert (siehe Abb. 3).

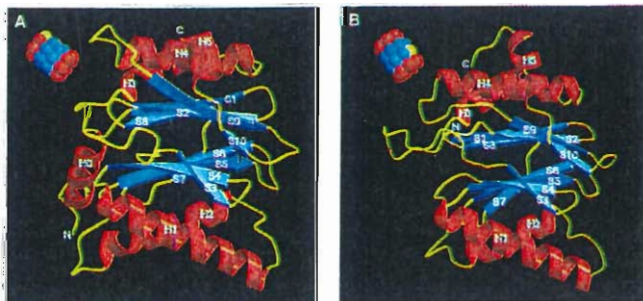


Abb. 3: Ribbon-plot der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aus *T. acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995)

Das 20S-Proteasom aus *Rhodococcus spec.* besitzt eine ähnliche Quartärstruktur wie die der archaebakteriellen 20S-Partikel. Es enthält jedoch vier verschiedene Untereinheiten, wobei zwei der  $\alpha$ - und zwei der  $\beta$ -Familie zugeordnet werden können (Tamura *et al.*, 1995). Bislang ist die Anordnung und Zusammensetzung dieser Untereinheiten im 20S-Partikel nicht geklärt. Versuche mit chromogenen Testsubstraten zeigen, daß der Komplex lediglich chymotryptische Aktivität aufweist.

*E. coli* exprimiert mit dem Operon hslVU einen Proteinasekomplex, der sich deutlich von dem des 20S-Proteasoms aus *Rhodococcus* unterscheidet (Rohrwild *et al.*, 1996). Es verfügt über keine sequenzverwandten  $\alpha$ -Untereinheiten. Abb. 4 zeigt, daß das Produkt des *heat shock locus V* (hslV) Gens starke Verwandtschaft mit der  $\beta$ -Familie der 20S-Proteasome aufweist (Bochtler *et al.*, 1997).



**Abb. 4:** Ribbonplot der hslV-Protease (links); Überlagerung einer hslV-Untereinheit mit der  $\beta$ -Untereinheit des *Thermoplasma*-Proteasoms (rechts) (Bochtler *et al.*, 1997).

hslV wird mit dem zugehörigen hslU Gen exprimiert, welches in Sequenzverwandschaft zu dem ATP abhängigen Protein ClpX steht (Plunkett *et al.*, 1993). Zusammen bilden die beiden Proteine in Anwesenheit von ATP einen aktiven Komplex (Rohrwild *et al.*, 1996; Yoo *et al.*, 1996), der Peptide und Proteine abbaut. hslVU wird analog anderer Hitzeschock-Proteine als Antwort auf die Anhäufung fehlgefalteter Proteine in der *E. coli*-Zelle unter Stressbedingungen induziert (Chuang *et al.*, 1993). Eine strukturelle Charakterisierung des Proteinkomplexes war bislang nicht möglich.

Im Gegensatz zum 20S-Proteasom aus *Rhodococcus spec.* mit jeweils zwei unterschiedlichen  $\alpha$ - sowie  $\beta$ -Untereinheiten besitzt das eukaryontische 20S-Proteasom mindestens 14 verschiedene Untereinheiten von 21-34kDa (Pühler *et al.*, (1992). Es besitzt eine pseudosiebenzählige Symmetrie und besteht aus zwei identischen Hälften ( $\alpha\beta$ ;  $\beta\alpha$ ) (Kopp, 1993). Tabelle II zeigt die traditionellen Namen für die 20S-Proteasomuntereinheiten für *S. cerevisiae* und *H. sapiens*.

Tabelle II: Namen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms von *S. cerevisiae* und *H. sapiens*.

<i>S. cerevisiae</i>	C7/Prs2	Y7	Y13	Pre6	Pup2	Pre5	C1/Prs1	$\alpha$
	Pre3	Pup1	Pup3	C11/Pre1	Pre2	C5/Prs3	Pre4	$\beta$
<i>H. sapiens</i> ( $\gamma$ -If-Komp.)	iota	C3	C9	C6	zeta	C2	C8	$\alpha$
	Y/delta LMP2	Z MECL1	C10	C7	X/MB1; LMP7	C5	N3/beta	$\beta$ $\beta$ i

$\gamma$ -If-Komp.:  $\gamma$ -Interferon-induzierte Austauschkomponente; i für 'Immunoproteasom'.

### Elektronenmikroskopische Analyse von 26S-Proteasomen

1987 wurde entdeckt, daß das Proteasom in zwei verschiedenen Formen vorliegt, die nach ihren Sedimentationskoeffizienten als 26S- und 20S-Proteasom benannt wurden (Hough *et al.*, 1987). Die Regulatoreinheit, welche für die Ubiquitin-Erkennung und die Proteinentsorgung verantwortlich ist, wird als 19S-Kappe oder PA700-Komplex bezeichnet. Sie bildet zusammen mit dem 20S-Partikel unter ATP-Verbrauch das 26S-Proteasom (Ikai *et al.*, 1991; Hoffman *et al.*, 1992; Yoshimura *et al.*, 1993). Elektronenmikroskopische Aufnahmen in Abb. 5 zeigen das 26S-Proteasom mit  $C_2$ -Symmetrie in der Projektion.

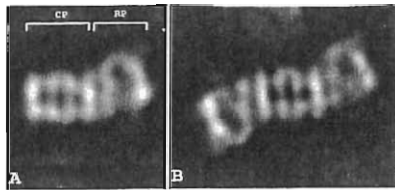


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme des 26S-Proteasoms, cp: 20S-Proteasom; rp: 19S-Regulator (aus Baumeister *et al.*, 1998).

Der 19S-Komplex bildet sich aus mindestens 18 verschiedenen Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 25 und 119kDa (Peters, 1994; Deveraux *et al.*, 1994). Über das Zusammenwirken und die einzelnen Aufgaben der Regulatorproteine ist bislang wenig bekannt.

#### 2.2.4 Substratspezifität des 20S-Proteasoms

Ein besonderes Merkmal der eukaryontischen 20S-Partikel ist die Vereinigung verschiedener Proteaseaktivitäten, weswegen es auch häufig als multikatalytische Proteinase (Wilk *et al.*, 1991) bezeichnet wird. Durch Studien mit verschiedenen chromogenen Testsubstraten konnten bis zu fünf verschiedene Spaltungsspezifitäten nachgewiesen werden (Orlowski *et al.*, 1993, Tabelle III).

Tabelle III: Verschiedene Spaltungsspezifitäten des 20S-Proteasoms

Name:	Chromogenes Substrat:
Chymotrypsin like activity (CL)	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC
Trypsin like activity (TL)	Bz-Val-Gly-Arg-AMC
Peptidyl-glutamyl-protein-hydrolysing Activity (PGPH)	Z-Leu-Leu-Glu- $\beta$ NA
Branched chain aminoacid preferring (BrAAP)	Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC
Small neutral aminoacid preferring (SNAAP)	Cbz-Gly-Pro-Ala-Gly-Gly-AMC

Die hohe Unspezifität des 20S-Proteasoms in Bezug auf Substratspaltung erfordert einen strengen Regulationsmechanismus, um selektiv nur markierte Proteine in Fragmente zu zerlegen.

### 2.2.5 Aufgaben der $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten

#### $\alpha$ -Untereinheit

Die N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten enthalten ein konserviertes Motiv, welches in den  $\beta$ -Untereinheiten fehlt, das aber für die 20S-Proteasomassemblierung wesentlich ist (Löwe *et al.*, 1995). Bestimmte  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen eine 'shuttling sequenz' die den Austausch des 20S-Proteasoms zwischen Cytosol und Kern erlaubt und damit eine Kontrolle des Zellzykluses ermöglicht (Tanaka *et al.*, 1990). Es wird vermutet, daß der Import des 20S-Proteasoms in den Kern auf phosphorylierungsbedingte Konformationserkennungen bestimmter Untereinheiten zurückzuführen ist (Tanaka *et al.*, 1992). Eine weitere Eigenschaft der  $\alpha$ -Untereinheiten ist es, eine Ringstruktur auszubilden, die für die Bindung der  $\beta$ -Untereinheiten und damit für die 20S-Proteasomformation notwendig ist (Zwickl *et al.*, 1994). Im 20S-Komplex bildet der  $\alpha$ -Ring eine physikalische Sperre, welche den Zugang gefalteter, cytosolischer Proteine in die innere proteolytische Kammer einschränkt (Löwe *et al.*, 1995). Zusätzlich befinden sich am  $\alpha$ -Ring Bindungsmotive für den 19S- (PA700) und den 11S- (PA28, siehe 2.2.6) Regulationskomplex, welche die proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms modulieren (Peters, 1993; Grey *et al.*, 1994).

#### Aufgabe der Propeptide der $\beta$ -Untereinheiten

Die Sequenzen der  $\beta$ -Untereinheiten sind untereinander weniger homolog als die der  $\alpha$ -Untereinheiten. Nahezu alle  $\beta$ -Untereinheiten besitzen N-terminale Propeptide, die größtenteils während der Partikelformation abgespalten werden (Zwickel *et al.*, 1994). Bei diesem Schritt entstehen beim eukaryontischen 20S-Partikel für einige  $\beta$ -Untereinheiten N-terminale Threonine, welche für die 20S-Proteasom-Aktivität notwendig sind (Löwe *et al.*, 1995, Heinemeyer *et al.*, 1997). Die Deletion der Prosequenz im archaebakteriellen 20S-Proteasom verhindert nicht die Synthese des funktionsfähigen Komplexes (Zwickl *et al.*,

1994). Bestimmte Prosequenzen in Eukaryonten sind jedoch für den Aufbau des 20S-Proteasoms notwendig. Hefestämme, welche die 20S-Proteasomuntereinheiten ohne Propeptide exprimieren weisen einen Phenotyp auf, der im schlimmsten Fall nicht überlebensfähig ist, wie das Beispiel von Pre2 zeigt (Chen & Hochstrasser, 1995). Eine wesentliche Funktion der Propeptide ist der spezifische Einbau von  $\beta$ -Untereinheiten in das 20S-Proteasom. So bewirkt die Deletion des Propeptids von LMP7, daß das gereifte 20S-Proteasom nur die Y und nicht die LMP7-Untereinheit enthält (Yang *et al.*, 1995).

### 2.2.6 Regulierte Expression von 20S-Proteasomuntereinheiten in Säugern

In höheren Eukaryonten wird die Untereinheitenzusammensetzung des 20S-Proteasoms in Abhängigkeit vom Organismus reguliert. Beispielsweise induziert in humanen Zellen  $\gamma$ -Interferon den Austausch von drei  $\beta$ -Untereinheiten (delta, Z und MB1) gegen drei neu synthetisierte LMP-Untereinheiten (LMP2, MECL1 und LMP7) (Brown, 1993; Akiyama, 1994). Das Vorkommen der Untereinheiten ist abhängig vom Zellentwicklungsstadium und der Gewebeart. Beispielsweise wurden in der Rinderhypophyse bis jetzt keine LMP-Untereinheiten nachgewiesen (Yu *et al.*, 1993) und in Mäusen variiert die Verteilung der 20S Proteasomuntereinheiten zwischen Leber und Muskel deutlich (van Kaer *et al.*, 1994). Modifikationen diesbezüglich können zu schweren degenerativen Veränderungen führen (Peters *et al.*, 1998). Der Mechanismus der Substitution von Untereinheiten ist bislang nicht verstanden, lediglich, daß deren Einbau von der Stärke der Expression abhängt (Fruh *et al.*, 1994).

### 2.2.7 Assemblierung des eukaryontischen 20S-Proteasoms

Das 20S-Proteasom bildet sich aus einem 13-16S-Komplex, der sich aus  $\alpha$ - und unprozessierten  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzt (Frentzel *et al.*, 1994). Eine Behandlung von Zellen mit Phosphataseinhibitoren stabilisiert den 13-16S-Komplex. Für den Aufbau des 20S-Partikels aus dem 13-16S-Intermediat sind neben den 20S-Proteasomuntereinheiten und den  $\beta$ -Propeptiden auch andere Proteine mitverantwortlich (Yang *et al.*, 1995). Deletiert man beispielsweise in Hefe das UMP1-Gen (ubiquitin-mediated protein), so besitzt der mutierte Zellstamm einen starken Wachstumsdefekt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Zell-Lysats lassen überwiegend 13-16S-Proteasome erkennen (Ramos *et al.*, 1998). Bis heute ist als molekulares Chaperon für den 20S-Proteasomaufbau nur UMP1 bekannt.

### 2.2.8 Reaktionsmechanismus des 20S-Proteasoms aus *T. acidophilum*

Die Kristallstruktur des *Thermoplasma*-20S-Proteasoms bei 3,4 Å Auflösung zeigt dieses als ein zylinderförmiges Partikel (148Å x 113Å) mit einem durchgängigen zentralen Kanal und drei großen Kammern (Löwe *et al.*, 1995; Stock *et al.*, 1996; (siehe Abb. 6a), analog den elektronenmikroskopischen Ergebnissen (Hegerl *et al.*, 1991; Pühler *et al.*, 1992). Die beiden äußeren Kammern werden von den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringern gebildet und die mittlere Kammer, in der die Proteolyse stattfindet, wird allein von den  $\beta$ -Ringern aufgebaut. Der Eintrittskanal ist 13 Å im Durchmesser und damit nur geringfügig größer als eine  $\alpha$ -Helix. Der Zugang reicht für den Durchlaß gefalteter Proteine nicht aus, so daß dadurch eine wichtige Steuerstelle für die regulierte Proteolyse von Substraten entsteht. Die Öffnung in den  $\beta$ -Ringern, die den Einlaß zu den proteolytisch aktiven Zentren ermöglicht, ist mit einem Durchmesser von 22Å wesentlich größer (siehe Abb. 6a). Die engen Einschnürungen stellen den limitierten Zugang der Proteine sicher und sorgen zudem für einen stufenweisen Abbaumechanismus, indem verhindert wird, daß teilweise abgebaute Polypeptide den Proteinkomplex vorzeitig verlassen (Coux *et al.*, 1996).

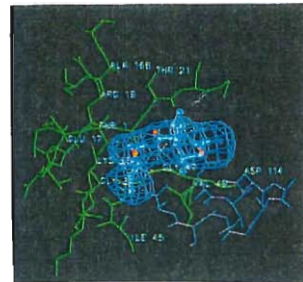
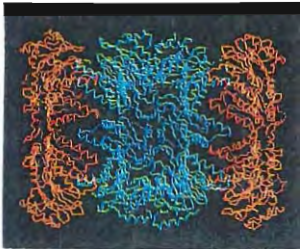


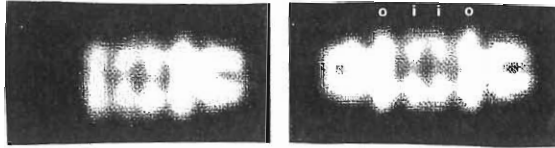
Abb. 6a: C $\alpha$ -Plot des 20S-Proteasoms aus *T. acidophilum*, aufgeschnitten entlang der siebenzähligen Achse.  
 Abb. 6b: Strukturausschnitt des Katalysezzentrums der  $\beta$ -Untereinheit des *Thermoplasma*-Proteasoms komplexiert mit Calpain-Inhibitor I (aus Löwe *et al.*, 1995).

In der *Thermoplasma*-20S-Proteasomstruktur mit gebundenem kompetitiven Inhibitor Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal konnten die aktiven Zentren des Enzyms innerhalb der zentralen Kammer in jeder  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert werden (Löwe *et al.*, 1995). Der Tripeptidinhibitor bindet in einer ausgestreckten Konformation in die durch eine Schleife von zwei  $\beta$ -Faltblättern gebildete hydrophobe Tasche. Die funktionelle Aldehydgruppe bildet mit der Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins ein Hemiacetal. Damit wurde

als Nukleophil für die Hydrolyse der Peptidbindungen das O $\gamma$  der Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins der  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert. Das 20S-Proteasom ist somit das erste Beispiel einer Thr-Protease, der detaillierte Reaktionsmechanismus blieb jedoch offen. Als Protonenakzeptor könnten sowohl das dem Thr1 benachbarte Lys33 als auch die Aminogruppe des eigenen Thr1 in Frage kommen (siehe Abb. 6b). Lys33 bildet mit Glu17 eine Salzbrücke und liegt wahrscheinlich in protonierter Form vor, so daß es als Protonenakzeptor der Hydrolyse nicht in Frage kommt. Es dient wohl eher der Modifizierung des elektrostatischen Potentials, das die N-terminale Aminogruppe in ihrer aktivierenden Wirkung auf die Thr1 Hydroxylgruppe unterstützen könnte. Die drei Aminosäuren Thr1, Glu17 und Lys33 sind in Sequenzen 20S-proteasomaler Untereinheiten konserviert, was auf eine Übereinstimmung oder zumindest Ähnlichkeit des proteolytischen Mechanismus der archaeobakteriellen Komplexe mit dem von 20S-Proteasomen höherer Organismen hindeutet (Löwe *et al.*, 1995, Stock *et al.*, 1996). Der gezielte Austausch von Thr1, Glu17 und Lys33 gegen andere Aminosäuren durch ortsspezifische Mutagenese führt beim *Thermoplasma*-20S-Proteasom zum vollständigen Verlust der proteolytischen Aktivität des Komplexes (Seemüller *et al.*, 1995). Die Faltung der 20S-proteasomalen Untereinheiten stimmt weitgehend mit der Faltung zweier weiterer Hydrolasen, der Penicillin-Acylase (Duggleby *et al.*, 1995) und der Glutamin-Amidotransferase (Smith *et al.*, 1994), überein (Brannigan *et al.*, 1995). Die Autoren schlagen eine Aktivierung des N-terminalen Restes durch ein in der Nähe des N-Terminus lokalisiertes Wassermolekül vor.

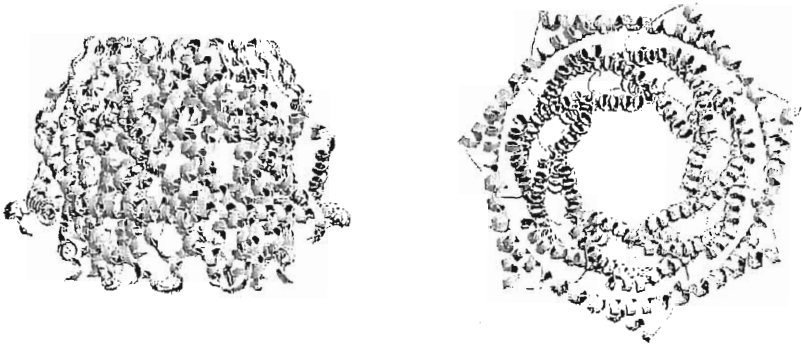
### 2.2.9 Regulation des 20S-Proteasoms in höheren Eukaryonten über PA28

Eine Protease, die sowohl im Cytosol als auch im Nukleus unselektiv Proteine abbaut, muß über einen präzisen Regulationsmechanismus verfügen, um keinen proteolytischen Schaden in der Zelle zu verursachen. PA28 und PA700 (siehe 2.2.2) sind physiologische Steuerkomponenten der eukaryontischen 20S-Proteasome. Der PA28-Komplex (auch 11S-Regulator genannt) assoziiert mit den 20S-Proteasomen zu einem multifunktionellen Enzym und sorgt für eine ca. 30-mal schnellere Peptidhydrolyse im Vergleich zum 20S-Proteasom (Chu-Ping *et al.*, 1992; Dubiel *et al.*, 1992). In Rohextrakten wurde PA28 entweder in ungebundener Form oder im Komplex mit dem 20S-Proteasom gefunden (siehe Abb. 7) (Chu-Ping *et al.*, 1994).



**Abb. 7:** EM-Aufnahme eines eukaryontischen 20S-Proteasoms komplexiert mit dem Regulator PA28 (Gray *et al.*, 1994).

Der isolierte PA28-Aktivator setzt sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammen. Diese besitzen eine molekulare Masse von 30kDa und zeigen 50% Sequenzidentität (Mott *et al.*, 1994). Ferner konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, daß das PA28-Protein ein Hexamer aus alternierenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten ist (Ahn *et al.*, 1995). Die  $\alpha$ -Untereinheit des PA28-Aktivators alleine vermag hexamere Ringe zu bilden (siehe Abb. 8) und die 20S-Proteaseaktivität zu stimulieren, während PA28 $\beta$  keine dieser Funktionen besitzt (Realini *et al.*, 1994, Knowlton *et al.*, 1997).



**Abb8:** Ribbon-plot der rekombinanten PA28 $\alpha$ -Struktur in unterschiedlichen Orientierungen (Knowlton *et al.*, 1997).

Die Bindung von PA28 an die 20S-Proteasom- $\alpha$ -Ringe erfolgt über den C-Terminus des Aktivators (Chu-Ping *et al.*, 1993). Der PA28-20S-Proteasomkomplex ist sehr instabil und



dissoziiert bereits bei geringer Salzkonzentration. Bislang gibt es keine Röntgenstruktur von PA28 assoziiert mit dem 20S-Proteasom, so daß über den Aktivierungsmechanismus lediglich spekuliert werden kann. Die PA28 $\alpha$ -Untereinheiten besitzen im zentralen Bereich eine Sequenz mit einem Lys-Glu-Lys-Glu-Motiv, welches die Protein-Protein Interaktion sowie die Oktapeptidgenerierung fördert (Realini *et al.*, 1994). Die PA28-Untereinheiten sind Genprodukte, die ebenso wie die LMP-Untereinheiten über  $\gamma$ -Interferon induziert werden (Honore *et al.*, 1993), so daß eventuell ein synergetischer Zusammenhang dieser Proteine in Bezug auf die Generierung von Peptiden für die MHC-Präsentation existieren könnte. Die physiologische Bedeutung für die beschleunigte Peptidhydrolyse ist bislang unklar, da im Zellcytosol nur geringe Mengen freier Oligopeptide vorkommen. Möglicherweise stimuliert das PA28-Molekül die Dissoziation von Peptiden, die während des Proteinabbaus produziert wurden, indem es die Eingangsöffnungen der  $\alpha$ -Ringe vergrößert. Ein solcher Mechanismus könnte die Anzahl und Länge der Proteolyseprodukte verändern und somit eine wesentliche Rolle in der Antigenpräsentation spielen (Coux *et al.*, 1996).

### 2.3 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Isolierung, Kristallisation sowie die röntgenkristallographische Strukturbestimmung des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae*. Mit der Kristallstruktur aus dem Archaeobakterium *T. acidophilum* lag bereits ein Strukturmodell für 20S-Proteasome vor (Löwe *et al.*, 1995), welches zur Phasenbestimmung herangezogen werden sollte. Da in eukaryontischen 20S-Proteasomen - im Gegensatz zu archebakteriellen - 14 oder mehr verschiedene Untereinheiten auftreten, wären durch Kenntnis der dreidimensionalen Struktur Aussagen über die Lage der aktiven Untereinheiten und den Reaktionsmechanismus eukaryontischer 20S-Proteasome möglich. *S. cerevisiae* wurde bewußt als Ursprungsorganismus für das eukaryontische 20S-Proteasom gewählt, da in Hefe genau 14 Gene für die Untereinheiten des 20S-Proteasoms codieren (Heinemeyer *et al.*, 1994) und nicht wie in höheren Eukaryonten 17, von denen drei in  $\gamma$ -Interferon-abhängiger Weise exprimiert werden (Brown *et al.*, 1993). Auf diese Weise wird eine mögliche Heterogenität der Proteinpräparation von vorneherein minimiert. Zusätzlich sollen neue 20S-Proteasominhibitoren für eukaryontische Systeme synthetisiert und deren Inhibitionsmechanismus durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Diese Ergebnisse wären die Basis für die Entwicklung von Medikamenten, die spezifisch die Immunantwort und Zellteilung beeinflussen. Ferner sollen positionsspezifische 20S-Proteasom-Mutanten in Hefe über gewonnene Strukturinformationen geplant, isoliert, kristallisiert und strukturell untersucht werden.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1 Stämme

###### *E. coli* XL1-Blue

(Stratagene GmbH, Heidelberg), (Bullock *et al.*, 1987)

Genotyp: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac*, [F'*proAB, lacI*<sup>q</sup>ZDM15, *Tn10*(tet<sup>r</sup>)].

###### *E. coli* DH5 $\alpha$

(ITC Biotechnology GmbH, Heidelberg), (Hanahan, 1983)

Genotyp: *deoR, endA1, gyrA96, hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>), *recA1, relA1, supE44, thi-1, D(lacZYA-argF)*, f80*lacZDM15F1*.

###### *E. coli* BL21(DE3)

(Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USA), (Studier & Moffatt, 1986)

Genotyp: F', *ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm*, (DE3).

###### *E. coli* BL21(DE3)pLysS

(Novagen, Inc., Madison, Wisconsin, USA), (Studier & Moffatt, 1986)

Genotyp: F', *ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm*, (DE3), pLysS (Cm<sup>R</sup>).

###### *S. cerevisiae* WCG4 $\alpha$ :

(Heinemeyer *et al.*, 1997)

Genotyp: *MAT $\alpha$ , his 3-11,15, leu 2-3, 112 ura 3, Can<sup>s</sup>GAL2*.

##### 3.1.2 Plasmide

###### pUC19-Klonierungsvektor

(Stratagene GmbH, Heidelberg), (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

pRSET6c und pRSET6d (Schoepfer, 1993).

Die pRSET-Vektoren besitzen eine T7-Promotersequenz und wurden als Expressionsplasmide für 20S-Proteasom-Untereinheiten in *E. coli* verwendet.

pRS315 (Sikorski & Hieter, 1989) (Heinemeyer *et al.*, 1997).

Das Plasmid ist ein Vertreter der Serie pRS3XX der *E. coli*/S. *cerevisiae*-shuttle-Vektoren und gehört zu der Reihe der Ycps (Yeast-Centromer-plasmids).

### 3.1.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Biomol, Difco, Fluka, Merck, Roth, Serva, und Sigma bezogen und waren mindestens vom Reinheitsgrad *zur Analyse*.

Molekulargewichtsmarker (Cytochrom c (12.5kDa), Carboanhydrase (29kDa), Albumin (66kDa), Alkohol Dehydrogenase (150kDa),  $\beta$ -Amylase (200kDa), Apoferritin (443kDa), Thyroglobulin (669kDa), Blue Dextran (2MDa)), Sigma Heidelberg; Aminomethylcoumarin- (AMC) und  $\beta$ -Naphthylamid-Peptidsubstrate ( $\beta$ NA), Bachem Bubendorf; Oligonukleotide und Primer, Oligonukleotid Synthesegruppe der Abteilung Membranbiochemie (MPI für Biochemie, Martinsried); Restriktionsenzyme, T4-Ligase und Vent-Polymerase, New England Biolabs (Schwalbach); Desoxynukleotide und Pfu-Polymerase, Stratagene Heidelberg; Terminator-Premix (Applied Biosystems, Forster City, USA); Plasmidpräparationskits Qiagen (Hilden).

Fluorimeter (Kontron Instruments), FPLC LCC-500 (Pharmacia), Superose6 für FPLC (Pharmacia), MonoQ (5/5) für FPLC (Pharmacia), Äkta-System mit HPLC-Pumpenausüstung (Pharmacia), RP60-Superspher-Säule (Merck), Smart<sup>TM</sup>System (Pharmacia), Kolbenhubpipetten (Abimed/Gilson), UV-VIS-Spektralphotometer Lamda 17 (Perkin Elmer), Ultrazentrifuge L7-55 mit Rotor Ti-55,2 (Beckman), Tischzentrifuge 2K15 (Sigma), Zentrifuge Avanti mit Rotoren JA-10 und JA20 (Beckman), Desintegrator S (Biomatik), Amicon-Rührzelleinheit (Amicon), Ultrafiltrationsmembranen YM100 (Amicon), Centricon 10 Mikrokonzentratoren (Amicon), Centriprep Mikrokonzentratoren (Amicon), Glaskugeln, mit  $\varnothing$ 0.5-0.7mm (Biomatik), Image Platesystem (MarResearch), Röntgengenerator RTP300 (Rigaku), Linbro Plates (ICN), Partikelfilter Millex HA, 22 $\mu$ m-Filter (Millipore), Partikelfilter Millex HA, 45 $\mu$ m-Filter (Millipore)

## 3.2 Arbeiten mit Bakterien und Hefen

### 3.2.1 Vermehrung von Bakterien und Hefen

#### Flüssigkulturen

##### *E. coli*

Autoklaviertes LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) wurde gegebenenfalls nach Zugabe der nötigen Antibiotika, mit Bakterien von einer Plattenkultur oder anderen Flüssigkulturen angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden bei 37°C im Schüttler inkubiert.

*LB-Medium:* 10g Trypton  
5g Hefeextrakt  
10g Natriumchlorid  
pH 7.0 mit NaOH eingestellt, ad 1000ml bidest. Wasser, autoklaviert.

Benötigte Antibiotika wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen unter 55°C in folgenden Konzentrationen zugesetzt.

Ampicillin: 80µl von einer Stammlösung: 100mg/ml in bidest Wasser.

Chloramphenicol: 40µl von einer Stammlösung: 40mg/ml in bidest Wasser.

##### *S. cerevisiae*

Autoklaviertes Vollmedium (YPD-Medium) für Hefe wurde mit entsprechenden Zellen von einer Plattenkultur oder anderen Flüssigkulturen angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden in der Regel bei 30°C im Schüttler inkubiert.

*YPD-Medium:* 10g Hefeextrakt  
20g Bactotrypton  
20g D-Glukose  
pH 5.5 mit HCl eingestellt, ad 1000ml bidest. Wasser, autoklavieren.

Für Selektion auf auxotrophe Hefemutanten wurde gegebenenfalls nach Zugabe der nötigen Komponenten (Aminosäuren, Adenin und Uracil) autoklaviertes synthetisches Medium (CM) mit Hefezellen einer Plattenkultur oder anderen Flüssigkulturen angeimpft.

*CM-Medium:* 1.3g Dropout-Mix

6.7g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren

20g D-Glukose

pH 5.5 mit HCl eingestellt, ad 1000ml bidest. Wasser, autoklaviert.

Der Dropout-Mix enthält Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val, myo-Inositol zu je 5.85%. Zum Medium wurden nach autoklavieren 0.3mM His, 1.7mM Leu, 1mM Lys, 0.4mM Trp, 0.3mM Adenin und 0.2mM Uracil zugegeben, wobei die zur Selektion nötigen Aminosäuren bzw. Basen entfielen.

Für das Entfernung von uracilmarkierten Plasmiden aus den Hefezellen wurde ein Gegenselektionsmedium (5'-FOS-MV) verwendet.

*5'-FOS-MV-Medium:* 6.7g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäure

20g D-Glukose

1mg 5'-Fluororotic-Säure (5'-FOS)

1.3g Dropout-Mix (mit His, Leu, Lys, Trp, Ade und Ura)

pH 5.5 mit HCl eingestellt, ad 1000ml bidest. Wasser, autoklaviert.

### **Plattenkulturen**

LB- bzw. Hefekulturmedium wurde mit 15g/l Agar versetzt und autoklaviert. Für *E. coli*-Selektion wurden die Agarplatten nach dem Autoklavieren auf ca. 55°C abgekühlt und je nach Anforderungen 80mg/l Ampicillin, 40mg/l Chloramphenicol und 1% D-Glukose zugegeben. Das Medium wurde ca. 6mm hoch in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten 30min zum Trocknen offen in der Sterilbank gelassen und anschließend sterilverpackt bei 4°C aufbewahrt. Zum Ausplattieren von Kulturen wurde mittels einer sterilen Pipette 10-200µl Flüssigkultur auf einer Petrischale gegeben und mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausgestrichen. Für das Animpfen von Glycerinkulturen wurde eine ausgeglühte Impföse verwendet. Auf Agar-Platten ausgestrichene *E. coli*-Kulturen wurden 14-20h bei 37°C, Hefekulturen bei 30°C für zwei bis fünf Tage inkubiert.

## Fermentation

### *E. coli*

Eine *E. coli* BL21(DE3)-Einzelkolonie mit entsprechendem Expressionsplasmid wurde verwendet um eine Vorkultur (100ml LB-Medium mit Ampicillin, Chloramphenicol und Glukose) anzupflanzen. Diese wurde entweder direkt für die Zucht einer Expressionskultur eingesetzt oder bis zu ihrer Verwendung (maximal 36h) bei 4°C aufbewahrt. 4l Medium wurden mit 30-50ml Vorkultur beimpft. Die Kulturen in den Erlenmeyerkolben, in deren Wänden zur besseren Belüftung Schikanen eingeschmolzen waren, wurden mit 150rpm geschüttelt. Die Expressionskulturen wurden bis zu einer OD von 1.5 bei 37°C kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0.7mM induziert. In der Regel wurden die Kulturen durch Ausschalten der Heizung des Schüttlers auf 25°C abgekühlt, für 4h bei RT weiterkultiviert und anschließend die *E. coli*-Zellen abzentrifugiert (4000g, 25min, 4°C). Die Bakterienzellen wurden in Aufschlußpuffer (20mM Tris/HCl 7.5, 1mM EDTA, 20mM Magnesiumchlorid, 1mM Natriumazid) resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

### *S. cerevisiae*

Zur Herstellung einer Hefe-Vorkultur wurden 100ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder mit Zellen aus einer Dauerkultur angeimpft. Diese wurden bei 30°C bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert (48h) und mit 15l YPD-Medium vermischt. Die Kulturen wurden 48h bei 30°C und 150rpm geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (4000g, 25min, 4°C). Die Hefezellen wurden im Aufschlußpuffer (20mM Tris/HCl 7.5, 1mM EDTA, 20mM Magnesiumchlorid, 1mM Natriumazid) resuspendiert und bei 4°C für maximal eine Woche zwischengelagert.

### 3.2.2 Aufbewahrung von Bakterien und Hefen

Plattenkulturen wurden mit Parafilm umwickelt und bei einer Temperatur von 4°C bis zu 6 Wochen gelagert. Die langfristige Aufbewahrung von Bakterien und Hefen erfolgte in Glycerinkulturen bei -80°C. Dazu wurden 0.5ml einer stationären Flüssigkultur mit dem gleichen Volumen an autoklaviertem Glycerin in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt. Die Entnahme erfolgte mit einer Impföse, so daß kein Auftauen der Glycerinkultur stattfand.

### 3.2.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien und Hefen

#### *E. coli* für BL21DE3 und DH5 $\alpha$ -Stämme

Für die Herstellung von Bakterien, die mit großer Effizienz Plasmide aufnehmen können (sog. kompetente Bakterien), wurde eine 3ml Übernachtskultur angelegt, von der am nächsten Tag 1ml verwendet wurde, um 50ml LB-Medium anzupflegen. Die Bakterien wuchsen bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.5. Sie wurden auf Eis für 5min abgekühlt und danach abzentrifugiert (4000g, 5min, 4°C). Das Pellet wurde in 20ml TFB I resuspendiert, 5min auf Eis gegeben und erneut abzentrifugiert (4000g, 5min, 4°C). Die Bakterien wurden daraufhin in 2ml TFB II resuspendiert und aliquotiert (100ml/Eppendorf-Reaktionsgefäß). Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 15min auf Eis inkubiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

*Transformationspuffer I:* 100mM Rubidiumchlorid  
30mM Kaliumacetat  
10mM Calciumchlorid  
50mM Mangan(II)chlorid  
15% (v/v) Glycerin

Der pH 5.8 wurde mit 0.2 M Essigsäure eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

*Transformationspuffer II:* 75mM Calciumchlorid  
10mM Rubidiumchlorid  
10mM 1,4-Piperazin-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)  
15% (v/v) Glycerin

Der pH 6.5 wurde mit 1M KOH eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

Die somit erhaltenen transformationskompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 10-20 $\mu$ l Ligationsansatz oder 0.01-1 $\mu$ g Plasmid-DNA wurden zu den Bakterien pipettiert und die Mischung 60min auf Eis inkubiert. Die Bakterien erhielten für 2min einen Hitzeschock bei 42°C und wurden dann wieder 15min auf Eis gegeben. Der Ansatz wurde mit 400 $\mu$ l LB-Medium versetzt und unter Schütteln bei 37°C für 60min inkubiert. Anschließend wurden 20 $\mu$ l und 200 $\mu$ l des Transformationsansatzes auf Agar-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen. Die Petrischalen wurden 12-20h bei 37°C inkubiert.

### *S. cerevisiae*

Von einer Stammkultur wurden Hefezellen auf eine YPD-Agarplatte ausgestrichen und bei 30°C über Nacht inkubiert. Mit daraus erhaltenen Einzelkolonien wurde eine Vorkultur hergestellt (Wachstumsdauer: ca. 15h). Jeweils 12ml der Zellsuspension wurden bei 3000g zentrifugiert, in 1ml TES resuspendiert bei 4500g nochmals zentrifugiert und in 236µl TES/14µl DMSO bei -80°C für maximal eine Woche aufbewahrt.

Auf die transformationskompetenten gefrorenen Hefezellen wurde 0.1-1µg Plasmid gegeben und diese 5min bei 37°C behandelt. Ihnen wurde 1ml TPEG zugesetzt. Nach 1h Wachstum bei 30°C wurden sie zentrifugiert (3000g, 4°C, 5min) und in 200µl TN resuspendiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf CM-Agarplatten (denen für die Selektion notwendige Komponenten fehlten) ausgestrichen und 48h bei 30°C aufbewahrt. Aufgrund eines starken Hintergrundes wurden in der Regel einzelne Klone gepickt und nochmals auf einer CM-Agarplatte selektioniert.

*Transformations-Puffer:* TES 1M Sorbit, 10mM Tris, 3% Ethylenglykol.  
TPEG 0.2 M Tris, 40% Peg 1000.  
TN 10mM Tris, 0.15 M NaCl

Der pH 8.35 wurde mit 1M HCl eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.

## 3.3 Arbeiten mit DNA

### 3.3.1 Charakterisierung von DNA

#### Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde in Horizontalgel-Apparaturen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Als Laufpuffer wurde TAE verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 1% (w/v) Agarose in Laufpuffer aufgekocht, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlen auf 60°C wurde eine wässrige Lösung von Ethidiumbromid (10µg/ml) zu einer Endkonzentration von 1.5µg/ml hinzugefügt. Die heiße Agarose wurde in eine vorbereitete Apparatur gegossen und nach dem Erstarren mit Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit einem Fünftel ihres Volumens mit 6xProbenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde unter konstanter Spannung mit 5-10V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Unter UV-Licht ( $\lambda=254\text{nm}$ ) wurde die DANN anhand ihrer Fluoreszenz detektiert.



1x TAE: 40mM Tris-HCl, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA, gelöst bei pH 8.0.

6x Probenpuffer: 30% Glycerin, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylenyanol.

### DNA-Sequenzierung

1µg DNA wurde mit 3.2pmol Sequenzierprimer und 8µl PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Terminator-Premix) versetzt und mit bidest. Wasser auf 20µl Endvolumen aufgefüllt. Der Terminator-Premix (Applied Biosystems, Forster City, USA) enthielt optimierte Konzentrationen dNTPs, 168.4mM Tris pH 9.0, 4.2mM Ammoniumsulfat, 42.1mM Magnesiumchlorid, 0.42U/ml AmpliTaq-Polymerase und optimierte Konzentrationen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierter Didesoxynukleotide für den Kettenabbruch. Es wurde mit 30µl Mineralöl überschichtet und ein Temperaturprogramm analog PCR angewandt, was zu einer linearen Amplifizierung von verlängerten Primern führte, die mit einem fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotid endeten. Die Reaktionsprodukte wurden mit Hilfe von Micro-Spin S-200-Säulen (Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt, mit Ethanol gefällt und für die Sequenzgelelektrophorese auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese, Detektion der Fluoreszenzsignale und deren Auswertung wurden mit einem DNA-Sequenzator (Modell 373, Applied Biosystems, Forster City, USA) durchgeführt.

### 3.3.2 Vermehrung und Präparation von DNA und DNA-Fragmenten

#### Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Es wurden mit Plasmid-DNA Minipräparationen (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989) Kolonien gesucht, die nach Transformation das gewünschte Konstrukt enthielten. Dazu wurde eine 3ml Übernachtskultur in einem 15ml Falcon-Röhrchen angelegt und anschließend durch Zentrifugation (4000g, 5min, 4°C) Bakterienzellen von 1.5ml Kultur geerntet. Das Pellet wurde in 100µl Puffer P1 resuspendiert und mit 200µl Puffer P2 vermischt. Es wurden 150µl Puffer P3 und 500µl Phenol/Chloroform-Lösung (Isoamylalkohol/Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:25:24) hinzugegeben. Es wurde kräftig geschüttelt und abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 15000g, 5min, RT). Dabei entstand eine Phasentrennung zwischen der schwereren Phenol/Chloroform-Phase und der leichteren wässrigen Phase. Zwischen diesen Lösungen lag eine weiße Schicht aus präzipitiertem Protein. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1ml Ethanol versetzt. Es wurde geschüttelt und abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 13000g,

30min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1ml 70%igen Ethanol versetzt. Es wurde erneut geschüttelt, zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in 20µl 10mM Tris/HCl, pH 8.5 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

*Puffer P1:* 50mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH8.0  
10mM Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)  
100µg/ml RNase A, gelagert bei 4°C

*Puffer P2:* 200mM Natriumhydroxid / 1% Natriumdodecylsulfonat

*Puffer P3:* 3M Kaliumacetat, pH 5.5

#### **Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Um größere Mengen (20-200µg) hochreiner Plasmide zu isolieren, wurde der Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Die Bakterien wurden dabei durch eine NaOH/SDS-Behandlung lysiert. Proteine und assoziierte genomische DNA wurde durch KOAc gefällt. Die weitere Reinigung der Plasmid-DNA fand durch Ionenaustauscher-Chromatographie statt. 500µl Bakterienkultur wurden abzentrifugiert (4000g, 5min, 4°C) und das Bakterienpellet in einer entsprechenden Menge Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde das gleiche Volumen Puffer P2 zugegeben, anschließend gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde ein weiteres Volumen Puffer P3 hinzugefügt und kräftig geschüttelt, so daß die ausfallenden Proteine relativ kleine Partikel bildeten. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (20000g, 30min, 4°C) und der Überstand auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-tip 100-Säule aufgetragen. Es wurde mit zweimal 10ml Puffer QC gewaschen und mit 4ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (20000g, 15min, 4°C). Die DNA wurde an der Luft getrocknet und in 100µl Tris/HCl, pH 8.5 gelöst. Die Konzentration wurde durch Messung der OD<sub>260</sub> bestimmt (OD<sub>260</sub> von eins entsprechen 50µg DNA/ml). Das Verhältnis OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub> kann als Maß für die Reinheit der DNA verwendet werden und beträgt in der Regel 1.8-2.0.

*Puffer QBT:* 750mM Natriumchlorid  
50mM 3-Morpholino-propansulfonsäure/NaOH, pH 7.0  
15% (v/v) Ethanol  
0.15% (v/v) Triton X-100

- Puffer QC:* 1M Natriumchlorid  
50mM 3-Morpholino-propansulfonsäure/NaOH, pH 7.0  
15% (v/v) Ethanol
- Puffer QF:* 1.25M Natriumchlorid  
50mM 3-Morpholino-propansulfonsäure/NaOH, pH 8.5  
15% (v/v) Ethanol

### **Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Jetsorb Kit (Genomed). Die DNA-Bande wurde aus dem Gel (mit TAE als Laufpuffer) möglichst knapp ausgeschnitten. 300µl Puffer A1 (enthält nicht angegebene Konzentrationen Natriumchlorat, "TBE-Solubilisierer" und Natriumacetat), 10µl Jetsorb-Suspension (Harz) und 15µl 500mM Tris/HCl, pH 7.0 wurden je 100mg Gel hinzugefügt und die Suspension 15min bei 50°C unter schütteln inkubiert. Es wurde abzentrifugiert, einmal mit Puffer A1 und zweimal mit Puffer A2 (enthält Ethanol, Natriumchlorid, EDTA und Tris/HCl) gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und die DNA durch Inkubation des Jetsorb-Harzes (5min) mit 20µl 10mM Tris/HCl, pH 8.5 eluiert. Das Harz wurde abzentrifugiert und die DNA in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Alle Zentrifugationsschritte wurden 30s bei RT in der Tischzentrifuge durchgeführt.

### **3.3.3 Enzymatische DNA-Reaktionen**

#### **Verdau der DNA durch Restriktionsendonukleasen**

Zur Charakterisierung von DNA oder zur Konstruktion von Plasmiden wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt. Für analytische Zwecke wurden 0.4-1µg, für präperative Zwecke bis zu 15µg DNA, mit 3-8U Restriktionsenzym/µg DNA, 1/10 Endvolumen des vom Hersteller der Enzyme empfohlenen 10xPuffers und bidest. Wasser in einem der DNA-Menge entsprechenden Volumen für 2-4h bei 37°C inkubiert. Die Restriktionsverdau wurden im Anschluß auf Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und daraus die DNA isoliert. Bei Doppelverdau mit Enzymen unterschiedlicher Pufferanforderungen wurde zuerst mit dem Enzym verdaut, das niedrigere Salzkonzentrationen benötigt, dann eine entsprechende Menge NaCl hinzugefügt und mit dem zweiten Restriktionsenzym gespalten. Alternativ wurde das Produkt des ersten Verdau über ein Agarose-Gel gereinigt, isoliert und anschließend mit dem zweiten Restriktionsenzym geschnitten.

*Trenngel 12% für 8 Minigele:*

22.5µl LösungA, 30ml LösungB, 22.5ml bidest. Wasser, 15ml Glycerin, entgasen, 60µl TEMED, 200µl 10% (w/v) APS, überschichten mit Butanol/Wasser 1:1 (2ml pro Gel).

Nach 2h wurde das Butanol/Wasser-Gemisch abgeschüttet und das darunterliegende Trenngel mit Filterpapier getrocknet. Darauf gab man das Sammelgel und fügte im Anschluß die Kämme ein.

*Sammelgel für 8 Minigele:*

8ml LösungA, 16ml LösungB, mit Wasser ad 48ml, 20µl TEMED, 150µl 10% APS.

**Proteinfällung**

Kalium- und Magnesiumionen bilden mit SDS ein schwerlösliches Salz und verhindern somit eine SDS-Gelelektrophorese. Deshalb wurden Proteine in Lösungen, denen diese Ionen zugesetzt waren mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt, in dem eine Endkonzentration an TCA von 12% (w/v) eingestellt wurde. Es wurde 10min auf Eis inkubiert und das ausgefallene Protein bei 15000g abzentrifugiert. Das Pellet wurde so lange mit 50mM Tris/HCl, pH 8.5 und 25% Ethanol, das durch Bromphenolblau angefärbt war, behandelt, bis kein Farbumschlag des Indikators mehr stattfand. Das Pellet wurde in 10µl Probenpuffer aufgenommen.

**Färbemethoden**Coomassiefärbung (Cooper, 1981)

Nachdem der Farbstoff Bromphenolblau als Frontmarker das Polyacrylamidgel bei der Gelelektrophorese durchlaufen hatte, wurde dieses in eine Coomassie brilliant Blue R250-Färbelösung eingelegt. Für eine optimale Anfärbung erhitzte man die Lösung mit dem Polyacrylamidgel kurzzeitig auf 80°C und schüttelte 15min. Anschließend ersetzte man die Färbelösung durch eine Entfärbelösung. Nach Behandlung des Polyacrylamidgels für weitere 4h auf dem Schüttler mit der Entfärbelösung wurden die einzelnen Protein-Banden sichtbar. Die Coomassiefärbung gab nur ein grobes Bild des Reinheitsgrades wieder, da die Nachweisgrenze im µg Bereich liegt.

*Coomassie brilliant Blue Färbelösung:*

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

*Entfärbelösung:*

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

*Silberfärbung (Oakley et al., 1980)*

Diese Methode zum Färben von SDS-Polyacrylamidgelen weist Proteinmengen im ng-Bereich nach. Es wurden jeweils 50ml der unten aufgeführten Lösungen eingesetzt. Das SDS-Schäggel wurde 1h in die Fixier- und danach 1-3h in die Inkubationslösung gegeben. Daraufhin wusch man dreimal 10min mit 50ml bidest. Wasser nach und behandelte das Gel 30min mit der Färbelösung. Anschließend dekantierte man diese ab, wusch kurz mit bidest. Wasser (entfernt überflüssige Färbelösung) und entwickelte. Sobald die gewünschte Färbungsintensität erreicht war, wurde der Entwickler abgeschüttet und die Stopplösung hinzugegeben. Das Gel war in dieser Lösung längere Zeit lagerfähig.

*Fixierlösung 1h:*

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

*Inkubationslösung 1-3h:*

41g Natriumacetat in wenig Wasser lösen, 250ml Ethanol und bidest. Wasser ad 1000ml.  
Kurz vor Gebrauch: 0.1g Natriumthiosulfat und 250µl Glutaraldehyd pro 50ml zugeben.

*Färbelösung 30min:*

1g Silbernitrat, bidest. Wasser ad 1000ml.  
Kurz vor Gebrauch: 15µl Formaldehyd pro 50ml zugeben.

*Entwicklerlösung 1-10min:*

25g Natriumcarbonat, bidest. Wasser ad 1000ml, pH 11.5 mit Carbonat/Hydrogencarbonat.  
Kurz vor Gebrauch: 15µl Formaldehyd pro 50ml zugeben.

*Stopplösung:*

18.6g EDTA, bidest. Wasser ad 1000ml.

### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### *Proteinkonzentrationsbestimmung über Extinktion*

Mit dem UV-Spektrometer von Perkin Elmer, Lambda 17 wurde in einer Quarzküvette die Extinktion (E) der Proteinlösung bei 280nm gemessen und mit dem Lambert Beer'schen Gesetz die Proteinkonzentration ermittelt.

#### *Proteinkonzentrationsbestimmung mit der Methode nach Lowry*

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration mit dieser Methode (Cooper, 1981) wurde jedesmal eine neue Standardgerade erstellt. Das eingesetzte Protein war Rinder-Serum-Albumin (BSA) und die verwendeten Mengen für die Kalibrierung betragen 0, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50µg. BSA sowie das zu bestimmende Protein wurden in 300µl bidest. Wasser vorgelegt, mit 1ml LowryC gemischt und 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100µl LowryD hinzugegeben und nach 3min die Färbereaktion mit 100µl LowryE beendet. Die Absorbtion der Lösung wurde in Einmal-Polystyrolküvetten mit dem Perkin Elmer Lambda 17 Spektrometer bei 740nm bestimmt. Um die auftretenden Fehler möglichst gering zu halten, wurden drei unterschiedliche Proteinkonzentrationen eingesetzt und über die erhaltenen Werte gemittelt.

#### *LowryA-Lösung:*

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

#### *LowryB-Lösung:*

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

#### *LowryC-Lösung:*

98% (v/v) LowryA- und 2% (v/v) LowryB-Lösung.

#### *LowryD-Lösung:*

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

#### *LowryE -Lösung:*

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

### **Proteinreinheitsbestimmung**

Das Smart™ System ermöglicht den Nachweis von ng-Konzentrationen, so daß hiermit Proteine auf Probenverunreinigungen untersucht wurden. Als Säulen wurden MonoQ und Superose6 verwendet. Um zusätzliche Aussagen über Assoziationsbildungen von Proteinen

zu treffen, wurde die Superose6 Säule mit unterschiedlichen Molekulargewichtsmarkern kalibriert.

*Superose6*: (Material: Monobeads: Säulenvolumen: 2.4ml)

Eingesetztes Probenvolumen: 20µl; Konz.: 1mg/ml; Flußgeschw.: 40µl/min.

*MonoQ*: (Material: Monobeads: Säulenvolumen: 100 µl)

Proteinmenge: 20µg; Flußgeschw.: 100µl/min; Konzgrad.: 120µl/10mM Natriumchlorid.

### **Aufspaltung der 20S-Proteasom-Untereinheiten**

Die Untereinheiten des 20S-Proteasoms wurden über *reversed phase* HPLC aufgetrennt. Eine RP60 Superspher-Säule (Merck) wurde mit 100µg Probe beladen. Anschließend wurde die Säule mit einem linearen Gradienten (Volumen 4.5ml) von 0-30% Acetonitril in 0.1% Trifluorsäure (TFA) mit einer Flußrate von 0.3ml/min gewaschen. Daraufhin wurden die einzelnen Untereinheiten in einem linearen Gradienten (Volumen 18ml) von 30-60% Acetonitril in 0.1% TFA mit einer Flußrate von 0.3ml/min und einem Rückdruck von 140bar eluiert. Die Absorbtion wurde bei 215nm gemessen, die eluierten Proteine N-terminal ansequenziert (Dr. K. Mann, MPI für Biochemie, Martinsried) und anhand ihrer Sequenz den Untereinheiten zugeordnet.

### **Aktivitätstest für das 20S-Proteasom**

Fractionen, in denen aktives 20S-Proteasom vorhanden war, konnten über verschiedene Aktivitätstests identifiziert werden.

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

Es wurden 10µl einer 10mM Substratlösung (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC für CL-Aktivität und Z-Val-Gly-Arg-AMC für TL-Aktivität, Bachem) in DMSO mit 5ml TEN-Puffer verdünnt. 50µl davon wurden mit 50µl der zu untersuchenden Enzymlösung vermischt und in einen Heizblock (37°C) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1h wurde 1ml Stopp-Puffer A hinzugefügt und die Reaktion beendet. Das 20S-Proteasom spaltete nach den Tyr- bzw. Arg-Resten spezifisch die AMC-Gruppe ab. Das Coumarinderivat wurde mit Licht der Wellenlänge 360nm angeregt und fluoreszierte bei einer Wellenlänge von 460nm. Die Kalibrierung des Fluorimeters auf 100% erfolgte mit 10µl 0.2mM AMC in DMSO, 200µl TEN-Puffer und 1ml Stopp-Puffer. 0% Aktivität erhielt man durch Zugabe von 50µl

Substratlösung zu 150µl TEN und 1ml Stopp-Puffer in Abwesenheit einer Enzymlösung (0.1M Monochloressigsäure, 0.1M Natronlauge, 0.1M Ethanol).

#### *Nachweis der PGPH-Aktivität*

10µl der 1mM Substratlösung (Z-Leu-Leu-Glu-βNA, Bachem, gelöst in DMSO) wurden mit 50µl Enzymlösung vermischt und in einen Heizblock (60°C) für 2h gegeben. Anschließend beendete man die Reaktion durch Zugabe von 1ml Stopp-Puffer. Das 20S-Proteasom spaltet nach dem Glu-Rest spezifisch die βNA-Gruppe ab. Das β-Naphtylamid wird mit einem Fluoreszenzlicht von 355nm angeregt und emittiert eine Wellenlänge von 410nm. Die Kalibrierung des Fluorimeters auf 100% erfolgte mit 10µl einer 10mM β-Naphtylamidlösung in DMSO, 200µl TEN-Puffer und 1ml Stopp-Puffer. 0% Aktivität erhielt man, in dem statt Enzymlösung 150µl TEN-Puffer zu 50µl Substratlösung und 1ml Stopp-Puffer zugegeben wurde.

#### *Spezifische Inhibierung der 20S-Proteasomaktivität*

Durch Zugabe von Lactacystin (Fenteany *et al.*, 1995) wurde selektiv die 20S-Proteasomaktivität inhibiert. Die erneute Durchführung des chymotryptischen Aktivitätstests unter Zusatz von 1µl Lactacystin ließ einen deutlichen Aktivitätsverlust in den 20S-Proteasomfraktionen erkennen, so daß diese damit einfach zu charakterisieren waren.

### **3.4.2 Reinigung des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae***

Die eingesetzte Hefe wurde von Hefe-Mayr, Riesenfeldstraße 78, 80809 München bezogen. Bei den Hefezellen handelte es sich um *S.cerevisiae*. Es wurde 1l einer 40% (w/v) Zellsuspension in TEN-Puffer (20mM Tris/HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 1mM Natriumazid) hergestellt, der 100µg PMSF, gelöst in wenig Ethanol, zugesetzt wurden. Der Aufschluß der Hefezellen erfolgte mit einer Glasperlenmühle (Zelldesintegrator). Die eingesetzte Menge an Zellsuspension betrug 50ml pro Lauf. Die optimale Größe der verwendeten Glasperlen richtete sich nach der Zellart - der ideale Durchmesser für Hefen liegt bei 0.5-0.7mm. Es wurde ein Verhältnis von Glasperlen- zu Zellsuspensionsvolumen von 1.5 zu 1 verwendet. Für die Hefezellen wurde eine Glasperlengeschwindigkeit von 10m/s (entspricht einer Drehzahl von 3500rpm) und eine Aufschlußdauer von 10min gewählt. Das Zellysate wurde in Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und diese in einem Ti-45 Rotor zentri-



fugiert (35000rpm, 2h, 4°C). Der stark gelbe, trübe Überstand wurde dekantiert und bei 4°C einer Ionenaustauschchromatographie unterworfen. Das Hefelysate wurde bei 4°C auf eine mit 250mM NaCl/TEN-Puffer voräquilibrierte Q-Sepharosesäule aufgetragen. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 1.0ml/min. Nach dem Auftragen des gesamten Zell-Lysats wurde bis zum erneuten Erreichen der Anfangsextinktion mit 250mM NaCl/TEN-Puffer gewaschen (ca. 15h). Anschließend wurden die noch gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Das dabei verwendete Gradientenvolumen betrug 2l, die Konzentration belief sich auf 250-800mM NaCl in TEN-Puffer. Es wurden 15ml Fraktionen gesammelt, die auf die unterschiedlichen 20S-Proteasomaktivitäten untersucht wurden. Die Fraktionen, in denen sich das 20S-Proteasom durch Aktivitätstest und Gel-Elektrophorese nachweisen ließ, wurden vereinigt, mittels einer Amicon-Zelle (Membran MWCO 100kDa) bei 4°C aufkonzentriert und in TEN-Puffer mit 100mM NaCl dialysiert. In einem zweiten Schritt wurde über Hydroxylapatit chromatographiert. Die Säule (Volumen: 100ml Hydroxylapatit) wurde mit 40mM Kaliumphosphat, pH 7.5 voräquilibriert und mit der Proteinlösung beladen. Nach Auftrag wurde mit 40mM Kaliumphosphat, pH 7.5 bis zum Erreichen der Anfangsextinktion gewaschen. Die Durchflußgeschwindigkeit war 0.8ml/min. Anschließend wurden die noch gebundenen Proteine mit einem linearen Kaliumphosphat-Gradienten, pH 7.5 eluiert. Das dabei verwendete Gradientenvolumen betrug 1l, die Konzentration belief sich auf 40-350mM Kaliumphosphat, pH 7.5. Es wurden 15ml Fraktionen aufgefangen und in diesen der Aktivitätstest durchgeführt. Des Weiteren wurde das Protein über Schäggergelelektrophorese in den Fraktionen charakterisiert. Die vereinigten 20S-Proteasom-Fraktionen wurden mit Hilfe von Centripreps und Centricons (100kDa MWCO Membran) auf ca. 1ml eingeeengt. Die Proteinendkonzentration betrug hierbei ca. 20mg/ml. Davon wurden jeweils 300µl auf eine Superose6-Säule aufgetragen. Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert und entgast. Die Flußgeschwindigkeit, mit der die Säule betrieben wurde, war 0.3ml/min. Die Reinheit des erhaltenen 20S-Proteasom-Signals wurde mit der Schäggergelelektrophorese und dem Smartsystem überprüft und die 20S-Proteasomendkonzentration über den Lowry-Test bestimmt.

### 3.5 Röntgenstrukturanalytische Methoden am 20S-Proteasom

Die Theorie der Röntgenkristallographie ist für eine Präsentation an dieser Stelle zu komplex. Für eine detaillierte Einführung sei deshalb auf die folgenden Textbücher verwiesen: Blundell & Johnson, 1976; McPherson, 1982; Stout & Jensen, 1989; Giacovacco *et al.*, 1992; Drenth, 1994; Glusker *et al.*, 1994.

#### 3.5.1 Kristallisation

Zur Kristallisation wurde die Methode der Dampf-Diffusion im hängenden Tropfen angewandt (McPherson, 1982). Alle Kristallisationsexperimente wurden in Zellkulturplatten (Linbro Plates (ICN, Eschwege)) durchgeführt. Um ein Austrocknen des Tropfens zu verhindern, wurden die Ränder der 24 Vertiefungen plangeschliffen und mit der Abdichtungsmasse Rotitherm H250 eingefettet. Auf das hydrophobisierte Deckglas wurden 4 $\mu$ l Proteinlösung mit 2 $\mu$ l Fällungslösung vermischt und über 1ml Reservoirlösung plaziert. Die eingesetzten Pufferlösungen wurden nach Jancaric & Kim, 1976 hergestellt. Die Proteinkonzentration betrug 40mg/ml in TEN-Puffer. Sämtliche Kristallisationslösungen wurden durch Ultrafiltration von Schwebestoffen befreit. Die Kristallisationsexperimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 3.5.2 Datensammlung und Datenreduktion

Die Kristalle wurden in einem geeigneten Frierpuffer überführt und nach 20s bei 90K eingefroren. Datensätze zur Strukturlösung des 20S-Hefeproteasoms wurden unter Verwendung von Synchrotronstrahlung am DESY (Deutsches Elektronensynchrotron, HASYLAB) an der Strahlführung BW6 (*Wiggler Beamline* mit Toroidal-Spiegel) aufgenommen. Die Wellenlänge betrug 1.1Å und der Abstand Kristall-Detektor war für die verschiedenen Datensätze unterschiedlich (zwischen 220 und 300mm). Die Datensammlung erfolgte mit Winkelinkrementen von 0.5 bis 1° mit einer Belichtungsdosis von 2000 bis 10000 counts. Die Temperatur betrug während den jeweiligen Messungen für den Kristall 90K. Als Detektor wurde eine *MAResearch Plate* verwendet. Die aufgenommenen Diffraktionsbilder wurden mit IMSTILLS und REFIX (Kabsch, 1988) indiziert und mit MOSFLM Version 5.21-5.23 (Leslie, 1991) integriert. Dabei wurde die Auflösung jedes Diffraktionsbildes nach der Integration mit MOSFLM so beschränkt, daß in der äußersten

Auflösungsschale noch ein  $I > 2s(I)$  erhalten wurde. Die Datenreduktion erfolgte mit den CCP4-Programmen ROTAVATA, AGROVATA und TRUNCATE (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Selbstrotationsfunktionen wurden mit dem Programm GLRF (Tong & Rossmann, 1990) berechnet und ausgegeben.

### 3.5.3 Mittelung im direkten Raum

Zur Mittelung von Elektronendichten im direkten Raum wurde das Programm MAIN (Turk, 1992) benutzt. Die erforderlichen Symmetrieoperationen wurden aus dem verwendeten Atommodell abgeleitet.

### 3.5.4 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Für alle Patterson-Suchen wurde das Programm AMoRe (Navaza, 1994) verwendet. Als Suchmodell wurde für das 20S-Hefeproteasom das 20S-Proteasom aus *T. acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995) eingesetzt. Alle Verfeinerungen der Atomkoordinaten wurden mit X-PLOR (Brünger, 1992) durchgeführt. Als Zielfunktion wurde der kristallographische R-Faktor minimiert, wobei geometrische Parameter (Engh & Huber, 1991) berücksichtigt wurden. Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungen zu haben, wurden 5% der Reflexe zufällig ausgewählt und als *Testset* nicht mit in die Verfeinerungsrechnung einbezogen (Brünger, 1992b). Der aus ihnen berechnete *freie R-Faktor* liegt im Regelfall etwa 5% höher als der kristallographische *Arbeits-R-Faktor* und warnt vor einer Überanpassung der Daten. Im Anschluß an die Koordinatenverfeinerung wurden individuelle Temperaturfaktoren korrigiert. Atomare Modelle wurden mit einer Graphikworkstation der Firma Evans & Sutherland ESV mit dem Programm FRODO Version 4.4 (Jones, 1978; modifiziert durch Evans, MRC, Cambridge, UK) in die Elektronendichte eingepaßt.

### 3.5.5 Graphische Darstellungen

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997), MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), POVSCRIPT (durch Peisach modifiziertes MOLSCRIPT), RASTER3D (Bacon & Anderson, 1988; Merrit & Murphy, 1994) und POV-RAY (POV-Team: <http://www.povray.org>) verwendet. Oberflächen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls *et al.*, 1993) berechnet und dargestellt. Sequenzvergleiche

wurden mit den Programmen PILEUP (Wisconsin Package, Genetics Computer Group, Madison, USA) und ALSCRIPT (Barton, 1993) durchgeführt.

Zur Nachbearbeitung von Bildern sowie zur Konvertierung zwischen verschiedenen Formaten wurden die Programme GHOSTSCRIPT (Aladdin Enterprises, USA), XV (Bradly, Pennsylvania, USA) und PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA) benutzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mutagenese und Isolierung des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae*

Die gezielte Mutagenese des 20S-Proteasoms aus Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) wurde zusammen mit Dr. W. Heinemeyer (Arbeitsgruppe Prof. Wolf, Universität Stuttgart) durchgeführt. Die Mutagenese und Isolierung der Proteine erfolgte nach bereits bestehenden Reinigungsprotokollen (Groll, 1995; Heinemeyer *et al.*, 1997) mit wenigen Veränderungen (siehe Materialien & Methoden).

### 4.2 Kristallisation

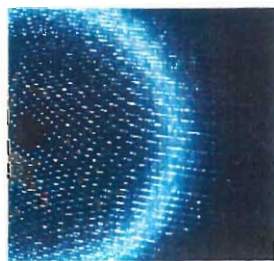
Zu Beginn wurde versucht, bestehende Kristallisationsbedingungen des 20S-Proteasoms aus Hefe (Groll, 1995) durch Zugabe verschiedener elektrostatischer *Crosslinker* (Cudney *et al.*, 1994) zu verbessern. Es zeigte sich, daß eine Reihe von Diolen das Kristallwachstum beschleunigten, jedoch die Zelldimensionen sowie die Qualität der Kristalle nicht änderten (Die c-Achse betrug weiterhin 1944Å bei einer Auflösung von 4.5 Å). Der entscheidende Durchbruch gelang erst mit einem erweiterten *sparse matrix screening* (Jancaric & Kim, 1991), welcher unter einer Bedingung stark verwachsene Nadeln lieferte. Die gefundene Kristallisationsbedingung wurde in Bezug auf Proteinkonzentration, pH-Wert, Salzkonzentration, Lösungsmittel und Tropfenzusammensetzung optimiert und lieferte folgenden Kristallisationspuffer:

<i>Kristallisationspuffer:</i>	100mM	Morpholinoethansulfonsäure
	32mM	Magnesiumchlorid
	11.5 %	2,4-Methyl-pentandiol
	pH 6.8 (eingestellt mit NaOH)	

Große Kristalle wurden nur bei 20S-Proteasom-Konzentrationen von 35-40mg/ml in 20mM Tris/HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.02% NaN<sub>3</sub> und einem Tropfenverhältnis von 4µl Protein und 2µl Reservoirlösung mit dem *hanging drop*-Verfahren erhalten (siehe Abb. 9). Die Raumgruppe unterschied sich von der ursprünglich gefundenen (Groll, 1995). Identische Kristallisationsbedingungen ergaben sich auch für alle verwendeten 20S-Proteasom-Mutanten. Die Kristallgrößen betragen im Durchschnitt etwa 0.8\*0.5\*0.5mm<sup>3</sup>. Alternativ wurde in Cokristallisationsansätzen die Präzipitanzlösung mit Inhibitorkonzentrationen bis zu 5mM versetzt.



**Abb. 9:**  
Aufnahme eines Kristalls des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae*.



**Abb. 10:**  
Diffraktionsbild eines 20S-Proteasomkristalls. Aufgenommen mit einem *Imageplate* Detektor an der *Beamline* BW6. Auflösung am Detektorrand 2.2Å. Plattendurchmesser 345mm, Detektorabstand 225mm, Drehwinkel 0.7°,  $\lambda=1.1\text{Å}$ .

### 4.3 Röntgenstrukturanalyse

#### 4.3.1 Datensammlung

Die nativen 20S-Proteasom-Datensätze wurden an der *Beamline* BW6 der MPG-Außenstelle am Deutschen Elektronensynchrotron, Hamburg gemessen. Die Kristalle wurden in einem stabilen Erntepuffer (Kristallisationspuffer mit 25% 2,4-Methyl-pentandiol) aufgenommen und bei 90K im Stickstoffstrom schockgefroren (Oxford-Cryosystem). Datensätze von mutierten oder mit Inhibitor kokristallisierten 20S-Proteasomen beugten bis zu einer maximalen Auflösung von 1.9Å (siehe Abb. 10). Die Bestimmung der Raumgruppe erfolgte mit dem Programm REFIX, und die Zellparameter wurden mit MOSFLM verfeinert. Die Statistik der Datensätze ist in Tabelle IV zusammengefaßt. Über eine systematische Auslöschung in der 001-Serie wurde die Raumgruppe  $P_2$  ermittelt.

Tabelle IV: Statistik der Datensammlung

Datensatz	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Max. Auflösung (Å)	2.4	2.8	2.5	2.9	2.2	2.7	2.6	2.3	2.7	1.9
Unabhängige Reflexe (*1000)	411	254	347	223	456	274	279	377	271	752
Multiplizität	2.8	2.7	2.5	2.2	2.6	2.6	2.8	2.9	2.8	2.8
Vollständigkeit (%)	96.5	87.3	96.1	85.4	85.1	95.8	84.2	92.5	90.5	94.8
$R_{\text{int}}^1$ (%)	9.71	14.2	6.4	13.3	7.9	12.1	9.9	9.6	9.3	9.5
Zellparameter										
a (Å)	135.7	135.7	134.7	134.5	136.0	136.7	135.6	134.3	135.2	135.5
b (Å)	301.8	302.3	300.5	300.9	300.6	300.6	300.3	300.1	301.7	300.7
c (Å)	144.7	146.0	144.2	144.7	144.6	145.2	143.7	143.8	144.7	144.2
$\beta$	112.6	111.5	112.9	112.8	113.1	113.3	112.7	112.5	112.9	112.9

$R_{\text{int}}^1 = \frac{\sum |I_i - \langle I \rangle|}{\sum I_i}$ , wobei  $I_i$  die gemessene Intensität und  $\langle I \rangle$  die mittlere Intensität aus darstellt.

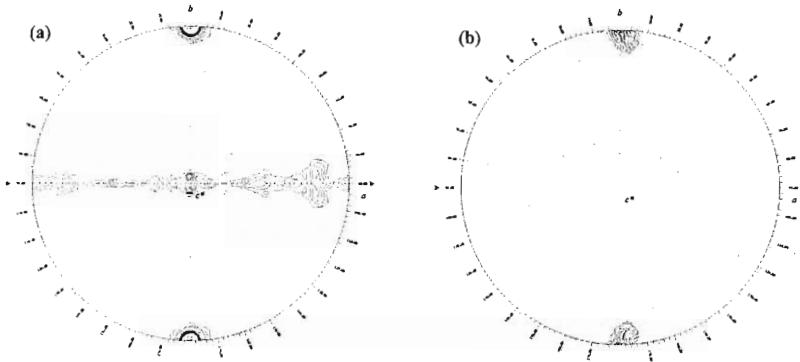
A=wt+lact, B=wt+cal, C=wt+mal, D= $\beta$ 1 $\Delta$ 89-93, E= $\beta$ 1T1A, F= $\beta$ 2T1A, G= $\beta$ 5K33A,

H= $\beta$ 6G1T/A129S/A130G/H166D/V169S, I= $\beta$ 1T1A $\beta$ 2T1A, J= $\beta$ 1T1A $\beta$ 5K33R.

wt=wild typ, lact=Lactacystin, cal=calpain Inhibitor I, mal=maleninimide- $\beta$ Ala-Val-Arg-CHO-Inhibitor.

### 4.3.2 Selbstrotationsfunktion

Eine Selbstrotation bei 5 Å (siehe Abb. 11) zeigte neben der kristallographisch-zweizähligen zusätzlich nichtkristallographische zwei- und schwach konturierte siebenzählige Achsen.



**Abb. 11:** Native Selbstrotationsfunktionen. (a) Zweizählige Korrelation in Polarwinkeln ( $\kappa=180^\circ$ ). (b) Siebenzählige Korrelation in Polarwinkeln ( $\kappa=51.4^\circ$ ).

### 4.3.3 Pattersonsuche mit dem 20S-Proteasom aus *T. acidophilum*

Für die Rotations- und Translationssuche des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae* wurde als Suchmodell das 20S-Proteasom aus *T. acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995) benützt. Es wurde die in CCP4 implementierte Version von AMoRe angewendet. 28 deutlich abgesetzte Lösungen in Bezug auf Rotations- und Translationssuche konnten mit der Raumgruppe  $P2_1$  erzielt werden (Korrelation: 0.069 zu 0.039 in der Rotations- und 0.229 zu 0.147 in der Translationssuche). Mit Hilfe der Translationssuche konnte die Raumgruppe  $P2_1$  endgültig festgelegt werden, da nur eine eindeutige Kristallpackung zulässig ist. Eine Translationssuche in  $P2$  ergab mit 0.203 eine schlechtere Korrelation.

### 4.3.4 Verfeinerung und Modellbau

Zuerst wurden die Atompositionen mit dem Gradientenverfahren, implementiert in dem Programm X-PLOR (Brünger, 1992a), verfeinert. Als Ausgangsmodell wurde ein Modell des 20S-Proteasoms aus *T. acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995) verwendet, in dem mit Ausnahme weniger konservierter Aminosäuren in der  $\alpha$ -Untereinheit alle Reste durch Ala ersetzt worden waren. Die Lösung der Rotations- und Translationssuche ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0.32 und einen R-Faktor von 57.7% und hob sich signifikant von weiteren Lösungen ab. Basierend auf diesem

positionierten Modell wurde eine  $2F_0 - F_c$ -Elektronendichtekarte berechnet, entsprechend der zweizähligen nichtkristallographischen Achse gemittelt ( $\varphi=85.1$ ,  $\phi=90.8$ ,  $\kappa=180.1$ ) und nach Rücktransformation neu erstellt. Nach zehnfacher zyklischer Mittelung war die Qualität der Elektronendichte zufriedenstellend ( $R_{\text{red}}=27.3\%$ ) und zeigte einen geringfügigen Einfluß des noch unvollständigen Modells. Die individuellen Untereinheiten wurden identifiziert und in die Elektronendichte eingepasst, wobei charakteristische Primärstrukturelemente zu Hilfe genommen wurden. Im finalen Stadium der Verfeinerungen wurde dem anisotropen Streuen der Kristalle durch Einführen anisotroper Temperaturfaktoren Rechnung getragen und eine Solvenskorrektur durchgeführt. Die Modelle wurden in aufeinanderfolgenden Modelleinpassungen und Verfeinerungen mit 18 Magnesiumionen, 1800 Wassermolekülen, im Falle der Mutanten mit den partiell prozessierten Propeptiden und im Falle von Komplexen mit den Inhibitoren fertiggestellt.

Die entgeltigen R-Faktoren waren zufriedenstellend und die Standard-Geometrie der Bindungslängen, Bindungswinkel und der lokalen Symmetrie gut erfüllt (siehe Tabelle V). Der erhöhte kristallographische R-Faktor ist auf die anisotrope kristalline Ordnung (Verschlechterung der Datenqualität) und auf den eingeschränkten Einbau der Wassermoleküle zurückzuführen.

Tabelle V: Statistik der Verfeinerung

Datensatz	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
R-Faktor (%)	23.0	26.0	24.4	26.1	26	25.4	25.2	25.8	27.1	23.4
Freier R-Faktor (%)	30.9	33.3	29.2	33.2	31	30.3	31.7	30.4	33.2	28.9
RMS-Abweichung:										
Bindungslängen (Å)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Bindungswinkel (°)	1.8	1.8	1.4	1.6	1.9	1.8	1.5	2.0	1.5	1.8

es wurden lediglich Reflexe mit  $|F| > 2\sigma|F|$

A=wt+lact, B=wt+cal, C=wt+mal, D= $\beta$ 1 $\Delta$ 89-93, E= $\beta$ 1T1A, F= $\beta$ 2T1A, G= $\beta$ 5K33A,

H= $\beta$ 6G1T/A129S/A130G/H166D/V169S, I= $\beta$ 1T1A $\beta$ 2T1A, J= $\beta$ 1T1A $\beta$ 5K33R.

wt=wild typ, lact=Lactacystin, cal=calpain Inhibitor I, mal=maleninimide- $\beta$ Ala-Val-Arg-CHO-Inhibitor.

Die Koordinaten der nativen und mutierten 20S-Kristallformen und der Komplexe mit Inhibitoren wurden bei der Protein-Datenbank in Brookhaven hinterlegt (1RYP).



## 4.4 Die Struktur des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae*

### 4.4.1 Struktur der Untereinheiten

Das 20S-Proteasom aus Hefe setzt sich aus vierzehn verschiedenen Untereinheiten zusammen, die in sieben  $\alpha$ - und sieben  $\beta$ -Gruppen eingeteilt werden (siehe Tabelle VI). Die Nummerierung erfolgte analog einem Sequenzalignment mit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aus *T. acidophilum* (siehe Abb. 12a und 12c).

Tabelle VI: Nomenklatur der 20S-Proteasomuntereinheiten.

Eigene Nomenklatur	Systematischer Name	Traditioneller Name <i>S. cerevisiae</i>	Traditioneller Name <i>H. sapiens</i>	Strukturell definierte Aminosäuren
G	$\alpha 1_{sc}$	C7/Prs2	Iota	Gly6-Asp240
A	$\alpha 2_{sc}$	Y7	C3	Thr5-Leu236
B	$\alpha 3_{sc}$	Y13	C9	Gly4-Gly237
C	$\alpha 4_{sc}$	Pre6	C6	Tyr8-Gln244
D	$\alpha 5_{sc}$	Pup2	Zeta	Arg10-Glu243
E	$\alpha 6_{sc}$	Pre5	C2	Phe4-Ile233
F	$\alpha 7_{sc}$	C1/Prs1	C8	Gly5-Asn241
N	$\beta 1_{sc}$	Pre3	Y/delta	Thr1-Leu196
	$\beta 1_{hs}$	-	LMP2	-
H	$\beta 2_{sc}$	Pup1	Z	Thr1-Cys221
	$\beta 2_{hs}$	-	MECL1	-
I	$\beta 3_{sc}$	Pup3	C10	Ser-8-Asp193
J	$\beta 4_{sc}$	C11/Pre1	C7	Met-1-Gln192
K	$\beta 5_{sc}$	Pre2	X/MB1	Thr1-Gly211
	$\beta 5_{hs}$	-	LMP7	-
L	$\beta 6_{sc}$	C5/Prs3	C5	Gln-9-Asp193
M	$\beta 7_{sc}$	Pre4	N3/ $\beta$	Thr-8-Ile211

i steht für die austauschbaren Untereinheiten im *immuno*-Proteasom, sc für *S. cerevisiae*, hs für *H. sapiens*.

Die  $\beta$ -ähnlichen Untereinheiten werden als Proteine mit Propeptiden (besitzen in der Nummerierung negative Zahlenwerte) synthetisiert, die während der Assemblierung des 20S-Proteasoms proteolytisch prozessiert werden. Die Precursor  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  werden unter Freisetzung des katalytisch aktiven Thr1 zwischen Gly-1 und Thr1 gespalten und vollständig prozessiert. N-terminale Sequenzierung von  $\beta 6$  und  $\beta 7$  zeigt, daß diese stabile teilprozessierte Intermediate bilden und Schnittstellen zwischen Asn-9 und Thr-8 bzw. zwischen His-10 und Gln-9 besitzen.  $\beta 3$  und  $\beta 4$  werden posttranslational nicht modifiziert.

Alle vierzehn verschiedenen Untereinheiten nehmen in der Struktur des Moleküls definierte Positionen ein. Sie sind mit Ausnahme weniger Insertionssegmente und Kettenenden in der Elektronendichte vollständig repräsentiert (siehe Tabelle VI). Die sieben  $\alpha$ - und  $\beta$ -ähnlichen Polypeptide haben die für Ntn-Hydrolasen typische Faltung. Analog der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aus *T. acidophilum* besitzen sie je zwei fünfsträngige antiparallele  $\beta$ -Faltblätter mit der Topologie

S8, S1, S2, S9 und S10 im oberen und S7, S6, S5, S4 und S3 im unteren. Die Faltblätter werden von den Helices H3, H4 und H5 bzw. von den Helices H1 und H2 flankiert. Unterschiede zwischen den einzelnen Untereinheiten treten in bis zu zwei Aminosäureresten verlängerten *turns*, langen Insertionen mit Sekundärstrukturelementen und den N- bzw. C-terminalen Regionen auf (siehe Abb. 12).

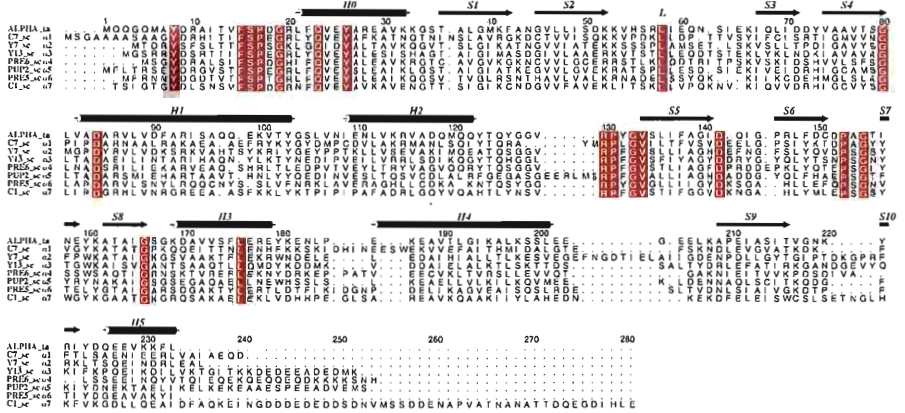


Abb.12 a) Sequenzalignment der einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten aus Hefe und *T. acidophilum*. Konservierte Aminosäuren sind rot eingefärbt,  $\beta$ -Stränge und Helices in Pfeil- und Zylinderform dargestellt.

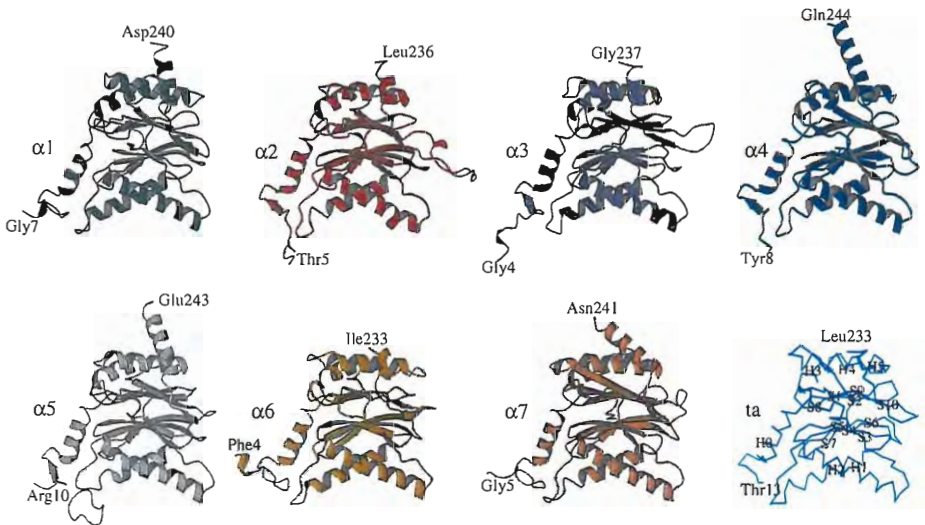


Abb. 12b) Ribbonplot der einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten aus Hefe und *T. acidophilum* (hellblau).

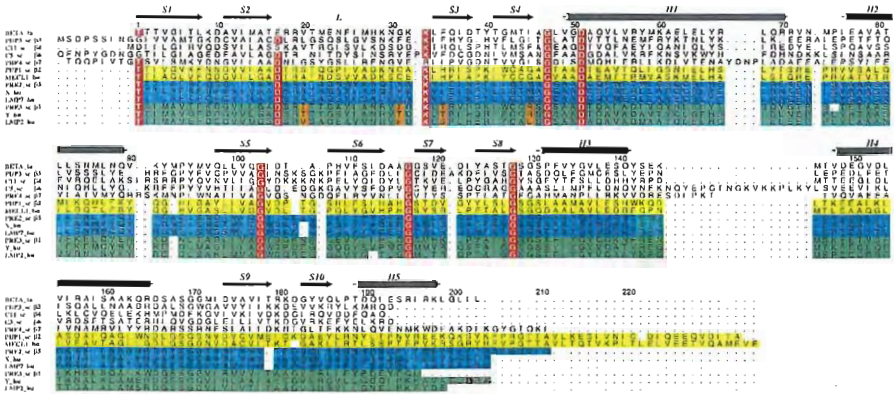


Abb. 12c) Sequenzalignment der einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten aus Hefe und *T. acidophilum*. Für  $\beta 1$  (grün),  $\beta 2$  (gelb) und  $\beta 5$  (blau) sind zusätzlich die humanen Untereinheiten mit den entsprechenden  $\gamma$ -Interferon-induzierbaren Austauschkomponenten dargestellt. Konservative Aminosäuren sind rot eingefärbt,  $\beta$ -Stränge und Helices in Pfeil- und Zylinderform dargestellt. Die Aminosäuren 20, 31, 35 und 45 für  $\beta 1$  sind als spezifische Reste der S1-Tasche orange eingefärbt und werden unter 4.4.5 behandelt.

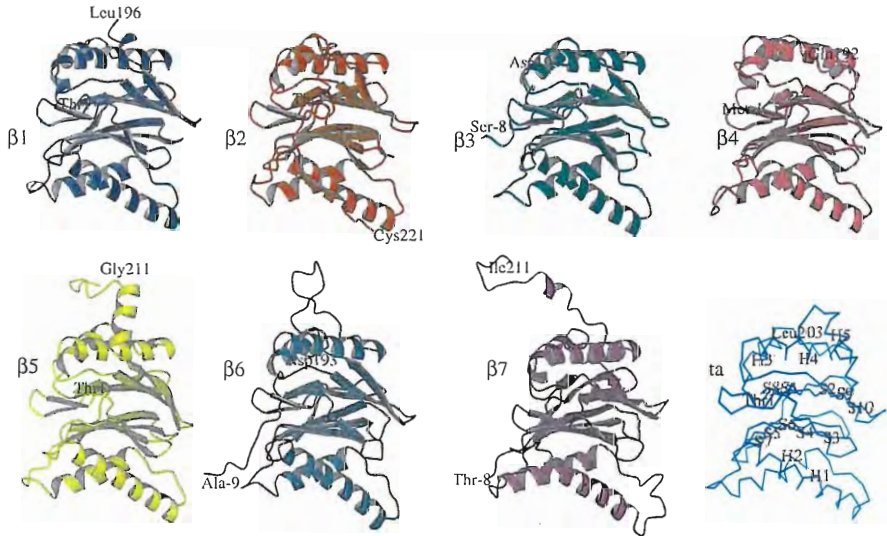


Abb. 12d) Ribbonplot der einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten aus Hefe und *T. acidophilum* (hellblau).

Die  $\alpha 2$ -Untereinheit hat eine lange Insertionsschleife, bestehend aus einer kurzen  $\alpha$ -Helix und zwei  $\beta$ -Strängen zwischen S9 und S10.  $\alpha 4$  und  $\alpha 6$  besitzen längere Helices H3 und H4. Bei  $\alpha 1$  ist die Helix H5 um zwei Windungen verlängert. Die Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 7$  weisen eine längere C-terminale Helix H5 auf, die jeweils aus der Proteinoberfläche in die Lösung hervorsteht. Die negativ geladenen C-terminalen Segmente sind unstrukturiert (bis zu 10 Aminosäuren). Bei den  $\beta$ -Untereinheiten mit langen Insertionen zeigt  $\beta 7$  eine Schleife zwischen den Helices H1 und H2 und eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix mit zwei Windungen bei Aminosäure 145.  $\beta 6$  hat eine Insertion von 17 Aminosäuren zwischen H3 und H4 mit einem komplexen  $\beta$ -Strang und einer kurzen Helix.  $\beta 2$  besitzt eine lange C-terminale Expansion, die in den letzten 11 Aminosäuren fehlgeordnet ist. In  $\beta 3$  und  $\beta 6$  sind die C-Termini stark verkürzt, so daß Helix H5 nicht mehr existiert und das  $\beta$ -Faltblatt durch eine Verlängerung von S10 vergrößert ist.  $\beta 4$  besitzt im Vergleich zum *T. acidophilum* Modell eine um zwei Windungen verkleinerte Helix H5. Viele dieser Untereinheiten-spezifischen Wendepunkte, Insertionen sowie N- und C-Termini sind an Kontakten zwischen Untereinheiten beteiligt, wie im folgenden beschrieben wird. Abb. 13 zeigt eine Überlagerung der sieben  $\alpha$ - und sieben  $\beta$ -Untereinheiten aus Hefe mit den *T. acidophilum*-Homologen und deutet auf die große Ähnlichkeit der Sekundärstruktur der proteasomalen Bauelemente hin.

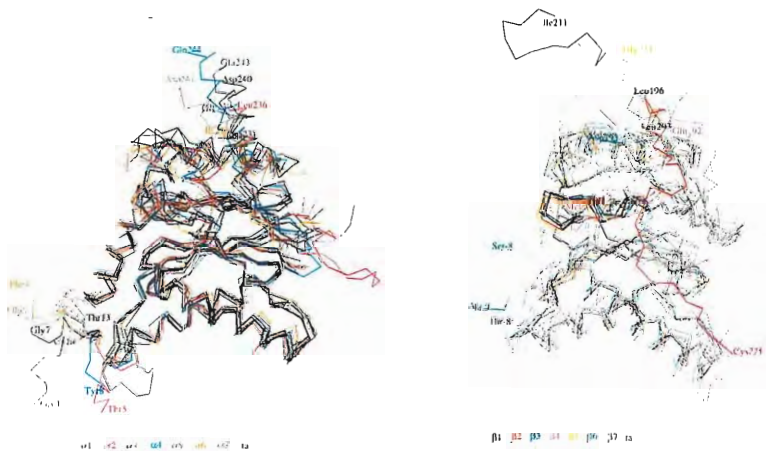


Abb 13: Überlagerung der  $C_{\alpha}$ -Atome der sieben  $\alpha$ - und sieben  $\beta$ -Untereinheiten von Hefe mit *T. acidophilum*.

#### 4.4.2 Der 20S-Proteasomkomplex

Die Quartärstruktur des 20S-Hefeproteasoms ist der des Komplexes aus *T. acidophilum* analog. Es handelt sich ebenfalls um ein zylinderförmiges Partikel (148Å x 113Å) mit drei großen Kavitäten. Die beiden äußeren Kammern werden von den heptameren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringen gebildet, während die mittlere Kammer, in der die Proteolyse der Substrate stattfindet, von den inneren Wänden der  $\beta$ -Ringe eingegrenzt wird (siehe Abb. 14).

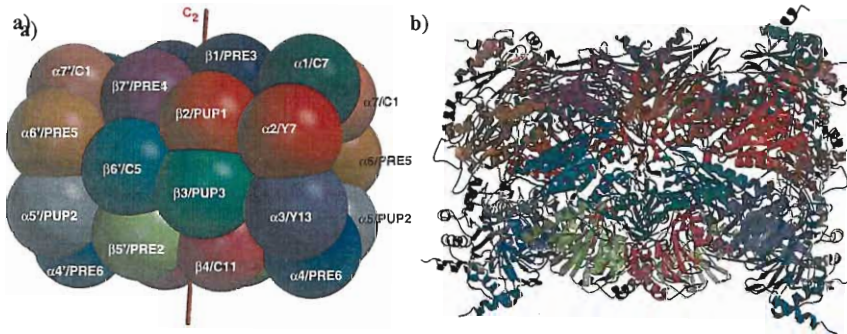


Abb. 14: Topologie der 28 Untereinheiten im 20S-Proteasom aus Hefe. a) Kugelmodell, b) Ribbonplot.

Jede der sieben  $\alpha$ -Untereinheiten besitzt zwei Nachbarn innerhalb des heptameren Rings mit  $\alpha$ -cis- $\alpha$ -Kontakten und zwei benachbarte  $\beta$ -Untereinheiten im angrenzenden  $\beta$ -Ring mit  $\alpha$ -trans- $\beta$ -Wechselwirkungen. Die  $\alpha$ -cis-Interaktionen sind zwischen den N-terminalen Schleifensegmenten, der Helix H0 (Aminosäure 20-30), der Schleife L, der Schleife zwischen Helix H2 und den  $\beta$ -Faltblattsträngen S5 und S7 (siehe Abb. 15).

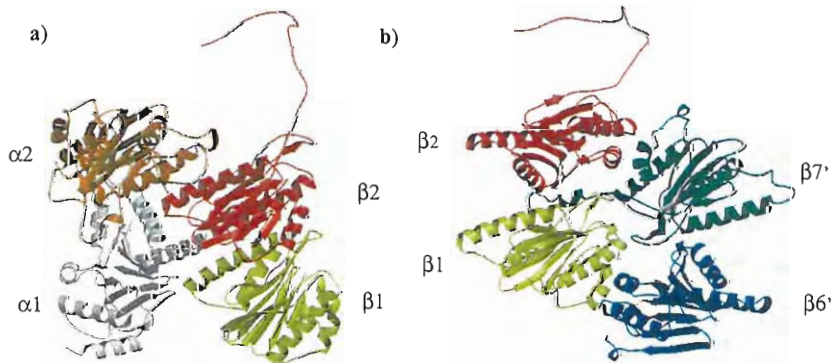


Abb. 15: Ribbonplot der Untereinheiten: a)  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  mit  $\beta 1$  und  $\beta 2$  bzw. b)  $\beta 1$  und  $\beta 2$  mit  $\beta 7'$  und  $\beta 6'$ .

Die Kontakte zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringen werden hauptsächlich von den Helices H1 und H2 in beiden Untereinheiten ausgebildet. Die zentral lokalisierten  $\beta$ -Untereinheiten haben zusätzlich zu den  $\beta$ -cis- $\beta$ - und  $\beta$ -trans- $\alpha$ -Wechselwirkungen zwei in Nachbarschaft liegende  $\beta'$ -Untereinheiten im gegenüberliegenden Ring mit  $\beta$ -trans- $\beta'$ -Kontakten. Die  $\beta$ -cis-Kontakte sind weniger stark ausgeprägt als die  $\alpha$ -cis-Kontakte und umfassen die Schleife L, das N-terminale Ende der Helix H1, den  $\beta$ -Faltblattstrang S7 und den *turn* zwischen den  $\beta$ -Faltblattstrang S8 und Helix H3. Die Wechselwirkungen zwischen den beiden  $\beta$ -Ringen werden im wesentlichen von H3, H4, der Schleife zwischen H4 und S9 sowie von der Schleife zwischen S2 und S3 hergestellt. Diese Interaktionen besitzt ebenfalls der D7-symmetrische Vorläufer, das 'Urproteasom' aus *T. acidophilum*. Trotz der konservierten Bauart sind diese Wechselwirkungen aufgrund ihrer spezifischen Aminosäuresequenzen im 20S-Hefeproteasom für die jeweiligen Untereinheiten einzigartig.

Charakteristisch für 20S-Proteasomen in Hefe und anderen Eukaryonten sind zusätzliche Wechselwirkungen, die durch Sequenzen, Sequenzinsertionen und variable N- bzw. C-Termini geknüpft werden und in *T. acidophilum* nicht vorhanden sind. So existieren im Zentrum der heptameren  $\alpha$ -Ringe starke  $\alpha$ -cis-Kontakte zwischen den verschlungenen N-terminalen Segmenten von  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 7$ . Das in allen  $\alpha$ -Untereinheiten konservierte Tyr8 spielt hierbei eine zentrale Rolle. Intensive Wasserstoffbrückenbindungen zwischen  $\alpha 5$ -Asp9- $\alpha 4$ -Arg10,  $\alpha 5$ -Glu12b- $\alpha 3$ -Arg6,  $\alpha 6$ Asp11- $\alpha 2$ -Arg6,  $\alpha 3$ -Asp9- $\alpha 4$ -Arg10,  $\alpha 4$ -Asp9- $\alpha 2$ -Arg7 und  $\alpha 6$ -Glu11- $\alpha 3$ -Arg6 sorgen einerseits für eine Stabilisierung, andererseits für eine definierte Anordnung der Untereinheiten im  $\alpha$ -Ring (siehe Abb. 16a).

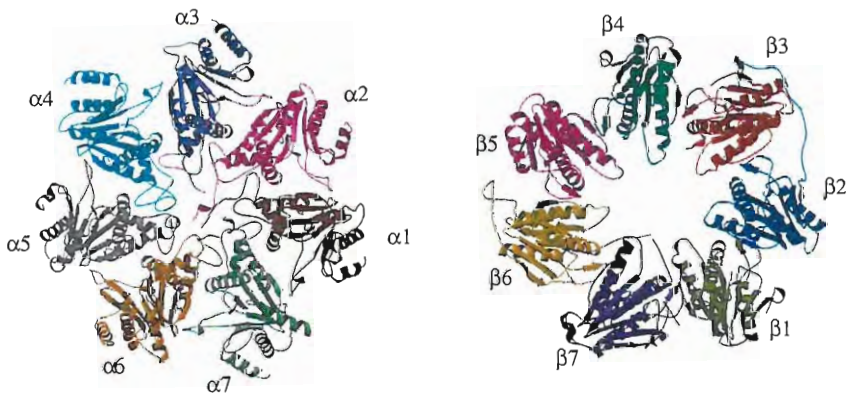


Abb. 16: Ribbonplot der unterschiedlichen Ringsysteme: a)  $\alpha$ -Ring und b)  $\beta$ -Ring.

Innerhalb der  $\beta$ -Ringe existiert ein sehr spezifischer Kontakt zwischen  $\beta 2$  und  $\beta 3$ . Der lange C-Terminus von  $\beta 2$  umfaßt hierbei  $\beta 3$  und besitzt zusätzliche Wechselwirkungen zum übernächsten Nachbarn  $\beta 4$ . Die  $\beta$ -trans- $\alpha$ -Kontakte erfolgen durch die Helix H1-Schleife-Helix H2 Motive (siehe Abb. 16b). In  $\beta 7$  begünstigt die Insertion bei Aminosäure 66 dessen Assoziierung mit  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$ . In ähnlicher Weise bindet die lange Insertion in  $\alpha 2$  bei Aminosäure 210 zwischen den Strängen S9 und S10 an  $\beta 2$  und koppelt dieses Paar. Spezifische  $\beta$ -trans- $\beta$ -Wechselwirkungen werden durch den C-Terminus von  $\beta 7$  gebildet, der zwischen  $\beta 2$  und  $\beta 1'$  eingelagert ist. Das C-terminale Segment von  $\beta 5$  wechselwirkt mit  $\beta 3$  und  $\beta 4$  auf ähnliche Weise. Die lange Insertion von  $\beta 6$  an der Aminosäure 145 kontaktiert die Untereinheit  $\beta 3'$  und den C-Terminus von  $\beta 2'$  (siehe Abb. 17).

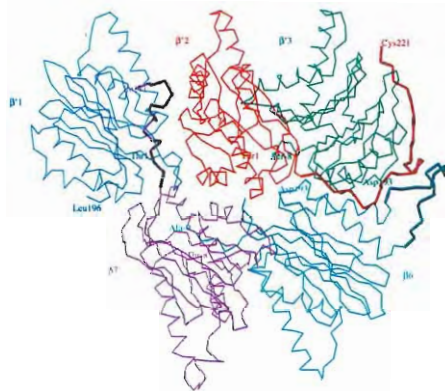


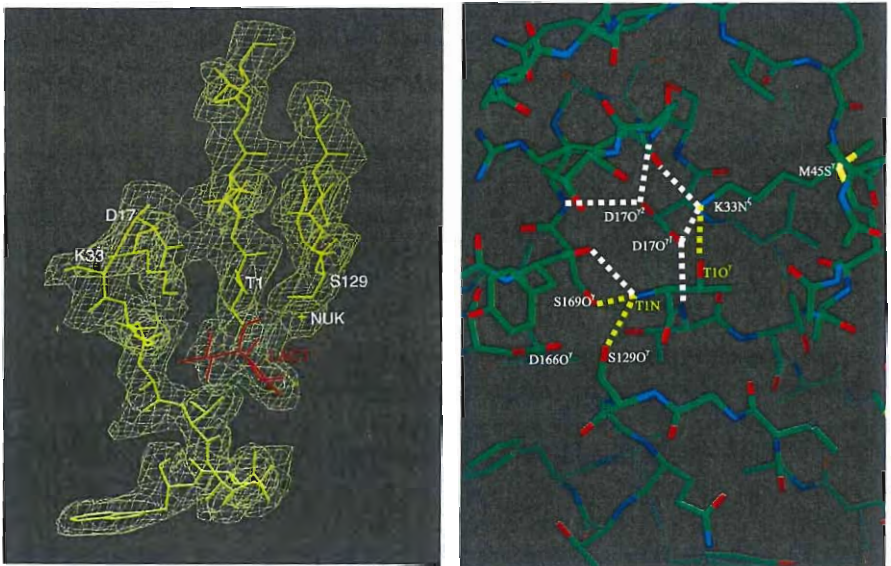
Abb. 17:  
C<sub>α</sub>-Ketten der Untereinheiten  
 $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 1'$ ,  $\beta 2'$  und  $\beta 3'$ .

Im 20S-Proteasommolekül wurden 18 Magnesiumpositionen anhand starker Elektronendichten identifiziert, von denen 12 auf den Innenwänden der  $\beta$ - $\beta$ -Kammer lokalisiert sind. Es ist erkennbar, daß die Vielzahl an Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten die spezifische und eindeutige Position der Ionen innerhalb des 20S-Proteasoms bestimmen. Besonders charakteristische  $\beta$ -trans- $\beta'$ -Wechselwirkungen werden durch die Magnesiumionen Y8 und Y9 vermittelt: Y8 verbrückt das Hauptgruppencarboxylat von Asp193 aus  $\beta 6$  mit der Schleife 162 bis 167 von  $\beta 2'$ . Auf analoge Weise fixiert das Magnesiumion Y9 die Untereinheit  $\beta 3$  über Asp193 mit  $\beta 5'$ . Darüberhinaus sind die Carboxylatgruppen Liganden für andere Magnesiumionen, die in den Schleifen 165 von  $\beta 4$  (Magnesiumion W6) bzw.  $\beta 6$  (Magnesiumion W4) lokalisiert sind und eine Rolle in der Stabilisierung der Untereinheitenstruktur spielen können. Die Asp-Reste sind hierbei vollständig verdeckt und ihre Seitengruppen verstärken zusätzlich die  $\beta$ -trans- $\beta$ -Kontakte durch Ladungs-Ladungs-Wechselwirkungen mit Arg19 von  $\beta 2'$  bzw. Arg19 von  $\beta 5'$ .

Die Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 4$  liegen an der einzigen Moleküldiade des 20S-Hefeproteasoms und sind dem dominanten  $\beta$ -trans- $\beta'$ -Kontakt der Aminosäuren 133-137 der Helix H3 von *T. acidophilum* ähnlich.

#### 4.4.3 Die N-terminale Thr-Position

Struktur- und Mutageneseuntersuchungen im *T. acidophilum*-Proteasom definierten ein katalytisches System mit Thr1, Glu17 und Lys33 (Löwe et al., 1995; Seemüller et al., 1995). Die Aminosäuren Ser129, Ser169 und Asp166 befinden sich in der Nähe von Thr1. Sie sind für die strukturelle Integrität dieses Zentrums erforderlich. So zeigen Punktmutationen von Asp166, daß diese Aminosäure essentiell ist und eventuell auch an der Katalyse beteiligt sein könnte. Im 20S-Hefeproteasom sind die Aminosäuren Thr1, Asp17, Lys33, Ser129, Asp166 und Ser169 in den aktiven Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  invariant. Zusätzlich wurde ein vollständig gebundenes Lösungsmittelmolekül in allen drei Untereinheiten nahe bei Thr1O $\gamma$  und N, Ser129O $\gamma$  und N sowie Gly47N gefunden, wie exemplarisch für  $\beta 5$  im Komplex mit dem Inhibitor Lactacystin gezeigt ist (Abb. 18a, siehe 4.4.5).

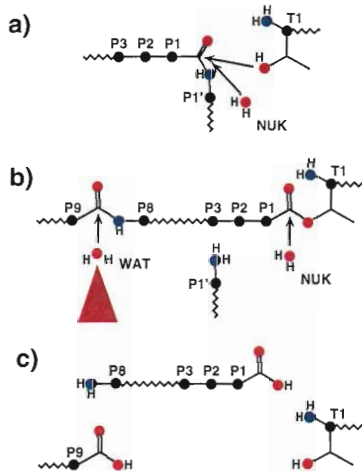


**Abb. 18a)** Strukturmodell und Elektronendichte der Untereinheit  $\beta 5$  im Komplex mit dem Inhibitor Lactacystin. **b)** Strukturmodell und Aktivierungsmechanismus des N-terminalen Threonins der aktiven Untereinheiten, hier exemplarisch dargestellt in  $\beta 5$ .

Bei der geringeren Auflösung im Strukturmodell von *T. acidophilum* konnten solche Lösungsmittelmoleküle nicht erkannt werden, anders bei der Penicillin Acylase, einem Mitglied der Ntn-Hydrolase-Familie (Duggleby et al., 1995). Das Thr1N bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu Asp168O, Ser169O $\gamma$  und Ser129O $\gamma$ ; Thr1O $\gamma$  zu Lys33. Asp17 erzeugt Wasserstoffbrücken über O $\gamma$  zu Arg19N und Gly170N und über O $\delta$  zu Thr/Ser2N und Lys33N $\epsilon$ . In ähnlicher Weise



bildet Lys33N<sup>e</sup> drei Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp17O<sup>2-</sup>, Arg19O und Thr1O<sup>γ</sup> (Abb. 18b). Der pKa-Wert und die Protonierung der relevanten ionisierbaren funktionellen Seitengruppen sind unbekannt, aber das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen läßt vermuten, daß sowohl Asp17 als auch Lys33 geladen sind. Die positive Ladung von Lys33 würde den intrinsischen pKa-Wert der Thr1O<sup>γ</sup>, der Thr1N-Gruppe und des Wassermoleküls, bezeichnet als NUK, verschieben und deren Nukleophilie verstärken. Thr1O<sup>γ</sup> reagiert daher mit den elektrophilen funktionellen Gruppen von Substraten und Inhibitoren während Thr1N höchstwahrscheinlich den Protonenakzeptor darstellt. Dies wird durch die Struktur des Lactacystinkomplexes bestätigt, in dem eine Esterbildung zwischen Lactacystin und Thr1 als Ergebnis einer  $\beta$ -Lactonringöffnung nach einem nukleophilen Angriff durch Thr1O<sup>γ</sup> zu beobachten ist. Thr1N nimmt eine exzellente Position ein, um als Protonenshuttle von Thr1O<sup>γ</sup> zum Lactacystin-O6 zu dienen. Eine analoge Reaktionssequenz wird auch für die Hydrolyse von chromogenen Substraten vorgeschlagen, wobei der Protonentransfer vom Amidstickstoff der Abgangsgruppe zum Nukleophil erfolgt. Das dabei erzeugte Acyl-Enzym wird, wie in Abb. 19a-c gezeigt, durch das Wasser NUK deacyliert. Alternativ oder parallel könnte ein Angriff von NUK auf die Peptidbindung erfolgen, wobei das Intermediat umgangen wird.



**Abb. 19:** Mechanismus der Hydrolyse von Substraten am N-terminalen Thr1.

#### 4.4.4 Mutagenesestudien am katalytisch aktiven Zentrum

Mit der Freisetzung von Thr1 entsteht in den Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  das katalytisch aktive Zentrum. Die Autolyse der Aminosäure in Position eins findet nicht statt, wenn die katalytische Umgebung variiert, wie in  $\beta 3$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 6$ , denen Thr1 fehlt, sowie  $\beta 7$ , bei dem in Position 33 Lys gegen Arg und in Position 129 Ser gegen Phe ausgetauscht ist. In  $\beta 7$  wird die Thr1-Seitengruppe von dem sterisch anspruchsvolleren Arg33, welches das Lys ersetzt, weggedrückt, so daß keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Aminosäuren mehr stattfinden. Ferner ist das Phe129 in  $\beta 7$  durch die hydrophobe Seitengruppe vom Asp166 abgedreht und es existiert auch keine nukleophile Aktivierung des für das proteolytische Zentrum notwendigen Wassermoleküls.

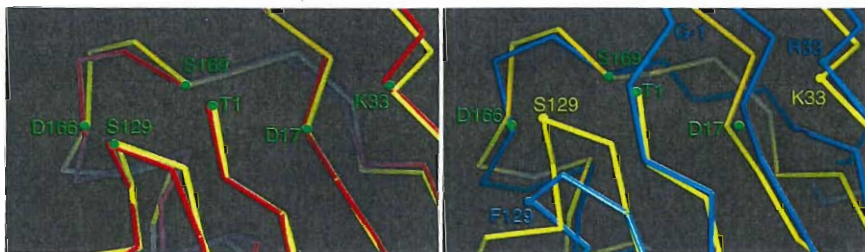


Abb. 20: Strukturausschnitt der  $C_{\alpha}$ -Überlagerung von  $\beta 1$  (gelb) mit  $\beta 2$  (rot) (a) und  $\beta 1$  (gelb) mit  $\beta 7$  (grün) (b).

Mit Mutagenese in  $\beta 7$  von Arg33 zu Lys und Phe 129 zu Ser konnte für die Untereinheit keine Aktivierung und Autoprozessierung festgestellt werden, da sich die Konformation von denjenigen der aktiven Untereinheiten unterscheidet (siehe Abb. 20). Umgekehrt lassen sich alle aktiven Untereinheiten durch Einzelmutationen in den katalytisch-notwendigen Aminosäuren beeinflussen. So führt der Austausch von Thr1 zu Ala in  $\beta 1$  und  $\beta 2$  zu deren Inaktivierung (siehe Abb. 21a und 21b). In Hefezellen ist dieser Ersatz für  $\beta 5$  letal, jedoch wird diese Untereinheit durch Mutation von Lys33 zu Ala inaktiviert und eine Autolyse vermieden (siehe Abb. 21c). Ersetzt man in  $\beta 5$  Lys33 durch Arg, so ist die Untereinheit wiederum in Bezug auf chromogene chymotryptische Testsubstrate inaktiv. Die chemische Sequenzanalyse sowie die Kristallstruktur zeigt jedoch die Abspaltung des Propeptids während der 20S-Partikelassemblierung (siehe Abb. 21d).

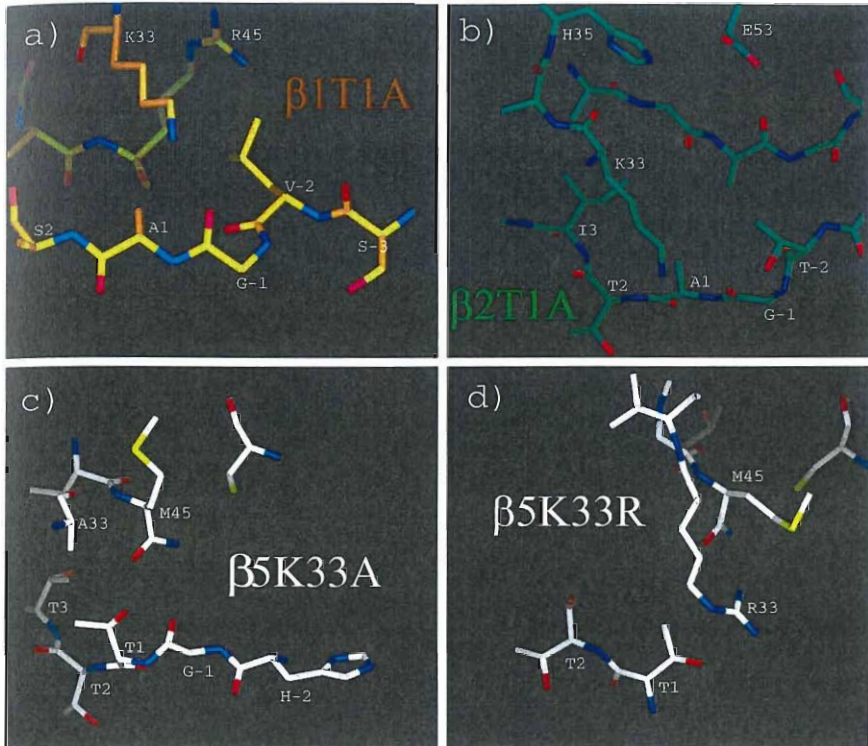


Abb. 21: Strukturausschnitt der inaktivierten  $\beta$ -Untereinheiten: a)  $\beta$ 1T1A b)  $\beta$ 2T1A c)  $\beta$ 5K33A d)  $\beta$ 5K33R.

#### 4.4.5 Inhibitorbindung und Spezifitäten der S1-Taschen

$\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 zeigen im Komplex mit dem Calpain-Inhibitor I, daß das Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal kovalent an Thr10 $\gamma$  als Hemiacetal gebunden wird. Der Inhibitor nimmt eine  $\beta$ -Konformation an und füllt die Lücke zwischen den Strängen und der Schleife L. Zwischen dem Inhibitor und den Aminosäuren 20, 21 und 47 werden Wasserstoffbrückenbindungen generiert, wodurch ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt erzeugt wird. Die Norleucinseitenkette zeigt in die S1-Spezifitäts-Tasche, die seitlich zu einem Tunnel hin offen ist, der zur Partikeloberfläche führt. Die Leu-Seitengruppe in der Position P2 interagiert nicht mit dem Protein und die Leu-Seitengruppe in der Position P3 ist in Wechselwirkung mit der benachbarten  $\beta$ -Untereinheit. Die S1-Spezifitätstasche wird hauptsächlich von folgendend Aminosäuren ausgeprägt:

Thr20, Thr31, Thr35, Arg45, Ala49 und Gln 53 in  $\beta$ 1;

Ser20, Cys31, His35, Gly45, Ala49 und Glu53 in  $\beta$ 2;

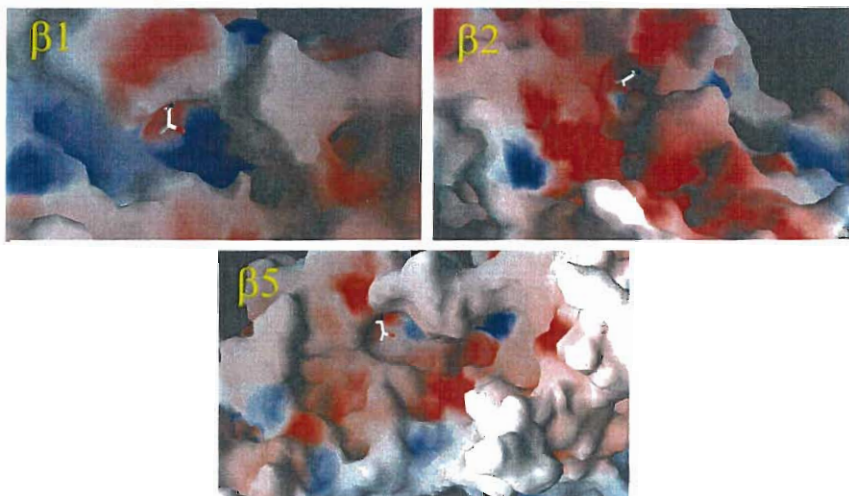
Ala20, Val31, Ile35, Met45, Ala49 und Gln53 in  $\beta$ 5.

Die Aminosäure 45 formt den Boden der S1-Tasche und scheint weitgehend ihren chemischen Charakter zu bestimmen. Benachbarte Untereinheiten in den  $\beta$ -Ringen tragen zusätzlich zu den S1-Taschen bei und modulieren deren Umgebung (siehe Abb. 22):

$\beta_2$  im Falle von  $\beta_1$  mit His114, His116, Ser118 und Asp 120.

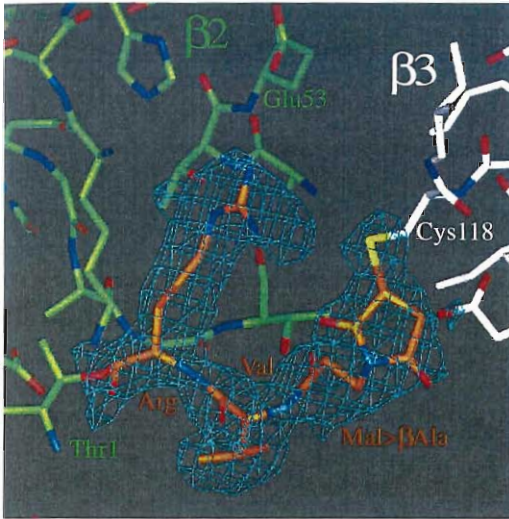
$\beta_3$  im Falle von  $\beta_2$  mit Asp114, Asp120 und Cys 118.

$\beta_6$  im Falle von  $\beta_5$  mit Ser118, Asp114, Glu120.



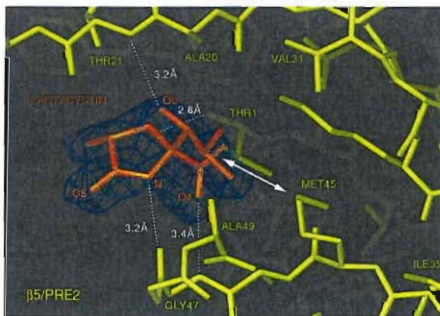
**Abb. 22:** Oberflächenmodell der Umgebung der einzelnen aktiven Untereinheiten; blau: basische Aminosäuren, rot: saure Aminosäuren und weiß: ungeladene Aminosäuren. In den Oberflächenmodellen ist jeweils das katalytisch aktive Thr1 strukturell dargestellt.

Anhand der Strukturdaten und Bindungsergebnisse des Calpain-Inhibitors I wurde ein 20S-Proteasom-spezifischer Aldehydinhibitor für nur eine aktive Untereinheit modelliert und synthetisiert. Ziel war es über die P1- und P3-Position eine Inhibitorbindung zu steuern. Als Targetuntereinheit wurde  $\beta_2$  ausgewählt, da neben den stark sauren Aminosäuren der P1-Tasche auch das  $\beta_3$ /Cys118S $\gamma$  in der P3-Tasche für eine chemische Bindung zur Verfügung steht. Als *Leadersubstanz* wurde die Verbindung Malenimid- $\beta$ Ala-Arg-CHO eingesetzt. Abb. 23 zeigt kovalente Bindungen der Aldehyd- und Malenimidgruppe des Inhibitors mit  $\beta_2$ /Thr1O $\gamma$  und  $\beta_3$ /Cys118S $\gamma$ . Die Aminosäure Arg3i des Inhibitors zeigt in die saure S1-Tasche zu  $\beta_2$ /Glu53. In den anderen aktiven Untereinheiten konnte diese Inhibitorwirkung chemisch über Aktivitätstests mit Hilfe von chromogenen Testsubstraten und röntgenkristallographisch nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 23:**  
Der spezifische Inhibitor  
Malenimid- $\beta$ Ala-Val-Arg-CHO  
komplexiert in der Untereinheit  $\beta 5$ .

Lactacystin ist ein *Streptomyces*-Metabolit, der die chymotryptische und tryptische Aktivität im 20S-Proteasom inhibiert und kovalent an  $\beta 5$  bindet. Dies steht im Einklang mit der beobachteten chemischen Modifizierung der homologen  $\beta 5$  Untereinheit des Säugerproteasoms (Fenteany *et al.*, 1995). Die Isopropylgruppe in Position C10 von Lactacystin reicht wie eine Val- oder Leu-Seitenkette in die S1-Tasche hinein. Lactacystin bildet mehrere Wasserstoffbrücken mit den Atomen der Proteinhauptkette: LactN-Gly47O, LactO4-Gly47N, LactO9-Thr21N und LactO6-Thr1N. Da diese zuletzt genannten Wechselwirkungen auch in  $\beta 1$  und  $\beta 2$  auftreten könnten, die keine kovalenten Komplexe mit Lactacystin bilden, ist die S1-Seitengruppe, die in die hydrophobe P1-Tasche von  $\beta 5$  bindet Schlüsselkomponente für die Ausbildung und Stabilisierung der kovalenten Bindung (siehe Abb. 24).



**Abb. 24:**  
Der spezifische Inhibitor Lactacystin  
komplexiert mit der Untereinheit  $\beta 5$ .

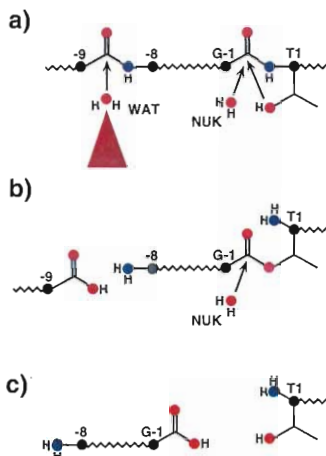
Met45 von  $\beta 5$  ist im engen Kontakt mit der verzweigten Isopropyl-Seitengruppe von Lactacystin. Im Calpain I-Inhibitor-Komplex drückt die sterisch anspruchsvollere Norleucin-Seitenkette die Met45-Seitenkette um  $2.7\text{\AA}$  in Richtung auf Ile35, wodurch die S1-Tasche geräumiger wird. Durch die Beteiligung der sauren Aminosäuren Asp114 und Glu120 von  $\beta 6$  an der S1-Tasche von  $\beta 5$ , besitzt diese ebenfalls schwach tryptische Spaltungstendenzen (siehe Abb. 22). Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, daß Lactacystin die chymotryptische Aktivität gegenüber chromogenen Substraten hemmt und die tryptische gegenüber Fluorophoren mindert. Analoge Resultate zeigen sich in 20S-Proteasom-Mutanten, deren Proform in  $\beta 5$  nicht mehr prozessiert wird (Chang & Hochstrasser *et al.*, 1996) bzw. in einer  $\beta 5\text{Ala49Val}$ -Substitution, in der die S1-Tasche deutlich verkleinert ist (Heinemeyer *et al.*, 1993).

Im Zentrum der S1-Tasche von  $\beta 1$  befindet sich in Position 45 ein Arg, das mit Glutamat gut interagieren kann. Die katalytisch aktive Untereinheit  $\beta 1$  trägt somit die Peptidyl-Glutamyl-Peptidhydrolaseaktivität (PGPH) des 20S-Proteasoms im Einklang mit ortsspezifischer Mutagenese (Heinemeyer *et al.*, 1997). Die Untereinheit  $\beta 2$  trägt zu über 80% die tryptische Aktivität mit Glu53 als Zentrum der S1-Tasche, was Inhibitorstudien mit Malenimid- $\beta\text{Ala-Arg-CHO}$  zeigten. Die Aminosäure  $\beta 2/\text{Gly45}$  macht die S1-Tasche von  $\beta 2$  im Verhältnis zu  $\beta 1$  und  $\beta 5$  sehr geräumig (siehe Abb. 22).

#### 4.4.6 Mechanismus der Autoproteolyse durch Charakterisierung der $\beta 1\text{Thr1Ala}$ -Mutante

Archebakterielle und eukaryontische  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms werden mit Propeptiden synthetisiert. Bei der Zusammensetzung des 20S-Komplexes werden nur Prosegmente der  $\beta$ -Untereinheiten mit katalytisch aktiven Aminosäuren zwischen Gly-1 und Thr1 autolytisch abgespalten, während inaktive  $\beta$ -Untereinheiten keiner Selbstprozessierung unterliegen. In eukaryontischen 20S-Proteasomen findet die Autolyse innerhalb einer Untereinheit statt.  $\beta 1$  und  $\beta 2$  sind zwei benachbarte aktive Untereinheiten im gegenüberliegenden  $\beta$ -Ring. Die Mutation von Thr1 zu Ala in  $\beta 1$  bewirkt, daß deren Propeptid nicht abgespalten wird. Somit geschieht die Abspaltung der Propeptide intramolekular. Sie könnte eine N-O-Umlagerung beinhalten, wie es erstmals für acetylierte  $\gamma$ -Amino- $\beta$ -buttersäure durch Isolierung des Oxazolin-Intermediats gezeigt wurde (Bergmann *et al.*, 1923). O-N-Acyl-Umlagerungen mit Hydroxyloxazolidin-Intermediaten wurden ebenfalls schon in der Schutzgruppenabspaltung von N-terminalen Thr enthaltenden Peptiden beobachtet (Hübner *et al.*, 1992). Für die Thr1-Hydroxylgruppe des 20S-Proteasoms wäre ein Angriff auf die Carbonylgruppe der vorangehenden Peptideinheit unter Ausbildung eines Hydroxyloxazolidin-Intermediats als einleitender Schritt für die Autoproteolyse zur aktiven  $\beta$ -Untereinheit denkbar (siehe Abb. 25).

Abb. 25:  
Mechanismus der Autolyse der  
Propeptide aktiver  $\beta$ -Untereinheiten..



Für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurde die  $\beta$ 1Thr1Ala-Mutante chemisch und strukturell charakterisiert. Die  $\beta$ -Untereinheiten dieser Mutante werden analog des Wildtyp-Proteins prozessiert, mit Ausnahme von  $\beta$ 1, das zwischen Arg-10 und Leu-9 gespalten ist. Das komplette Prosegment von  $\beta$ 1 ist in der Dichte gut definiert und endet am  $\beta$ -Annulus der  $\beta$ - $\beta$ -Kammer nahe der anderen beiden teilprozessierten Untereinheiten  $\beta$ 6 und  $\beta$ 7. Abb. 26a zeigt die Elektronendichte des  $\beta$ 1-Segments von Val-4 bis Ser2 der  $\beta$ 1Thr1Ala-Mutante. Im nächsten Schritt wurde das Ala in Position eins durch Thr ausgetauscht und eine selbstspaltende aktive  $\beta$ 1-Untereinheitenstruktur modelliert (siehe Abb. 26b). Die Konformation der Thr1-Seitengruppe in der Modellierung wurde von der Stellung des Thr1 im Wildtyp-Proteasom abgeleitet, so daß die Überlagerung beider Strukturen nahezu keine Abweichungen des katalytisch aktiven Zentrums aufweist.

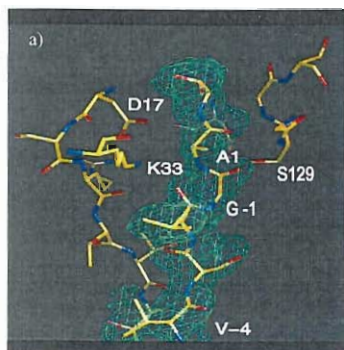
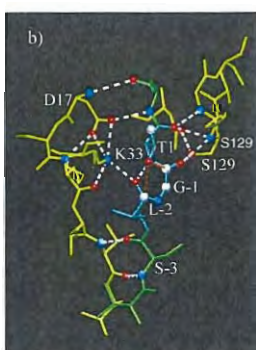
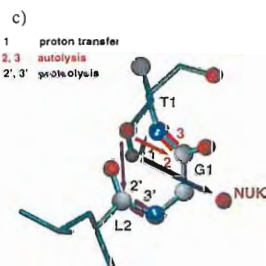


Abb. 26a) Strukturausschnitt der  $\beta$ 1-Untereinheit von der  $\beta$ 1T1A-Mutante.



b) Für A1 wurde Threonin modelliert; entsprechende Koordinaten wurden aus der Wildtyp-Struktur verwendet.



c) Vorgeschlagener Mechanismus der Autolyse und der Proteolyse.

einer starken Umlagerung. Ferner zeigen die Mutagenesestudien, daß auch die Propeptide der inaktivierten Untereinheiten lediglich bis zu Aminosäure -9 kristallographisch definiert sind. Die einzige Ausnahme ist die Doppelmutation von Thr1 zu Ala in  $\beta 1$  und  $\beta 2$  - das Propeptid von  $\beta 1$  ist in der Elektronendichte bis Met-19, das von  $\beta 2$  bis Ser-8 definiert.

Anhand der Kristallstruktur vom 20S-Proteasom aus *T. acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995) wurde die Generierung von Oktapeptiden auf den Abstand aktiver  $\beta$ -Untereinheiten bezogen. Die Distanz zweier benachbarter N-terminaler Threonine beträgt hierbei 30Å, so daß Peptide, bestehend aus acht Aminosäuren, diese in gestreckter Konformation gerade noch erreichen können. Hingegen besitzt die  $\beta 1$ Thr1Ala/ $\beta 2$ Thr1Ala-20S-Proteasomdoppelmutante aus Hefe mit  $\beta 5$  nur noch eine aktive Untereinheit pro  $\beta$ -Ring. Der Abstand dieser beiden verbleibenden katalytisch aktiven Threonine ist 49Å, so daß nach dem bisher angenommenen Mechanismus Fragmente mit einer Länge von 14 Aminosäuren generiert werden müßten. Inkubationsversuche mit thermolabiler Hefe-Enolase zeigten jedoch, daß die Doppelmutante analog Wildtyp Proteolyseprodukte mit einer durchschnittlichen Längenverteilung von acht Aminosäuren liefert. Die einzelnen Fragmente des jeweiligen Experiments wurden über *reversed phase*, Massenspektrometrie und N-terminale Edman-Sequenzierung identifiziert und zeigten lediglich Unterschiede in Bezug auf Schnittstellen. Dies ist auf die charakteristischen basischen und sauren S1-Taschen von  $\beta 1$  und  $\beta 2$  zurückzuführen, die in der Doppelmutante nicht mehr vorhanden sind. Obwohl in der Doppelmutante vier der sechs aktiven Zentren fehlten, ist die Dauer des Enolaseabbaus von dieser Einschränkung nicht abhängig. Dies zeigten Untersuchungen, in denen sowohl im Wildtyp als auch in der Doppelmutante nach 10min die verbleibende unprozessierte Hefe-Enolase in ähnlich vorliegenden Konzentrationen über *reversed phase* analytisch nachgewiesen wurde.

#### 4.4.8 Partielle Hydrolyse der Propeptide

Während der Reifung des 20S-Proteasoms in *S. cerevisiae* sind mit Ausnahme von  $\beta 3$  und  $\beta 4$  die restlichen Propeptide der  $\beta$ -Untereinheiten prozessiert.  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  unterliegen einer Autolyse zwischen Thr1 und Gly-1,  $\beta 6$  und  $\beta 7$  einer partiellen Hydrolyse zwischen His-10 und Gln-9 bzw. Asn-9 und Thr-8. Die Propeptide von  $\beta 3$  und  $\beta 4$  können mit Met-1 und Met-9 die N-terminalen Threonine anderer aktiver Untereinheiten nicht erreichen und sind damit posttranslational nicht modifiziert.  $\beta 6$  und  $\beta 7$  besitzen hingegen Propeptidlängen von 29 und 41 Aminosäuren und können die anderen aktiven Untereinheiten zur Prozessierung erreichen. Tabelle VII zeigt eine Zusammenfassung der N-terminalen Sequenzierungsergebnisse der  $\beta$ -Untereinheiten in den verschiedenen Mutanten, die nacheinander charakterisiert werden.



Tabelle VII: Zusammenfassung der Sequenzierergebnisse der  $\beta$ -Untereinheiten der verschiedenen 20S-Proteasommutanten.

	wt	$\beta$ 1T1A	$\beta$ 1 $\Delta$ 86-89	$\beta$ 1 $\Delta$ pro	$\beta$ 2T1A	$\beta$ 2 $\Delta$ pro	$\beta$ 3G1T	$\beta$ 5T1A	$\beta$ 5K33A	$\beta$ 7R33K	$\beta$ 1T1A/ $\beta$ 2T1A	$\beta$ 1T1A/ $\beta$ 5K33R	$\beta$ 1T1A/ $\beta$ 5R33A	$\beta$ 2T1A/ $\beta$ 5K33R	$\beta$ 7R33K/ $\beta$ 7RF129S
$\beta$ 1	G-1 T1	<b>R10</b> <b>L-9</b>	G-1 T1	<b>G-1</b> <b>T1</b>	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	not viable	G-1 T1	G-1 T1	<b>M-19</b>	<b>R-10</b> <b>L-9</b>	<b>R-10</b> <b>L-9</b>	not viable	G-1 T1
$\beta$ 2	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	-	G-1 T1	G-1 T1	not viable	G-1 T1	G-1 T1	<b>L-15</b> <b>A-14</b>	G-1 T1	G-1 T1	not viable	G-1 T1
$\beta$ 3	M-9	M-9	M-9	M-9	M-9	M-9	-	not viable	M-9	M-9	M-9	M-9	M-9	not viable	M-9
$\beta$ 4	M-1	M-1	M-1	M-1	M-1	M-1	M-1	not viable	M-1	M-1	M-1	M-1	M-1	not viable	M-1
$\beta$ 5	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	not viable	(S-7) (str.)	G-1 T1	G-1 T1	G-1 T1	-	not viable	G-1 T1
$\beta$ 6	H-10 Q-9	H-10 Q-9	H-10 Q-9	H-10 Q-9	<b>A-17</b> <b>S-16</b>	H-10 Q-9	H-10 Q-9	not viable	H-10 Q-9	H-10 Q-9	<b>A-17</b> <b>S-16</b>	H-10 Q-9	H-10 Q-9	not viable	H-10 Q-9
$\beta$ 7	N-9 T-8	N-9 T-8	N-9 T-8	N-9 T-8	<b>V-10</b> <b>N-9</b>	N-9 T-8	N-9 T-8	not viable	N-9 T-8	N-9 T-8	<b>I-19</b> <b>A-18</b>	N-9 T-8	N-9 T-8	not viable	N-9 T-8

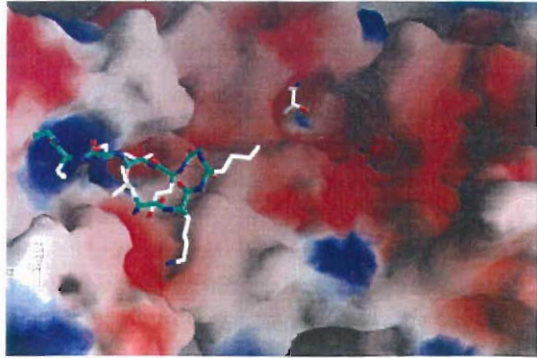
In der Tabelle sind die strukturell charakterisierten 20S-Proteasom-Mutanten orange gefärbt. Die Untereinheiten, die N-terminal Unterschiede zum Wildtyp aufweisen sind durch verstärkten Druck hervorgehoben. Die obere Zeile enthält immer die Aminosäure nach der gespalten wurde, die untere den N-Terminus des prozessierten Propeptids. In den Sequenzanalysen nicht gefundene Untereinheiten sind mit - dargestellt.

$\beta$ 6 ist zu  $\beta$ 5 im gleichen und  $\beta$ 2 im gegenüberliegenden Ringsystem benachbart. Mutagenesestudien zeigen, daß die Inaktivierung von  $\beta$ 1 mit Thr1Ala und  $\beta$ 5 mit Lys33Ala einzeln und zusammen keinen Einfluß auf die Hydrolyse des Propeptids von  $\beta$ 6 haben, hingegen bewirkt der Thr1Ala-Austausch in  $\beta$ 2 eine Verlängerung des Propeptids um sieben Aminosäuren. Dieses Ergebnis wird nur durch Sequenzierung des N-Terminus von  $\beta$ 6 gefunden, da die Elektronendichte nach Gln-9 nicht mehr definiert ist. Eine zusätzliche Inaktivierung von  $\beta$ 1 neben  $\beta$ 2 zeigt keine Veränderung bezüglich der Schnittstelle des Propeptids von  $\beta$ 6 zwischen Ala-17 und Ser-16, so daß  $\beta$ 5 für dessen Spaltung sowohl in der  $\beta$ 2Thr1Ala-Einzel- als auch in der  $\beta$ 1Thr1Ala/ $\beta$ 2Thr1Ala-Doppelmutante verantwortlich ist. Damit besitzt  $\beta$ 5 neben der chymotryptischen Aktivität ebenso die Tendenz nach kleinen neutralen Aminosäuren zu hydrolysieren (SnAAP-Aktivität). Eine Inaktivierung von  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 ist in Hefe letal, so daß keine Aussagen über den Einfluß von  $\beta$ 1 in Bezug auf die Prozessierung des Propeptids von  $\beta$ 6 während des 20S-Proteasomenzusammenbaus getroffen werden können.

Die partiell-prozessierte Untereinheit  $\beta 7$  besitzt große Ähnlichkeit zu  $\beta 6$ . Sie weist zusätzlich zu der benachbarten Untereinheit  $\beta 2$  des gegenüberliegenden Ringsystems geringen Abstand zu den  $\beta 1$ -Untereinheiten beider Ringsysteme auf. Nur die  $\beta 2\text{Thr1Ala}$ -Mutation ändert die Schnittstelle der Hydrolyse des Propeptids von  $\beta 7$  zu Val-10 und Asn-9, so daß  $\beta 2$  des gegenüberliegenden Ringsystems für die finale Prozessierung der partiell geschnittenen Untereinheiten  $\beta 6$  und  $\beta 7$  im Wildtyp-20S-Proteasom verantwortlich ist. Im assemblierten 20S-Komplex zeigen diese Propeptide allerdings nicht mehr in Richtung der zu spaltenden  $\beta 2$ -Untereinheit, so daß sie einer noch nicht verstandenen neuen Orientierung unterliegen. Strukturell sind beide Propeptide lediglich bis Gln-9 und Thr-8 definiert, so daß deren Charakterisierung nur über N-terminale Sequenzierung erfolgt. Im Vergleich zur  $\beta 2\text{Thr1Ala}$ -Einzelmutante zeigt die  $\beta 1\text{Thr1Ala}/\beta 2\text{Thr1Ala}$ -Doppelmutante eine Spaltstelle des Propeptids zwischen Ile-19 und Ala-18. Da im gleichen Ringsystem die aktive Untereinheit  $\beta 1$  für die Spaltung des Propeptids von  $\beta 7$  zwischen Val-10 und Asn-9 zu weit entfernt liegt, ist die  $\beta 1$ -Untereinheit des gegenüberliegenden Ringsystems für die Prozessierung in der  $\beta 2\text{Thr1Ala}$ -Mutante zuständig. Dies zeigt, daß  $\beta 1$  nicht nur nach Glutaminsäure hydrolysiert, sondern trotz Arg45 auch nach Valin spalten kann. Die Bindung eines Bicarbonat-Anions an Arg45, wie es im Fall der Komplexierung des 20S-Proteasoms mit dem Calpain-Inhibitor I gefunden wurde, macht die S1-Tasche in  $\beta 1$  apolar. Damit besitzt  $\beta 1$  neben der PGPH-Aktivität eine Tendenz, Substrate nach verzweigten Aminosäuren zu spalten (BrAAP-Aktivität). In der  $\beta 1\text{Thr1Ala}/\beta 2\text{Thr1Ala}$ -Doppelmutante besitzt das Propeptid von  $\beta 7$  eine Länge von 18 Aminosäuren, so daß beide aktive  $\beta 5$ -Untereinheiten erreicht werden können und eine Zuordnung der Proteolyse damit nicht möglich ist.

Die Deletion des Propeptids von  $\beta 5$  in Hefen ist letal (Cheng & Hochstrasser, 1996). Um dessen entscheidenden Einfluß während der 20S-Partikelformation zu verstehen wurde das katalytisch aktive Zentrum in  $\beta 5$  zerstört, in dem Lys33 zu Ala ausgetauscht wurde, da in  $\beta 5$  die Thr1Ala-Mutation nicht mehr lebensfähig ist. Ergebnis der Substitution ist eine eingeschränkte Autolyse in  $\beta 5$ . Die Elektronendichte ist bis zur Aminosäure Ser-7 definiert. Da aufgrund von Inhomogenitätsproblemen N-terminal über Edmansequenzierung keine chemische Proteolysestelle des Propeptids von  $\beta 5$  gefunden wurde, dieses aber strukturell fehlgeordnet sein kann, ist eine Aussage über dessen Einfluß nicht möglich. Anders im Fall der Untereinheit  $\beta 1$ . Die  $\beta 1\text{Thr1Ala}$ -Mutation zeigt strukturell wie auch analytisch, die Spaltung des  $\beta 1$ -Propeptids zwischen den Aminosäuren Arg-10 und Leu-9. Dieser Hydrolyseschritt wird von der aktiven Untereinheit  $\beta 2$  im gleichen Ringsystem durchgeführt, da in der  $\beta 1\text{Thr1Ala}/\beta 2\text{Thr1Ala}$ -Doppelmutante das  $\beta 1$ -Propeptid strukturell komplett bis Met-19 definiert ist und  $\beta 2$  des gegenüberliegenden Ringsystems weiter als neun Aminosäuren vom Thr1 der Untereinheit  $\beta 1$  entfernt ist (siehe Abb. 28) Die Lage der Aminosäuren Leu-9 bis Gly-1 ist sowohl in der Einzel- als auch in der Doppelmutante identisch.

**Abb. 28:** Oberflächenmodell der Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  der  $\beta 1$ Thr1Ala-Mutante. Das  $\beta 1$ -Propeptid sowie das Thr1 der benachbarten aktiven  $\beta 2$ -Untereinheit ist strukturell dargestellt, die C- und C $_{\alpha}$ -Atome von dem  $\beta 1$ -Propeptid grün gefärbt.



Da im Fall der  $\beta 1$ Thr1Ala-Mutation  $\beta 2$  des gleichen Ringsystems für den Schnitt des Propeptids an Leu-9 verantwortlich ist, dieses aber sowohl in der Einzel- als auch Doppelmutante nicht zum katalytisch aktiven Rest von  $\beta 2$  zeigt, findet analog zu den Propeptiden von  $\beta 6$  und  $\beta 7$  ebenso in diesem Fall eine nicht-verstandene neue Anordnung während der 20S-Proteasomassemblierung statt.

Die Analyse des Propeptids der Untereinheit  $\beta 2$  liefert analog zu der von  $\beta 5$  nur eingeschränkte strukturelle Informationen. In der  $\beta 2$ Thr1Ala-Mutante ist wie auch in der  $\beta 1$ Thr1Ala/ $\beta 2$ Thr1Ala-Doppelmutante die Elektronendichte des  $\beta 2$ -Propeptids nur bis Lys-8 definiert. Die Sequenzierung von  $\beta 2$  in der Doppelmutante zeigt jedoch erst eine partielle Prozessierung nach Aminosäure Ala-14. Die für die Spaltung verantwortliche Untereinheit  $\beta 5$  konnte nicht zugeordnet werden, da die Länge des Propeptids von  $\beta 2$  der Doppelmutante ausreicht, an beide verbleibenden aktiven Untereinheiten der Ringsysteme zu binden.

Neben den partiell prozessierten Propeptiden zeigt die  $\beta 1$ Thr1Ala/ $\beta 2$ Thr1Ala-Doppelmutante zusätzliche Elektronendichte von 12 Aminosäuren, die bislang nicht zugeordnet werden konnte und deshalb als Polyala-Modell eingepaßt wurde. Sicher ist, daß es sich um ein externes Protein handelt, da der Abstand und die Größe zu den partiell prozessierten Propeptiden von  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 6$  und  $\beta 7$  nicht stimmen. Es besteht die Möglichkeit, daß es sich dabei um ein Fragment des gespaltenen Propeptids von  $\beta 5$ , ein verankertes Substrat während des Proteinabbaus oder ein Teilstück eines Chaperons während der 20S-Proteasomassemblierung, wie beispielsweise Ump1 handeln könnte.

#### 4.4.9 Eintritt in das und Austritt aus dem 20S-Proteasom

Die hydrolytische Aktivität des Proteasoms wird mit dem katalytischen Thr1 in Verbindung gebracht. Die Substrate müssen dazu in das Partikel eindringen und werden dann zu Oligopeptiden fragmentiert, die anschließend wieder freigesetzt werden. Das *T. acidophilum*-Proteasom verfügt an den Enden des zylindrischen Partikels über zwei Eintrittsöffnungen von 13 Å, die durch eine Ringfläche von Schleifen-formierenden Tyr126-Gly-Gly-Val-Segmenten der sieben identischen  $\alpha$ -Untereinheiten begrenzt sind. Die N-terminalen 12 Aminosäuren sind in der Elektronendichte nicht definiert. Im Gegensatz zum *T. acidophilum*-Partikel ist die hydrolytische Kammer des 20S-Hefeproteasoms nahezu unerreichbar. Die N-Termini von  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$  bilden ineinander eine aus mehreren Schichten bestehende Struktur, die den  $\alpha$ -Ring vollständig verschließt und somit einen Substrateintritt ohne Umlagerung nicht mehr gewährleistet (siehe Abb. 29).

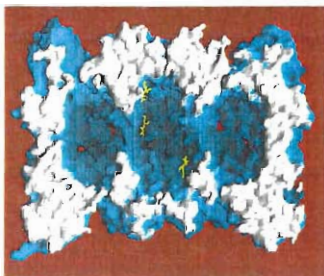


Abb. 29: Oberflächenmodell des halben 20S-Proteasoms. Der Schnitt erfolgte senkrecht zur nicht-kristallographischen zweizähligen Symmetrieachse. Die aktiven Untereinheiten sind mit dem Calpain-Inhibitor I (gelb) komplexiert.

Das Partikel besitzt lediglich einige enge Seiteneingänge, die hauptsächlich an der Grenzfläche zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringern existieren. Das *T. acidophilum*-Proteasom besitzt ähnliche Fenster, diese sind aber aufgrund größerer Aminosäureseitengruppen für kleine Moleküle weniger durchlässig. Die Öffnungen werden überwiegend zwischen Helix H1-Schleife-Helix H2 Motiven der  $\alpha\beta$ -Grenzflächen gebildet und führen zu den N-terminalen Thr1-Resten des aktiven Zentrums. Sie werden von polaren und geladenen Aminosäure-Seitenketten ausgekleidet, die sich weiter verschieben lassen können und somit Öffnungen bis hin zu 10 Å erzeugen. Dies würde die Passage ungefalteter, gestreckter Polypeptidketten erlauben.

## 5 Diskussion

### 5.1 Proteinpräparation und Strukturlösung

Die Reinigung des 20S-Proteasoms erfolgte aus *S. cerevisiae*, da Hefe lediglich über vierzehn verschiedene Untereinheiten verfügt (Heinemeyer *et al.*, 1993), die nicht wie in höheren Eukaryonten über  $\gamma$ -Interferon-Induktion ausgetauscht werden können (Brown *et al.*, 1993). Die Isolierung und Kristallisation der 20S-Komplexe aus Hefe wurde somit nicht durch Inhomogenitätsprobleme erschwert.

Das natürliche 20S-Proteasom wurde aus käuflich erworbenen Hefezellen gereinigt, die in großen Mengen verfügbar waren. Daraus wurde der multifunktionelle Proteasekomplex in hohen Ausbeuten bis zur Homogenität isoliert und zur Kristallisation eingesetzt. Ein Vorteil von Hefezellen ist, daß ortsspezifische Mutagenesen einfach und problemlos durchzuführen sind, so daß mit einem bestehendem Reinigungsprotokoll und bekannten Kristallisationsbedingungen auch aus wenig Rohmaterial eine Reihe von 20S-Proteasommutanten strukturell untersucht werden konnten. Die Mutanten wurden über den resultierenden Phänotyp charakterisiert und lieferten wichtige Struktur-Funktions-Beziehungen.

Da die katalytisch aktiven Zentren nicht an der Oberfläche des 20S-Proteasoms liegen und somit nicht an Kristallisationskontakten beteiligt sind, konnten alle Mutanten isomorph zum Wildtyp kristallisiert werden. Nach Optimieren der Kristallisationsbedingungen erhielt man Kristalle, die Synchrotronstrahlung bis zu einer maximalen Auflösung von 1.9Å beugten. Die Strahlenschäden führten allerdings nach wenigen Aufnahmen zu einer Abnahme der kristallinen Ordnung und des damit verbundenen Streuvermögens. Die Messung isomorpher nativer 20S-Proteasom-Datensätze konnte nur in geeigneten Pufferlösungen unter *Cryo*-Bedingungen bei 90K durchgeführt werden. Dies erforderte die Suche nach einem *Cryoprotektans*, das durch schnelle amorphe Kristallisation im Stickstoffstrom ein Auskristallisieren der Lösungsmittelmoleküle und damit eine Zerstörung des Kristallgitters verhindert. Das Einfrieren der 20S-Proteasom-Kristalle stellte den entscheidenden Schritt zur Strukturlösung dar und erlaubte die Messung des 20S-Partikels sowie der jeweiligen 20S-Proteasom-Mutanten.

Die erhaltenen Kristallisationsbedingungen und Strukturdaten des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae* sind ideale Voraussetzungen um in einem nächsten Schritt die Röntgenstrukturanalyse höherer eukaryontischer 20S-Proteasome zu versuchen. Als Quelle für die Isolierung bietet sich Rinderhyphose an, weil dieses Organ über kein Immunsystem verfügt, so daß eventuell in

diesen 20S-Proteasomen keine  $\gamma$ -Interferon-spezifischen Untereinheiten ausgetauscht werden. In diesem Fall würde der 20S-Komplex als homogenes Präparat vorliegen und wäre einer Röntgenstrukturanalyse zugänglich.

## 5.2 Struktureller Aufbau von eukaryontischen 20S-Proteasomen

Die Röntgenstrukturanalyse des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae* zeigte das Molekül als ein zylinderförmiges Partikel mit einer Länge von 150Å und einem maximalen Durchmesser von 110Å. Der Komplex enthält eine zweizählige Rotationssymmetrie und setzt sich somit aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ringern zusammen. Jedes Ringsystem ist aus sieben verschiedenen Untereinheiten mit definierter Besetzungsanordnung aufgebaut. Hauptursache hierfür sind starke Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten durch Sequenzinsertionen und verschiedenen lange N- bzw. C-Termini. Eine besonders starke Verzahnung herrscht zwischen  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$  mit den gegenüberliegenden  $\beta_6'$  und  $\beta_7'$ -Untereinheiten. Ein Sequenzalignment dieser Untereinheiten mit denen von *H. sapiens* ist in Abb. 30 dargestellt. Die Insertionen der Untereinheiten sind in Säugern und Hefe konserviert und deuten auf eine identische Anordnung der einzelnen Untereinheiten in den jeweiligen 20S-Proteasomen hin. Bislang konnten allerdings nur elektronenmikroskopische Studien mit monoklonalen Antikörpern im 20S-Komplex aus *H. sapiens* eine zweizählige Symmetrieachse analog zu *S. cerevisiae* identifizieren (Kopp *et al.*, 1993). Eine Kristallstruktur dieses Systems gibt es bislang nicht.

## 5.3 Katalytisch aktive Zentren des 20S-Proteasoms

Im 20S-Proteasom aus Hefe besitzen die Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_5$  proteolytische Aktivität. Thr1O $\gamma$  sowie ein definiertes Wassermolekül sind in diesen Untereinheiten die Nukleophile für die Substratspaltung. Der N-Terminus von Thr1 könnte die Funktion eines Protonenakzeptors einnehmen, während das Lösungsmittelmolekül als Protonen-*Shuttle* dient. Im zweiten Schritt des Katalysemechanismus greift das Wassermolekül die Esterbindung nukleophil an und führt zur Regenerierung des Thr1O $\gamma$ . Der pKa-Wert von Thr1 und des nukleophilen Wassermoleküls sowie der Protonierungszustand der ionisierbaren funktionellen Seitengruppen von Asp17 und Lys33 ist nicht bekannt. Das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen läßt jedoch vermuten, daß sowohl Asp17 als auch Lys33 geladen vorliegen. Die positive Ladung von Lys33 würde den intrinsischen pKa-Wert von Thr1O $\gamma$ , Thr1N sowie des Wassermoleküls verschieben und deren Nukleophilie verstärken. Die Hydrolyse von Peptidbindungen wird dabei durch den Zuwachs von Entropie und nicht der Enthalpie ermöglicht.

Die inaktiven Untereinheiten beeinflussen die katalytische Aktivität und die Substratspezifität von Thr1. Erste willkürliche Punktmutation wie der Austausch von Ser136 zu Phe in  $\beta_4$  zeigten eine eingeschränkte chymotryptische Aktivität (Heinemeyer *et al.*, 1993). Strukturell liegt  $\beta_4$  in

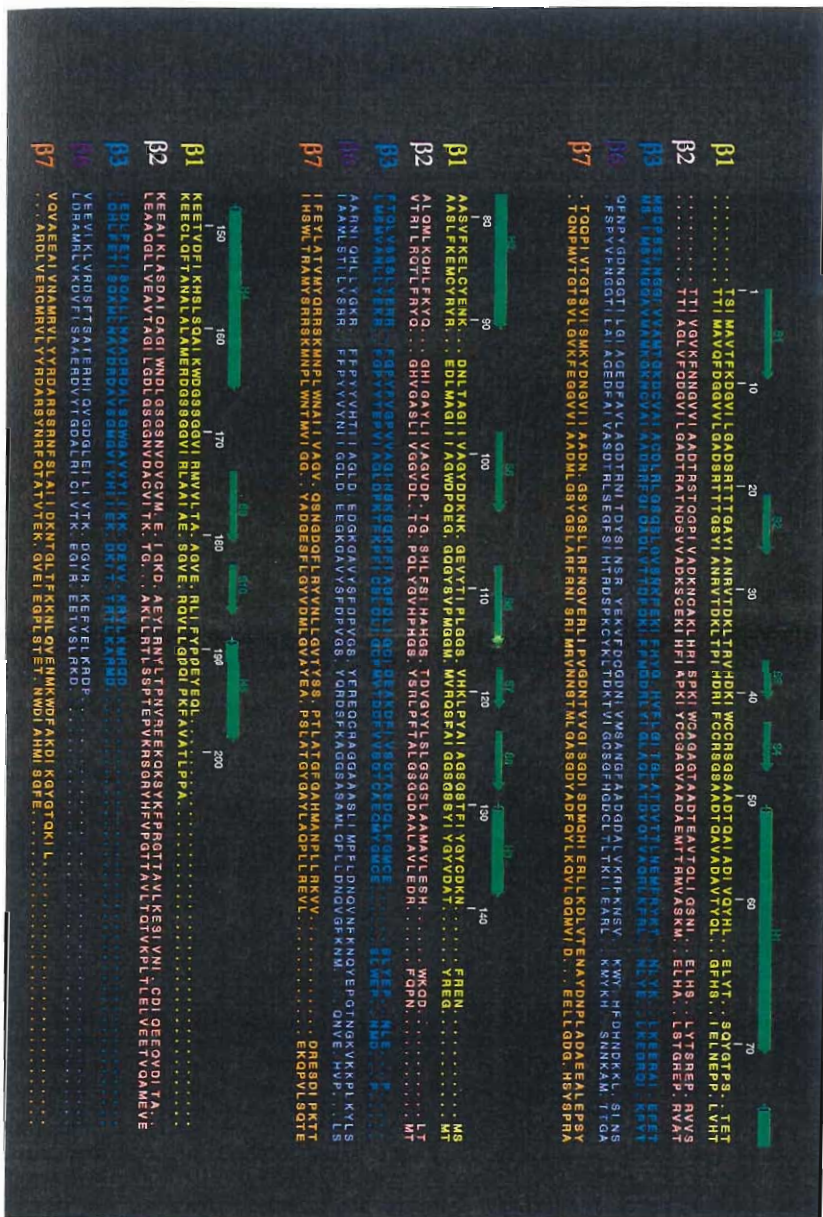


Abb. 30: Sequenzalignement der Untereinheiten β1, β2, β3, β6 und β7 aus *S. cerevisiae* (obere Zeile) und *H. sapiens* (untere Zeile). Die Aminosäuren in den Untereinheiten sind analog der α- und β-Sequenz aus *T. acidophilum* numeriert mit entsprechenden alphabetischen Bezeichnungen der jeweiligen Insertionen.

Nachbarschaft zu  $\beta 5'$  des gegenüberliegenden  $\beta$ -Ringsystems, so daß der Austausch von Ser 136 durch Phe den  $\beta$ -trans- $\beta'$ -Kontakt über Helix H3 zwischen  $\beta 4$  und  $\beta 5'$  stören könnte und damit die benachbarte Thr1-Stelle in  $\beta 5'$  beeinflusst (siehe Abb. 31a). Andere Mutagenese-Experimente zeigten, daß durch Deletion der 15 C-terminalen Reste von  $\beta 7$  (Hilt *et al.*, 1993) die PGPH-Aktivität verloren geht. Ursache hierfür könnten intensive Kontakte des C-Terminus von  $\beta 7$  mit  $\beta 1'$  des gegenüberliegenden  $\beta$ -Ringsystems sein, so daß durch diese Deletion das katalytisch aktive Zentrum von  $\beta 1$  modifiziert und inaktiviert wird (siehe Abb. 31b).

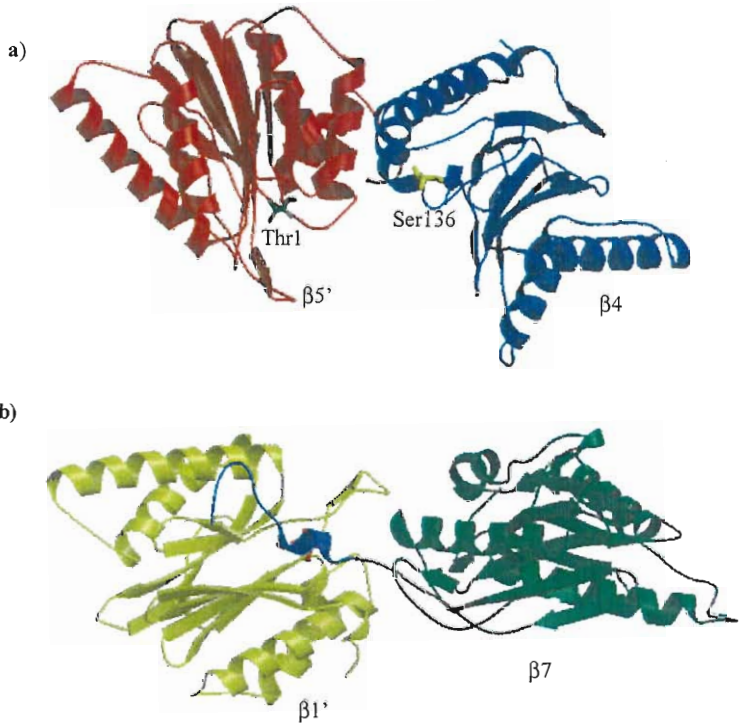


Abb. 31: Ribbonplot der  $\beta 5'$  und  $\beta 4$  (a) bzw. der  $\beta 1'$  und  $\beta 7$ -Untereinheit (b).



#### 5.4 Zugang zu den katalytisch aktiven Zentren im 20S-Proteasom

Der Proteinabbau im 20S-Proteasom erfolgt an den katalytisch aktiven Zentren der zentralen Hydrolysekammer. Es ist jedoch nicht verstanden, wie die Substrate dorthin gelangen, weil die von den  $\alpha$ -Untereinheiten gebildeten Eingänge verschlossen sind. Das 19S-Partikel, welches für die ATP- und ubiquitinabhängige Proteolyse durch das Proteasom verantwortlich ist, bindet an beide Pole des 20S-Zylinders und bildet damit den 26S-Komplex. Diese Assoziierung führt zu einer vielfachen Erhöhung der katalytischen Aktivität gegenüber chromogenen und natürlichen Substraten (Hoffman & Rechsteiner, 1994). Es besteht die Möglichkeit, daß die 19S-Regulorkappen Konformationsänderungen der  $\alpha$ -Ringsysteme bewirken.

Der Proteasomregulator PA28 bindet hingegen ATP-unabhängig an die  $\alpha$ -Untereinheiten (Kania *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1994), beschleunigt jedoch ebenfalls den Peptidabbau und die Antigen-Präsentation (Groettrup *et al.*, 1996). Somit könnte auch dieser Regulator für einen kontrollierten Zugang durch Neuschaffung bzw. Vergrößerung von Eintrittsöffnungen in das 20S-Proteasom *in vivo* sorgen. Zu klären gilt allerdings, weshalb die Bindung der 19S-Regulorkappe im Vergleich zum PA28-Regulator ATP-abhängig ist. Carboxypeptidase-Behandlung von PA28 zeigte, daß die C-terminalen acht Aminosäuren des Moleküls genügen, das 20S-Proteasom in analoger Weise wie der PA28-Regulator zu aktivieren (Gray *et al.*, 1994). Der C-Terminus von PA28 könnte die Seitenöffnungen verändern und damit einen lateralen Zugang in das 20S-Proteasom schaffen. Dies wäre ohne große Konformationsänderungen, die ATP benötigen würden, möglich.

#### 5.5 Generierung von Oligopeptiden charakteristischer Längen

Das 20S-Proteasom generiert in der Regel Oligopeptide mit acht bis neun Aminosäuren. Es stellt sich daher die Frage, wie das Zusammenspiel der drei aktiven Untereinheiten für die Längenverteilung verantwortlich ist. Abbau-Untersuchungen mit Enolase zeigten, daß die  $\beta$ 1 Thr1 Ala/ $\beta$ 2 Thr1 Ala-Doppelmutante mit nur zwei aktiven Untereinheiten, die 49 Å voneinander entfernt sind, immer noch Produkte mit Oktapeptidverteilung generiert. Ortsspezifische Mutagenese zeigte keine zusätzlichen proteolytisch aktiven Zentren, da durch Inaktivieren aktiver Untereinheiten die Länge der partiell prozessierten Propeptide zunahm. Diese Prozessierungsintermediate konnten durch N-terminale Sequenzierung charakterisiert werden. In der Elektronendichte waren häufig nur acht Aminosäuren der Propeptide definiert, während der Rest flexibel war. Eine mögliche Erklärung für die Generierung der Oktapeptide ergibt sich aus der geometrischen Anordnung der Andockstelle für entfaltete Substrate in der zentralen proteolytischen Kammer und Thr10 $\gamma$ , die ca. acht Aminosäuren auseinander liegen. Somit wird ein Substrat mit einer Länge von zwölf Aminosäuren in Oligopeptide mit Längen von acht und vier Aminosäuren zerlegt, was die Längenverteilung der Produkte während eines Substratabbaus erklären könnte.

## 5.6 Funktion der proteasomalen Untereinheiten

Im Vergleich zu den 14 aktiven Untereinheiten im *Thermoplasma*-20S-Proteasom enthält das 20S-Partikel aus Hefe mit  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  nur sechs, die in einer bestimmten Orientierung zueinander stehen und unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen. Es stellt sich daher die Frage, weshalb nicht alle Untereinheiten in eukaryontischen 20S-Proteasomen aktiv sind und inwiefern die inaktiven Untereinheiten die Aktivität beeinflussen. Weiterhin ist nicht verstanden, in welcher Art und Weise die Anordnung dieser Untereinheiten zueinander den kontrollierten Proteinabbau steuern. Die bisherigen Mutagenesestudien zeigten, daß Hefezellen, die 20S-Proteasome mit nur zwei oder vier aktiven Untereinheiten exprimieren, lebensfähig sind. Bislang gelang es jedoch nicht, durch ortsspezifische Mutagenese eine inaktive Untereinheit in eine proteolytisch aktive umzuwandeln. Die verschiedenen inaktiven  $\beta$ -Untereinheiten üben jeweils unterschiedliche Wechselwirkungen auf ihre benachbarten Untereinheiten aus und führen somit zu einem komplexen Molekülaufbau. Diese beeinflussen die Substratspezifität in einer bisher nicht verstandenen Art und Weise, wie Mutagenese-Experimente an  $\beta 4$  und  $\beta 7$  zeigten (siehe 5.3).

Die Funktion und Aufgabe der  $\alpha$ -Ringe ist nicht bekannt. Es besteht die Möglichkeit, daß die  $\alpha$ -Ringe für die Assemblierung und für den Substratzugang notwendig sind. So besitzt das 'Proteasom' hslV aus *E. coli* ähnlichen strukturellen Aufbau wie die  $\beta$ -Ringe eukaryontischer 20S-Proteasome (Bochtler *et al.*, 1997), jedoch enthält dieses System keine  $\alpha$ -Ringsysteme und wird nur über die ATPase hslU reguliert.

## 5.7 Funktion der Propeptide

Der Austausch von Thr1 zu Ala führt in den Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  im Hefeproteasom zu deren Inaktivierung und einem Phänotyp, der sich durch Temperatursensitivität bei 37°C und einer verlangsamten Zellteilungsrate auszeichnet. Hingegen zeigten Hefezellen, in denen nur in  $\beta 1$  Thr1 gegen Ala ersetzt worden ist, keinen derartigen Phänotyp. Im Gegensatz dazu weist die  $\beta 2$ Thr1Ala-Einzelmutante ähnliche biologische Eigenschaften wie die  $\beta 1$ Thr1Ala/ $\beta 2$ Thr1Ala-Doppelmutante auf. Hierfür könnte die fehlende aktive Untereinheit  $\beta 2$  oder das nicht prozessierte Propeptid von  $\beta 2$  verantwortlich sein. In Hefezellen wurde für  $\beta 5$  gezeigt, daß die Deletion des Propeptids als auch die Thr1Ala-Mutation letal sind. Hingegen führt die Coexpression dieser Untereinheit ohne Propeptid und dessen Propeptid allein zu keinem vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Unter dieser Voraussetzung ist auch die Thr1Ala-Mutation in  $\beta 5$  lebensfähig (Chen & Hochstrasser, 1996). Dies zeigt, daß das Propeptid von  $\beta 5$  essentiell für die Assemblierung ist. Im Gegensatz zu  $\beta 5$  konnte die exakte Aufgabe und Funktion der Propeptide von  $\beta 1$  und  $\beta 2$  mit den bisherigen Mutanten nicht festgestellt werden. Die Kristallstruktur zeigt, daß die Propeptide inaktiver

Untereinheiten an direkten oder indirekten Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten beteiligt sind und eine Strukturstabilisierung bewirken. Die Propeptide von  $\beta_6$  und  $\beta_7$  werden partiell prozessiert. Das verbleibende Nona- und Oktapeptidfragment von  $\beta_6$  und  $\beta_7$ , sowie das Propeptid von  $\beta_3$  wechselwirken mit anderen Propeptiden. So interagiert das Propeptid von  $\beta_6$  mit den Aminosäuren 91 und 116 von  $\beta_7$  und das Propeptid von  $\beta_7$  mit den Aminosäuren 92 und 115 von  $\beta_1$ .

Die Deletion des Chaperons UMP1 führt in Hefe zu einem reduzierten Zellwachstum und bewirkt überwiegend nicht vollständig assemblierte 13-16S-Proteasomkomplexe (Ramos *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen an dem Chaperon ergaben, daß dieses an die Propeptide bindet. Somit liegt es nahe, daß die Propeptide eine essentielle Rolle für die korrekte Assemblierung innehaben.

### 5.8 $\gamma$ -Interferon induzierter Austausch aktiver $\beta$ -Untereinheiten

*In vivo* Experimente zeigten, daß Proteasominhibitoren die MHC Klasse I Präsentation von Proteinantigenen hemmen (Rock *et al.*, 1994). *In vitro* generieren 20S-Proteasome Oligopeptide mit einer Länge von acht bis neun Aminosäuren. Diese Länge ist ideal für die Bindung an MHC Klasse I Moleküle (Niedermann *et al.*, 1996; York & Rock, 1996). In Säugerproteasomen findet über  $\gamma$ -Interferon ein konstitutiver Ersatz der aktiven Untereinheiten  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_5$  durch  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$  und  $\beta_{5i}$  statt. Diese 'immuno'-Untereinheiten regulieren die Anzahl der an der Zelloberfläche vorliegenden MHC Klasse I Moleküle, wie über Deletion des für die Proteinuntereinheit  $\beta_{5i}$  codierenden Gens (Fehling *et al.*, 1994) sowie von  $\beta_{1i}$  in T-Zell-Lymphgewebe (Sibille *et al.*, 1995) gezeigt wurde.

Die an der Antigenpräsentation beteiligten Peptide besitzen gewöhnlich basische oder hydrophobe C-terminale Aminosäuren (Engelhard, 1994). Substitutionen der aktiven Untereinheiten durch die 'immuno'-Untereinheit führt zu Generierung von Peptide, die über den C-terminalen *Anchorresidue* bevorzugt an MHC Klasse I Molekülen binden. Die konstitutive und die dazugehörige 'immuno'-Untereinheit weisen einen hohen Grad an Sequenzidentität auf. Lediglich  $\beta_{1i}$  besitzt in der S1-Tasche zwei auffällige Unterschiede gegenüber der nicht  $\gamma$ -Interferon induzierten  $\beta_1$ -Untereinheit, nämlich die Substitution Thr31 zu Phe und Arg45 zu Leu (siehe Abb. 32).

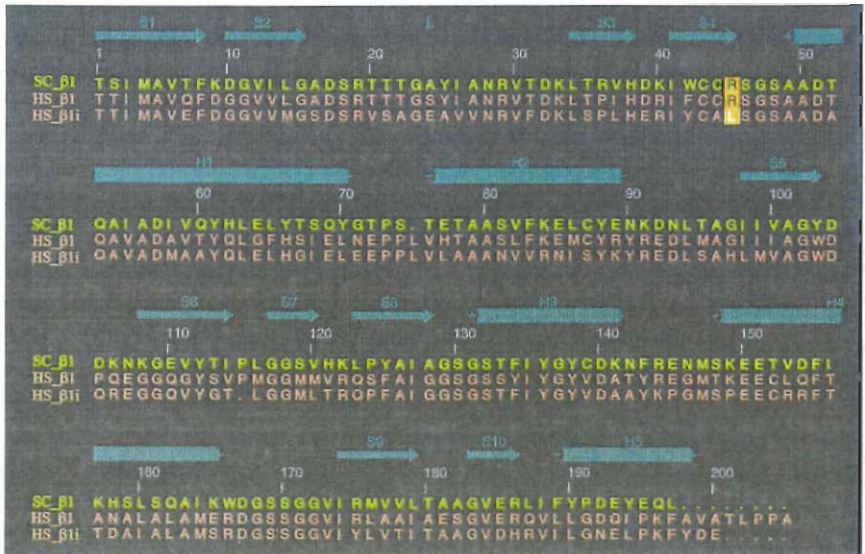


Abb. 32: Sequenzalignment der Untereinheiten  $\beta 1$  aus *S. cerevisiae* (SC) und *H. sapiens* (HS) mit  $\beta 1i$  aus *H. sapiens*. Die Aminosäuren in Position 45 sind orange eingefärbt.

Durch den Phe-Austausch wird die  $\beta 1i$ -S1-Tasche verkleinert und durch den Leu-Ersatz deren Spezifität apolar, so daß die PGPH-Aktivität reduziert und die chymotryptische Aktivität erhöht wird. Experimente in Zell-Linien von Mäusemutanten, denen die Expressionsfähigkeit der 'immuno'-Untereinheit  $\beta 1i$  fehlt, zeigen eine reduzierte MHC-Klasse I-Präsentation (van Kaer *et al.*, 1994; Driscoll *et al.*, 1993; Gaczynska *et al.*, 1993). Die Substitution von  $\beta 2$  und  $\beta 5$  mit  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  ändert die Anordnung und Spezifität der S1-Tasche nicht. Trotzdem beeinflussen  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  den Mechanismus der MHC Klasse I-Präsentation, wie *in vivo*-Experimente mit mutierten Mäusen zeigten (Fehling *et al.*, 1994; Stohwasser *et al.*, 1996). Die Strukturinformation liefert hierfür keine Erklärung. Es besteht die Möglichkeit, daß  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  die Seitenöffnungen vergrößern und damit den Durchsatz an Substrat steigern. Dies würde eine verstärkte Oktapeptidgenerierung bedeuten, die dann den MHC-Klasse I-Molekülen zur Verfügung stehen. Eukaryontische Zellen besitzen jedoch eine große Anzahl an Carboxypeptidasen, die Oligopeptide schnell zu Aminosäuren zerlegen. Dies zeigt der sofortige Abbau von in eukaryontischen Zellen injizierter viraler Oktapeptide, die somit nicht über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden (Knight *et al.*, 1995). Es wird deshalb vermutet, daß  $\gamma$ -Interferon zusätzlich die Expression von Carboxypeptidasen in nicht verstandener Art und Weise reguliert.

Im 20S-Hefeproteasom fehlen den inaktiven Untereinheiten  $\beta 6$  und  $\beta 7$  essentielle Aminosäuren, die für die Autolyse und der damit verbundenen Ausbildung des katalytisch aktiven Zentrums erforderlich sind. Trotzdem sind  $\beta 6$  und  $\beta 7$  in Position -9 und -8 prozessiert. Die verbleibenden Nona- und Oktapeptidfragmente können mangels aktivem Thr10' nicht abgespalten werden. Ähnliches gilt für die Propeptide der durch Mutagenese inaktivierten 20S-Proteasom-Untereinheiten. Ein Vergleich dieser intermediär hydrolysierten Propeptide zeigt ähnliche Konformation wie von MHC Klasse I-Molekülen gebundene Fremdpeptide. Die strukturell überlagerten, teilprozessierten Propeptide von  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  der jeweiligen 20S-Proteasom-Mutanten mit einem viralen Peptidnonamer im Komplex mit seinem MHC Klasse I Rezeptor (Madden *et al.*, 1991) zeigen rms-Abweichungen für alle Atome von 2.3Å und 1.3Å für die  $C_{\alpha}$ -Atome. Die lokale Konformationen der Peptide könnte eine Rolle bei der Erzeugung (durch das 20S-Proteasom) und Präsentation (durch MHC Klasse I Moleküle) von immundominanten Peptidepitopen spielen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Achstetter, T, Ehmman, C., Osaki, A. und Wolf, D. H. (1984). Proteolysis in eukaryotic cells. Proteinase yscE, a new yeast peptidase. *J. Biol. Chem.* **259**, 13344-13348.
- Ahn, J. Y., Tanahashi, N., Akiyama, K. Y., Hisamatsu, H., Noda, C., Tanaka, K., Chung, C. H., Shibmara, N., Willy, P. J., Mott, D. J., Slaughter, C. A. und DeMartino, G. N. (1995). Primary structure of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett.* **366**, 37-44.
- Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Shimbara, N., Takashina, M., Kristensen, P., Hendil, K. B., Tanaka, K. und 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.
- Arrigo, A. P., Simon, M., Darlix, J. L. und Spahr, P. F. (1987). A 20S particle ubiquitous from yeast to human. *J. Mol. Evol.* **25**, 141-150.
- Arrigo, A. P., Tanaka, K., Goldberg, A. L. und Welch, W. J. (1988). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* **331**, 192-194.
- Bacon, D. J. und Anderson, W.F. (1988). A fast algorithm for rendering spacefilling molecule pictures. *J. Mol. Graphics* **6**, 219-220.
- Bainton, D. (1981). The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* **91**, 66-76.
- Barton, G. J. (1993). ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Prot. Engineer.* **6**, 37-40.
- Bergmann, M, Brand, E. und Weinmann, F. (1923). *Hoppe-Seyler Z. phys. Chem.* 1-17.
- Blundell, T. L. und Johnson, L., N. (1976). Protein Crystallography. Academic Press, London
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M. und Huber, R. (1997). Crystal Structure of heat shock locus V (hslV) from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6070-6074.
- Brannigan, J. A., Dodson, G., Duggleby, H. J., Moody, P. C., Smith, J. L., Tomchick, D. R. und Murzin, A. G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**, 416-419.
- Brown, M. G., Driscoll, J. und Monaco, J. J. (1993). MHC-linked low-molecular mass polypeptide subunits define distinct subsets of proteasomes. Implications for divergent function among distinct proteasome subsets. *J. Immun.* **151**, 1193-1204.
- Brünger, A. T. (1992a). X-PLOR, Version 3.1. A system for X-ray crystallography and NMR. Yale University Press, New Haven.
- Brünger, A. T. (1992b). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-475.
- Bullock, W.O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTech.* **5**, 376.

- Chen, P. und Hochstrasser, M. (1995). Biogenesis, structure and function of the yeast 20S-proteasome. *EMBO* **14**, 2620-2630.
- Chen, P. und Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* **86**, 961-972.
- Chuang, S. E., Burland, V., Plunkett, G., Daniels, D. L. und Blattner, F. R. (1993). Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the hslTS/ibpAB and hslVU operons in *Escherichia coli*. *Gene* **134**, 1-6.
- Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**, 13-21.
- Colman, P. M. und Jansonius, J. N., Matthews, B. W. (1972). The structure of thermolysin: an electron density map at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **70**, 701-724.
- Cooper, T. G. (1981), *Biochemische Arbeitsmethoden*, Walter de Gruyter, 1. Auflage.
- Coux, O., Nothwang, H. G., Silva Pereira, I., Recillas Targa, F., Bey, F., Scherrer, K. (1994). Phylogenetic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol. Gen. Genetics* **245**, 769-780.
- Coux, O., Tanaka, K. und Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- Cudney, B., Patel, S., Weisgarber, K. Newhouse, Y. und McPherson, A. (1994). Screening and optimization strategies of macromolecular crystal growth. *Acta Cryst.* **D50**, 414-423.
- Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Nidel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R. und Baumeister, W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. *FEBS Lett.* **251**, 125-131.
- Darnell, J., Lodish, H. und Baltimore, D. (1990). *Molecular cell biology*. W. H. Freeman and Company, New York, 167-169.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. und Rechsteiner, M. (1994). A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* **269**, 7059-7061.
- Dick, TP, Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, PM., Kuehn, L., Koszinowski, UH., Stevanovic, S., Schild, H. und Rammensee HG. (1996). Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* **86**, 253-62.
- Drenth, J. (1992). *Principles of X-ray crystallography*. Springer-Verlag, New York, USA.
- Driscoll, J., Brown, M. G., Finley, D. und Monaco, J. J. (1993). MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* **365**, 262-264.
- Duggleby, H. J., Tolley, S. P., Hill, C. P., Dodson, E. J., Dodson, G. und Moody, P. C. (1995). Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* **373**, 264-268.
- Emori, Y., Tsukahara, C., Kawasaki, H., Ishiura, S., Sugita, H. und Suzuki, H. (1991). Molecular cloning and functional analysis of three subunits of yeast proteasome. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 344-353.

- Engelhard, V. H. (1994). Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 13-23.
- Engh, R. A. und Huber, R. (1991). Accurate bond and angles parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392-400.,
- Ensouf, R. M. (1997). An extensively modified version of molscript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *Jour. Mol. Graphics* **15**, 132-134.
- Etlinger J. und Goldberg, A. L. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 54-58.
- Falkenburg, P. E., Haass, C., Kloetzel, P. M., Niesel, B., Kopp, F., Kuehn, L. und Dahlmann, B. (1988). *Drosophila* small 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase. *Nature* **331**, 190-192.
- Fehling H. J., Swat, W., Laplace, C., Kuhn, R., Rajewsky, K., Muller, U. und von Boehmer, H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* **265**, 1234-1237.
- Fenteany, G., Standaert, R. F., Lane, W. S., Choi, S., Corey, E. J. und Schreiber, S. L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**, 726-731.
- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A. und Kloetzel, P. M. (1994). 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J. Mol. Biol.* **236(4)**, 975-981.
- Fruh, K., Gossen, M., Wang, K., Bujard, H., Peterson, P. A. und Yang, Y. (1994). Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO* **13**, 3236-3244.
- Gaczynska, M., Rock, K. und Goldberg, A. L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* **365**, 264-267.
- Giacovacco, C., Monaco, H., L., Viterbo, D., Scordari, F., Gilli, G., Zanotti, G. und Catti, M. (1992). Fundamentals of Crystallography. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Gkusker, J. P., Lewis, M. und Rossi (1994). Crystal structure analysis for chemists and biologists. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- Goldberg, A. L. und Dice, J. F. (1974). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annu. Rev. Biochem.* **42**, 835-869.
- Gray, C. W., Slaughter, C. A. und DeMartino, G. N. (1994). PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J. Mol. Biol.* **236(1)**, 7-15.
- Groll, M. (1995). Isolierung und Kristallisation des 20S-Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit an der Technischen Universität München.



- Grziwa, A., Baumeister, W., Dahlmann, B. und Kopp, F. (1991). localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.* **290**, 186-190.
- Groettrup, M., Soza, A., Kuckelkorn, U. und Kloetzel, P. M. (1996). Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immun. Today* **17**, 429-435.
- Hanahan, D. (1983). Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hardy, M. F., Mantle, D., Edmunds, T. und Pennington, R. J. T. (1981). A high-molecular weight enzyme from skeletal muscle which hydrolyses chymotrypsin substrates. *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 348-349.
- Harris, J. R. (1968). Release of a macromolecular protein component from human erythrocytes ghosts. *Biochem. Biophys. Acta* **150**, 534-537.
- Hegerl, R., Pfeifer, G., Pühler, G., Dahlmann, B. und Baumeister, W. (1991). The three-dimensional structure of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting. *FEBS Lett.* **283**, 117-121.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. und Wolf, D. H. (1993). PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 5115-5120.
- Heinemeyer, W., Trondle, N., Albrecht, G. und Wolf, D. H. (1994). Pre5 and Pre6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast - indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry* **33**, 12229-12237.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. und Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J. Biol. Chem.* **272**, 25200-25209.
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1986). The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **33**, 19-56.
- Hilt, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T. und Wolf, D. H. (1993). The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* **268**, 3479-3486.
- Hilt, W. und Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 96-102.
- Hübener, G., Göhring, W., Musiol, H. J. und Moroder, L. (1992). N-alpha-trifluoroacetylation of N-terminal hydroxyamino acids: a new side reaction in peptide synthesis. *Pep. Res.* **5**, 287-292.
- Hoffman, L., Pratt, G. und Rechsteiner, M. (1992). Multiple forms of the 20S multicatalytic and the 26S ubiquitin/atp-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **267**, 2362-22368.

- Hoffman, L. und Rechsteiner, M. (1994). Activation of the multicatalytic protease. The 11 S regulator and 20 S ATPase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits. *J. Biol. Chem.* **269**, 16890-16895.
- Hoppe, W. (1957). Die Faltblattmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Cryst.* **10**, 750-751.
- Hough, R., Pratt, G. und Rechsteiner M. (1987). Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol., Chem.*, **262**, 8303-83013.
- Huber, R. (1965). Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Cryst.* **19**, 353-356.
- Ikai, A., Nishigai, M., Tanaka, K. und Ichihara, A. (1991). Electron microscopy of 26S-complex contain the 20S-proteasome. *FEBS Lett.* **292**, 21-24.
- Ishiura, S., Sano, N., Kamakura, K. und Sugita, H. (1985). Isolation of two forms of a high molecular-mass serine protease, ingensin, from porcine skeletal muscle. *FEBS Lett.* **189**, 119-123.
- Jap, B., Pühler, G., Lücke, H., Typke, D., Löwe, J., Stock, D., Huber, R. und Baumeister, W. (1993). Preliminary X-ray crystallographic study of proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Mol. Biol.* **234**, 881-884.
- Jancarik, J. und Kim, S. H. (1976). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 409-411.
- Jones, T. A. (1978). A graphic model building and refinement system for macromolecules. *J. Appl. Crystallogr.* **11**, 268-272.
- Kabsch, W. (1988). Automatic indexing of rotation diffraction patterns. *J. Appl. Crystallogr.*, **21**, 67-71.
- Kania, M. A., Demartino, G. N., Baumeister, W. und 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.
- Kleinschmidt, J. A., Escher, C. und Wolf, D. L. (1988). Proteinase YscE of yeast shows homology with the 20S cylinder particles of *Xenopus laevis*. *FEBS Lett.* **293**, 35-40.
- Knight, C. G., Dando, P. M. und Barrett, A. J. (1995). Thimet oligopeptidase specificity: evidence of preferential cleavage near the C-terminus and product inhibition from kinetic analysis of peptide hydrolysis. *Biochem. J.* **308**, 145-150.
- Kopp, F., Dahlmann, B. und Hendil, K. B. (1993). Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J. Mol. Biol.* **229**(1), 14-19.
- Kraulis, P. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Leslie, A. G. W. (1994). *Mosflm user guide, mosflm version 5.2*. MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533-539.
- Lupas, A., Koster, A. J. und Baumeister, W. (1993). Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme & Protein* **47**, 252-273.
- Lupas, A., Zwickl, P. und Baumeister, W. (1994). Proteasome sequences in eubacteria. *Trends Biochem. Sciences* **19**, 533-534.
- Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1991). The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* **353**, 321-325.
- McPherson, A. (1982). Preparation and analysis of protein crystals. John Wiley & Sons, New York.
- McGuire, M. J. und DeMartino, G. N. (1986). Purification and characterization of a high molecular weight proteinase (macropain) from human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* **873**, 279-289.
- Merritt, E. A. und Murphy, M. E. P. (1994). Raster 3d version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Cryst.* **D50**, 869-873.
- Monaco, J. J. und McDevitt, H. O. (1982). Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3001-3005.
- Monaco, J. J. (1992). A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol. Today* **13**, 173-179.
- Morimoto, Y., Mitzushima, A., Yagi, N., Tanahashi, K., Tanaka, K., Ichihara, A. und Tsukihara, T. (1996). Ordered structure of the crystallized bovine 20S proteasome. *J. Biochem.* **117**, 471-474.
- Narayan, K. S. und Round, D. E. (1973). Minute-ring shaped particles in cultured cells of malignant origins. *Nature New Biol.* **243**, 146-150.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. und Honig, B. (1993). GRASP - graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.* **64**, A166.
- Niedermann, G., King, G., Butz, S., Birsner, U., Grimm, R., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. und Eichmann, K. (1996). The proteolytic fragments generated by vertebrate proteasomes: structural relationships to major histocompatibility complex class I binding peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8572-8577.
- Oakley, B. R., Kirsch, D. R. und Morris, N. R. (1980). A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **115**, 361-363.

- Orlowski, M. und Wilk, S. (1981). A multicatalytic protease complex from pituitary that forms enkephalin and enkephalin containing peptides *Biochem. Biophys. Res. Com.* **110**, 814-822.
- Knowlton, J. R., Johnston, S. C., Whitby, F. G., Realini, C., Zhang, Z. G., Rechsteiner, M. und Hill, C. P. (1997). Structure of the proteasome activator reg-alpha. *Nature* **396**, 639-643.
- Peters, J. M., Cejka, Z., Harris, J. R., Kleinschmidt, J. A. und Baumeister, W. (1993). Structural features of the 26 S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* **234**(4), 932-937.
- Peters, J. M. (1994). Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 377-382.
- Peters, J. M., Harris, J. R. und Finley, D. (1998). Ubiquitin and the biology of the cell. *Plenum Publishing Company Ltd*, London.
- Plunkett, G., Burland, V., Daniels, D. L. und Blattner, F. R. (1993). Analysis of the *Escherichia coli* genome. III. DNA sequence of the region from 87.2 to 89.2 minutes. *Nuc. Acids Res.* **21**(15), 3391-3398.
- Pühler, G., Weinkauff, S., Bachmann, L., Müller, S., Engel, A., Hegerl, R. und Baumeister, W. (1992). Subunit stoichiometry and three dimensional arrangements in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *EMBO*, **11**, 1607-1616.
- Ramos, P. C., Hockendorff, J., Johnson, E. S., Varshavsky und A., Dohmen, R. J. (1998). Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes is substrate upon completion of the assembly. *Cell* **92**, 489-499.
- Rechsteiner, M. (1988). Ubiquitin. *Plenum Press*.
- Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H. C., Moerschell, R. P., Yoo, S. J., Seol, J. H., Chung, C. H. und Goldberg, A. L. (1996). HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 5808-5813.
- Rivett, A. J. (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.* **291**, 1-10.
- Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Hengartner, C., Young, R. A., Goldberg, A. L. und Finley, D. (1996). Identification of the gal4 suppressor Sug1 as a subunit of the yeast 26S proteasome. *Nature* **379**, 655-657.
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. und 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.
- Rossmann, M. G. und Blow, D. M. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric subunit. *Acta Cryst* **15**, 15-31.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Sanger, F., Nickler, S. und Coulson A. R. (1977). DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5468.
- Schauer, T. M., Nesper, M., Kehl, M., Müllertaubenberger, A., Gerisch, G. und Baumeister, W. (1993). Proteasomes from *Dictyostelium discoideum* - characterization of structure and function. *J. Struc. Biol.* **111**, 135-145.
- Schägger, H. und Jagow, G. (1987). Tricine-sodiumdodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoreses for the separations of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Aanal. Biochem.* **166**, 368-379.
- Schmid, H. P., Akhayat, O., Martis De Sa, C., Puvion, F., Koeler und K. Scherrer, K. (1984). The prosome: an ubiquitous morphologically distinct rnp particle associated with repressed mna and containing specific scna and a characteristic set of proteins. *EMBO* **3**, 29-34.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Löwe, J., Huber, R., Kloetzel, P. M. und Schmidt, M. (1996). Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *EMBO* **15**, 6887-6898.
- Schoepfer, R. (1993). The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* **124**, 83-85.
- Seemüller, E., Lupas, A. und Baumeister, W. (1996). Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* **382**, 468-471.
- Seemüller, E., Lupas, A., Stock, D., Löwe, J., Huber, R. und Baumeister, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**, 579-582.
- Sibille, C., Gould, K. G., Willard-Gallo, K., Thomson, S., Rivett, A. J., Powis, S., Butcher, G. W. und De Baetselier, P. (1995). LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Biol.* **5**, 923-930.
- Sikorski, R. S. und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Spohr, G., Granboulan, N., Morel, C. und Scherrer, K. (1970). Messenger RNA in *hela* cells: an investigation of free and polyribosome-bound cytoplasmic messenger ribonucleoprotein particles by kinetic labeling and electron microscopy. *Eur. J. Biochem.* **17**, 296-318.
- Stock, D., Nederlof, P. M., Seemüller, E., Baumeister, W., Huber, R. und Löwe, J. (1996). Proteasome: from structure to function. *Curr. Opin. Biotech.* **7**(4) 376-385.
- Stohwasser, R., Kuckelkorn, U., Kraft, R., Kostka, S. und Kloetzel, P. M. (1996). 20S proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences. *FEBS Lett.* **383**, 109-113.
- Stout, G., H. und Jensen, L., H. (1989). X-ray structure determination. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1981). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.

- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., Demot, R. und Baumeister, W. (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome - the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr. Biol.* **5**, 766-774.
- Tamura, T., Tanaka, K., Kumatori, A., Yamada, F., Tsurumi, C., Fujiwara, T., Ichihara, A., Tokunaga, F., Aruga, R. und Iwanaga, S. (1990). cDNA cloning and sequencing of component C5 of proteasomes from rat hepatoma cells. *FEBS Lett.* **264**(1), 91-94.
- Tanaka, K., Ii, K., Ichihara, A., Waxman, L. und Goldberg, A. L. (1986). A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. *J. Biol. Chem.* **261**, 15197-15203.
- Tanaka, K., Yoshimura, T., Tamura, T., Fujiwara, T., Kumatori, A. und Ichihara, A. (1990). Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Lett.* **271**(1-2), 41-46.
- Tanaka, K., Tamura, T., Yoshimura, T. und Ichihara, A. (1992). Proteasomes: protein and gene structures. *New Biol.* **4**(3), 173-187.
- Tong, L. und Rossmann, M. G. (1990). The lokal rotation function. *Acta Cryst.* **A46**, 783-792.
- Townsend, A. und Trowsdale, J. (1993). The transporters associated with antigen presentation. *Semin. Cell Biol.* **4**, 53-61.
- Turk, D. (1992). Weiterentwicklung eines Programms für Molekulargraphik und Elektronendicht-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Dissertation Technische Universität München.
- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Eichelberger, M., Gaczynska, M., Nagashima, K., Rock, K. L., Goldberg, A. L., Doherty, P. C. und Tonegawa, S. (1994). Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* **1**(7) 533-541.
- Van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. und Vierstra, R. D. (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol. Cell Biol.* **16**(11) 6020-6028.
- Wilk, S. und Orlowski, M. (1980). Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J. Neurochem.* **35**, 1172-1182.
- Waxman, L., Fagan, J. M. und Goldberg, A. L. (1987). Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* **262**, 2451-2457.
- Woese, C. R., Kandler, O. und Wheelis M. L. (1990). Towards a natural system of organismus: proposal for the domains *archae*, *bacteria* and *eucarya*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.
- Yang, Y., Fruh, K., Ahn, K. und Peterson P. A. (1995). In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J. Biol. Chem.* **270**, 27687-27694.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-109.

- Yoo, S. J., Seol, J. H., Shin, D. H., Rohrwild, M., Kang, M. S., Tanaka, K., Goldberg, A. L. und Chung, C. H. (1996). Purification and characterization of the heat shock proteins HslV and HslU that form a new ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**(24), 14035-14040.
- York, I. A. und Rock, K. L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immuno.* **14**, 369-396.
- Yu, B., Pereira, M. E. und Wilk, S. (1993). Changes in the structure and catalytic activities of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex following dialysis. *J. Biol. Chem.* **268**(3), 2029-2036.
- Zwickl, P., Grziwa, A., Pühler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F. und Baumeister, W. (1992a). Primary structure of the *Thermoplasma* proteasome and its implications for structure, function and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry* **31**, 964-972.
- Zwickl, P., Lottspeich, F. und Baumeister, W. (1992b). Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **312**, 157-160.
- Zwickl, P., Kleinz, J. und Baumeister, W. (1994). Critical elements in proteasome assembly. *Nat. Struc. Biol.* **1**, 765-770.

## 7 Abkürzungen

Å	Angström (=0.1nm)
Ac	Acetyl
AMC	7-Aminomethylcoumarin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
βNA	2-Naphtylamid
bidest. H <sub>2</sub> O	Wasser der Qualität Millipor
BrAAP	<i>Branched chain aminoacid-prefering</i>
BSA	Rinder-Serum-Albumin
CL	<i>Chymotrypsin like</i>
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia choli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
γ-IFN	γ-Interferon
h	Stunde
HASYLAB	Hamburger Synchrotron-Strahlungslabor
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kDa	Kilodalton (1000u)
LB	Luria-Bertani
LMP	<i>Low molecular weight protein</i>
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
min	Minute
M	Mol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonat
M <sub>w</sub>	Molekulargewicht
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MPD	1-Methyl-1,4-pentandiol
Ncs	nicht kristallographische Symmetrie
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion



PEG	Polyethylenglykol
PGPH	<i>Peptidylglutamyl peptide hydrolase</i>
PIPES	1,4-Piperazin-bis-(2-ethansulfonsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfonat
SnAAP	<i>Small neutral aminoacid-prefering</i>
Suc	Succinyl
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tertramethyldiamin
TL	<i>Trypsin like</i>
Tricine	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
(w/v)	Masse pro Volumen (g/100ml)
(w/w)	Masseanteil an der Gesamtmasse
Z	Carbobenzoxy