

Thema „**Strukturelle und funktionelle Zusammenhänge und Unterschiede  
archaebakterieller und eukaryontischer 20S-Proteasome**“

Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach  
**Biochemie**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Herrn Dr. Michael Groll**

geboren am 23.09.1971 in Donauwörth

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen  
Prof. Dr. med Martin Paul

eingereicht am: 09/2003  
öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 22.11.2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. Walter Sebald  
2. Prof. Dr. Udo Heinemann

Meinen Eltern

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 1999 bis Februar 2003 am Universitätsklinikum Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Biochemie unter der Anleitung von Prof. Dr. Peter Klotzel durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Peter Klotzel möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, sein fortwährendes Interesse an den Projekten und für viele wertvolle Anregungen herzlich danken. Seine stete Diskussionsbereitschaft auch in Zusammenhang mit den Studenten während der verschiedenen Praktikums- und Seminarkurse sowie sein Wohlwollen waren für mich vorbildlich. Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. Robert Huber, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, für die außerordentlich gute Zusammenarbeit bei der Strukturaufklärung der verschiedenen Proteinkomplexe äußerst dankbar. Darüber hinaus ermöglichte mir Prof. Huber durch die Hilfestellungen bei Interpretationsproblemen in der Röntgenstrukturanalyse letztendlich die Fülle an den neugewonnenen Erkenntnissen.

Dr. Hans Brandstetter, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, möchte ich besonders für die mustergültige Unterstützung in der Datenauswertung sowie seiner fehlerfreien Assistenz in der Phasierungsproblematik der verschiedenen Projekte herzlich danken.

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

Ich möchte mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern für eine stets angenehme Zusammenarbeit bedanken. Mein Dank gilt im besonderen Dr. W. Heinemeyer und Prof. Dr. D. Wolf, Universität Stuttgart; Prof. Dr. D. Finley und Prof. Dr. M. Glickman, Harvard Medical School, Boston; Dr. G. Loidl, Dr. M. Kaiser und Prof. Dr. L. Moroder, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried; Prof. Dr. C. Crews, Yale University, New Haven; Dr. J. Kohno, Tanabe Seiyaku Co, Saitama; Prof. Dr. M. Bogyo, University of California, San Francisco.

Während meines Auslandsaufenthalts an der Harvard Medical School, Department of Cell Biology, Boston, wurde ich mit viel Wohlwollen in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. D. Finley, Prof. Dr. A. Goldberg, Prof. Dr. T. Walz und Prof. Dr. T. Rapoport aufgenommen und konnte überdies viele neue biochemische Methoden, aber auch Ansatzpunkte der biologischen Hinterfragung kennenlernen. Insbesondere stellte mir Prof. Finley ein komplettes Appartement für die gesamte Aufenthaltsdauer kostenlos zur Verfügung und Prof. Huber unterstützte

mich verständnisvoll weiterhin von finanzieller Seite. Zusammen mit Prof. Rapoport, Dr. A. Navon sowie Dr. T. Gonen erhielt ich auch neben den wissenschaftlichen Arbeiten viele schöne und in Erinnerung bleibende Eindrücke von Boston. Allen recht herzlichen Dank.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Dr. Walter Neupert, Institut für Physiologische Chemie, München, für die freundliche Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit sowie sein großes Interesse an meinen bisherigen und hoffentlich auch zukünftigen Arbeiten.

Ich danke besonders meinen lieben Eltern für das Vertrauen, die stete Unterstützung über all die Jahre hinweg, sowie für den starken Rückhalt und die Toleranz in schwierigen Situationen.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Rainer Friedrich für wertvolle sprachliche Verbesserungen in der vorliegenden Arbeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Proteolytische Enzyme.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Das Proteasom.....</b>	<b>3</b>
2.2.1	Funktion und Aufgabe des Proteasoms .....	3
2.2.2	Vorkommen des Proteasoms .....	4
2.2.3	Struktur und Aufbau des 20S-Proteasomkomplexes .....	4
2.2.4	Aufgaben der proteasomalen $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten .....	9
2.2.5	Das proteolytisch aktive Zentrum im 20S-Proteasom .....	10
2.2.6	Spezifitäten der S1-Taschen in eukaryontischen 20S-Proteasomen .....	13
2.2.7	Generierung von Oligopeptiden durch das 20S-Proteasom.....	15
2.2.8	Substratzugang in das 20S-Proteasom.....	17
<b>2.3</b>	<b>Inhalt der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Strukturelle Einblicke in die Reifung archaebakterieller 20S-Proteasome.....</b>	<b>19</b>
3.1.1	Das 20S-Proteasom aus <i>A. fulgidus</i> .....	19
3.1.2	Der $\alpha$ -Ring aus <i>A. fulgidus</i> : ein frühes Assemblierungsintermediat .....	19
3.1.3	Die $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Proteasommutante aus <i>A. fulgidus</i> : ein spätes Assemblierungsintermediat.....	21
<b>3.2</b>	<b>Proteolyse- und Autolysemechanismus von 20S-Proteasomen .....</b>	<b>23</b>
3.2.1	Der Mechanismus der Autoproteolyse .....	23
3.2.2	Die Funktion der $\beta$ -Propeptide.....	26
3.2.3	Die Funktion von Lys33 in der Proteolyse.....	27
<b>3.3</b>	<b>Substratzugang zum proteolytisch aktiven Zentrum in 20S-Proteasomen .....</b>	<b>29</b>
3.3.1	Strukturelle Unterschiede prokaryontischer und eukaryontischer 20S-Proteasome.....	29
3.3.2	Der Mechanismus der Kanalbildung in eukaryontischen 20S-Proteasomen.....	31
3.3.3	Die Regulatoren von eukaryontischen 20S-Proteasomen.....	34
3.3.4	Das <i>YDR-Motiv</i> in archaebakteriellen 20S-Proteasomen .....	35
<b>3.4</b>	<b>Inhibitoren des 20S-Proteasoms .....</b>	<b>37</b>
3.4.1	Kovalent bindende 20S-Proteasominhibitoren.....	37
3.4.2	Nicht kovalent bindende 20S-Proteasominhibitoren.....	43
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>46</b>
	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>53</b>
	<b>Lebenslauf und Publikationen.....</b>	<b>54</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>61</b>
	<b>Sonderdrucke.....</b>	<b>62</b>

## 1 Zusammenfassung

Die intrazelluläre Proteolyse ist ein für alle Zellen lebensnotwendiger Prozeß, der strenge Kontrollkriterien erfordert. In Eukaryonten verläuft der Proteinabbau generell über das Ubiquitin-Proteasom-System. Das 26S-Proteasom, eine molekulare Maschine bestehend aus mehr als 31 verschiedenen Proteinuntereinheiten und einem Molekulargewicht von etwa 2.5MDa bildet die proteolytische Hauptkomponente der Abbaumaschinerie. Der Komplex setzt sich aus dem proteolytisch aktiven 20S-Proteasom und zwei peripheren 19S-Regulator-kappen zusammen. Struktur, Organisation und enzymatischer Mechanismus sind bislang nur für das 20S-Partikel bekannt.

20S-Proteasome sind ubiquitär verbreitet und bauen sich immer aus vier übereinanderliegenden Ringen zu je sieben Untereinheiten mit einer  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie auf. Für die Bildung und Reifung der 20S-Protease ist es notwendig, daß eine etablierte Ordnung eingehalten wird, um den unkontrollierten und vorzeitigen Proteinabbau in der Zelle zu verhindern.

Aufgrund der strukturellen Charakteristika und des nukleophilen N-Terminus werden die 20S-Proteasome in die Klasse der Ntn-Hydrolasen eingruppiert. Die Hydrolyse von Substraten findet innerhalb der zentralen Kammer in den  $\beta$ -Untereinheiten statt. Das für die Spaltung der Peptidbindung notwendige Nukleophil ist das  $O^\gamma$  der Hydroxylgruppe der N-terminalen Threonine der  $\beta$ -Untereinheiten. Die Freisetzung der proteolytisch aktiven Threonine findet im finalen Assemblierungsschritt über eine N-O-Acetyl-Umlagerung statt, gefolgt von der intramolekularen Autolyse der Gly(-1)-Thr1-Bindung in den  $\beta$ -Precursor-komplexen.

Die Kompartimentierung in 20S-Proteasomen erfordert hohe Anforderungen für den Zugang von Substraten in das Partikelinnere sowie für die Freigabe der bereits vollständig gespaltenen Produktfragmente. Eukaryontische 20S-Partikel verfügen über einen Regulationsmechanismus, der zwischen latenter und aktiver Konformation im Molekül unterscheidet. In archaebakteriellen 20S-Proteasomen ist diese Steuerkomponente dagegen nicht vorhanden.

Der kontrollierte Abbau von Proteinen über das Proteasom beeinflusst eine Vielzahl biologischer Prozesse in der Zelle, wie metabolische Adaption, Apoptose, Entzündungsbildung, Immunantwort, Streßantwort, Zelldifferenzierung oder Zellteilung. Möglicherweise finden bereits verfügbare reversible, selektive und spezifische 20S-Proteasominhibitoren in Zukunft Anwendung als Medikamente für die Bekämpfung von Karzinomen oder als Antiphlogistika.

## 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 Klassen 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 |
| 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 *et al.*, 1998). Dieser Multiproteinkomplex besitzt eine Masse von ca. 2000kDa und wird heute **26S-Proteasom** genannt (Arrigo *et al.*, 1988); (DeMartino *et al.*, 1989); (Hoffman *et al.*, 1992).

## 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, 1994). Das 26S-Proteasom ist hierfür das wichtigste proteolytische Element (für eine Übersicht siehe (Coux *et al.*, 1996); (Bochtler *et al.*, 1999); (Groll *et al.*, 2003b). Es reguliert über seine verschiedenen aktiven Zentren eine Vielzahl biologischer 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 unter ATP-Verbrauch über eine Isopeptidbindung kovalent mit Ubiquitin, einem Polypeptid von 76 Aminosäuren, verknüpft werden (Hershko&Ciechanover, 1998). Erst die so markierten Moleküle werden ebenfalls in einer ATP-abhängigen Reaktion vom 26S-Komplex erkannt, entfaltet und hydrolysiert (Voges *et al.*, 1999). Das 26S-Proteasom besteht aus dem zentralen 20S-Proteasom (KP, Kernpartikel) und zwei peripheren 19S-Regulatorkappen (RP, auch PA-700-Komplex genannt), welche über ATP-Hydrolyse die Ubiquitinerkennung, die Proteinentfaltung und die Proteintranslokation verantworten. Die proteolytische Schlüsselkomponente des 26S-Proteasomkomplexes ist das 20S-Proteasom (E.C. Nummer 3.4.99.46 (Enzyme Nomenclature Recommendations, 1984)). Die vorliegende Arbeit befaßt sich hauptsächlich strukturell und funktionell mit dem 20S-Kernpartikel.



### 2.2.2 Vorkommen des Proteasoms

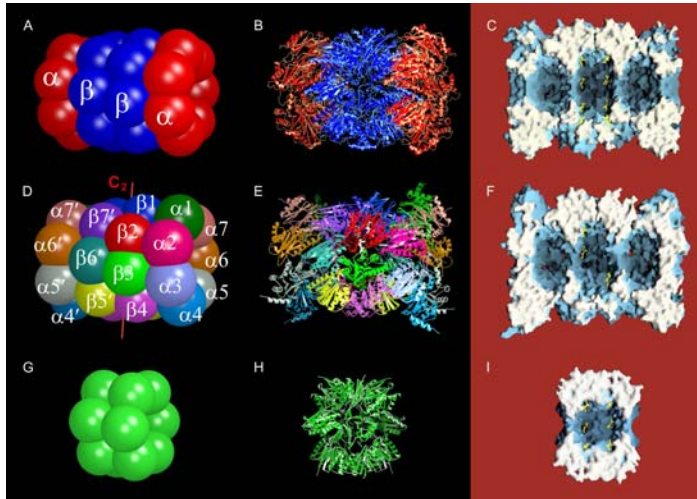
In Säugern befindet sich der höchste 20S-Proteasomenanteil, mit Konzentrationen bis zu einem Prozent der löslichen Zellproteine, in Leber und in Niere (Peters, 1994). In eukaryontischen Zellen kann die Protease im Nukleus, im Cytosol und als Assoziat mit dem endoplasmatischen Retikulum sowie mit dem Zytoskelett nachgewiesen werden (Scherrer *et al.*, 1994). Sie wurde bereits aus vielen Organismen unter verschiedensten Namen isoliert (Woese *et al.*, 1990). Heute hat sich die Bezeichnung 20S-Proteasom durchgesetzt (Falkenburg *et al.*, 1988); (Arrigo *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). Anfangs wurde vermutet, daß in Eubakterien keine proteasomverwandten Proteine vorkommen. Mit der Aufklärung des Genoms von *Escherichia coli* wurde aber die Existenz eines Gens einer proteasomähnlichen Untereinheit ClpP (hslV) gefunden (Chuang *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 erythropolis* (Tamura *et al.*, 1995), womit sich eine ubiquitäre Verbreitung dieser Protease in allen drei Lebensbereichen zeigt. Mittlerweile sind mehr als 70 Sequenzen von 20S-Proteasomuntereinheiten aus verschiedenen Organismen publiziert, die eine eigene Klasse von Proteinen darstellen. Sie weisen bislang keine Ähnlichkeit zu anderen Proteasefamilien auf. Zueinander besitzen die Untereinheiten eine hohe Sequenzhomologie und deuten auf einen gemeinsamen Vorläufer hin (Löwe *et al.*, 1995); (Coux *et al.*, 1996); (Bochtler *et al.*, 1999). Die 20S-Proteasomsequenzen werden bezüglich der archaeobakteriellen Untereinheiten in zwei Gruppen,  $\alpha$  und  $\beta$ , klassifiziert - das 20S-Proteasom aus dem Archaeobakterium *T. acidophilum* wurde deshalb auch als 'Urproteasom' bezeichnet (Zwickl *et al.*, 1992).

### 2.2.3 Struktur und Aufbau des 20S-Proteasomkomplexes

Das Molekulargewicht von 20S-Proteasomen beträgt ca. 700kDa. Anfangs lieferten elektronenmikroskopische Untersuchungen an humanen Erythrozyten nur eine niederaufgelöste Struktur der 20S-Partikel. Dabei zeigen die Moleküle eine zylinderförmige Struktur mit den ungefähren Abmessungen von 120Å x 160Å (Harris, 1968). Der Komplex bildet sich aus vier Lagen übereinanderliegender Ringe, von denen jeder einzelne aus je sieben Untereinheiten besteht (Hegerl *et al.*, 1991); (Pühler *et al.*, 1992) (siehe Abb. 1a,d,g). Der strukturell

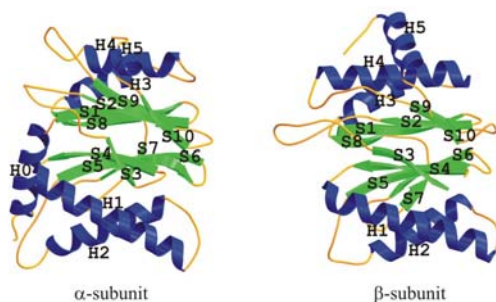
detaillierter Aufbau von 20S-Proteasomen konnte jedoch erst mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden. Im folgenden wird auf die Kristallstrukturen von 20S-Proteasomen aus Archaeobakterien (*T. acidophilum*), Eubakterien (*E. coli*) und Eukaryonten (*Saccharomyces cerevisiae*) eingegangen.



**Abb.1:** Kugelmodell (A, D und G), Ribbonplot (B, E und H) und Oberflächenmodell (C, F und I) der 20S-Proteasome aus *T. acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995), *S. cerevisiae* (Groll *et al.*, 1997) und *E. coli* (Bochtler *et al.*, 1997). Für die Oberflächenmodelle wurden die Moleküle entlang der nichtkristallographischen Symmetrie- bzw. Pseudosymmetrieachse aufgeschnitten. Die Schnittflächen sind weiß eingefärbt und die aktiven  $\beta$ -Untereinheiten mit dem Calpain-Inhibitor I komplexiert. Der Inhibitor ist als *ball-and-sticks* in gelb eingezeichnet.

### Das 20S-Proteasom aus dem Archaeon *T. acidophilum*

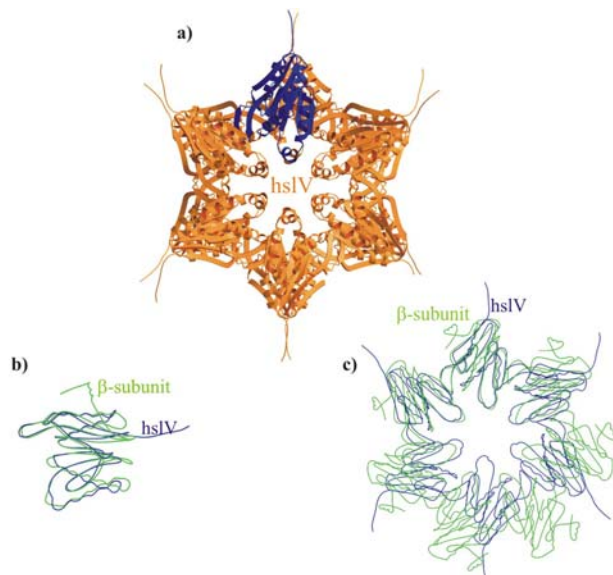
Die Kristallstruktur des *Thermoplasma*-20S-Proteasoms bei 3.4Å Auflösung zeigt dieses als ein zylinderförmiges Partikel (148Å x 113Å) mit einem durchgängigen zentralen Kanal und drei großen Kammern (Löwe *et al.*, 1995); (Stock *et al.*, 1996) (*siehe Abb. 1a-c*). Aus dem Strukturmodell ergibt sich für den 20S-Komplex eine  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie mit einer 72 Punktgruppensymmetrie. Die beiden äußeren Kammern werden von den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ring gebildet und die mittlere Kammer, in der die Proteolyse stattfindet, wird alleine von den  $\beta$ -Ring gebildet. Obwohl die Primärsequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zueinander nur geringe Homologien 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. 2*).



**Abb. 2:** Ribbonplot der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aus *T. acidophilum* (Löwe *et al.*, 1995). Die Helices und Faltblätter sind in blau bzw. grün eingezeichnet und die Sekundärstrukturelemente von H0 bis H5 bzw. von S1-S10 schwarz beschriftet.

### Das 20S-Proteasom aus Eubakterien

Bislang existiert keine Kristallstruktur von 20S-Proteasomen aus Eubakterien. Sequenzüberlagerungen erlauben aber eine Vorhersage, daß die 20S-Komplexe in diesen Organismen eine ähnliche Quartärstruktur wie die der archaebakteriellen 20S-Partikel aufweisen (Löwe *et al.*, 1995). Beispielsweise enthält das 20S-Proteasom aus *Rhodococcus erythropolis* vier verschiedene Untereinheiten, wobei zwei der  $\alpha$ - und zwei der  $\beta$ -Familie zugeordnet werden können (Tamura *et al.*, 1995). Die Anordnung und Zusammensetzung dieser Untereinheiten im 20S-Partikel ist nicht verstanden. Mit Ausnahme der Actinomyceten besitzen die Eubakterien keine 20S-Proteasome. Jedoch exprimieren diese Organismen, wie beispielsweise *E. coli*, mit dem Operon HslV einen Proteinasekomplex, der auf eine starke strukturelle Verwandtschaft mit der  $\beta$ -Familie der 20S-Proteasome hindeutet (Bochtler *et al.*, 1997). Der Komplex unterscheidet sich aber deutlich von dem der 20S-Proteasome (Rohrwild *et al.*, 1996). So verfügt HslV über keine sequenzverwandten  $\alpha$ -Untereinheiten, und die beiden Ringe setzen sich jeweils aus nur sechs Untereinheiten zusammen ( $\beta_6\beta_6$ -Stöchiometrie; *siehe Abb. 1g-i*). Für die Abweichung in der Stöchiometrie der Ringzusammensetzung in HslV könnte ein wesentlicher Grund das Fehlen der proteasomalen C-terminalen Helix H5 sein, wodurch für die Untereinheiten in HslV eine dichtere Packung und somit eine hexamere Anordnung zulässig ist (*siehe Abb. 3*).

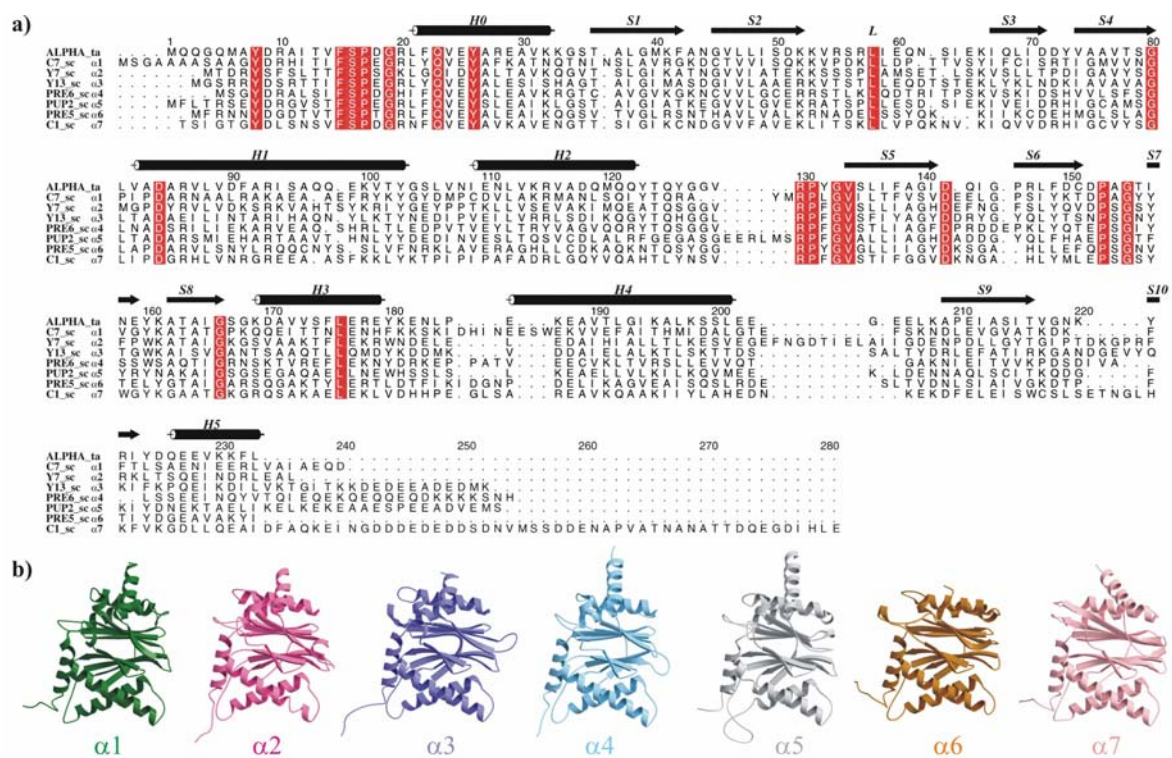


**Abb. 3:** a) Ribbonplot der hslV-Protease. Eine der hslV-Untereinheiten ist in blau eingezeichnet, während die restlichen in braun dargestellt sind. b) Überlagerung einer hslV-Untereinheit mit der  $\beta$ -Untereinheit des *Thermoplasma*-20S-Proteasoms. Die Strukturüberlagerung der beiden Moleküle zeigt eine nahezu identische Faltung; allerdings enthalten die hslV-Untereinheiten nicht die in 20S-Proteasomen gefundene C-terminale Helix H5. c) Struktureller Vergleich des hexameren hslV-Ringsystems mit dem heptameren *Thermoplasma*-20S-Proteasom- $\beta$ -Ring. In der Abbildung wurden die beschrifteten Untereinheiten strukturell überlagert und anhand der neu generierten Koordinaten die jeweiligen Ringsysteme aufgebaut (Bochtler *et al.*, 1997).

### Das 20S-Proteasom aus Eukaryonten

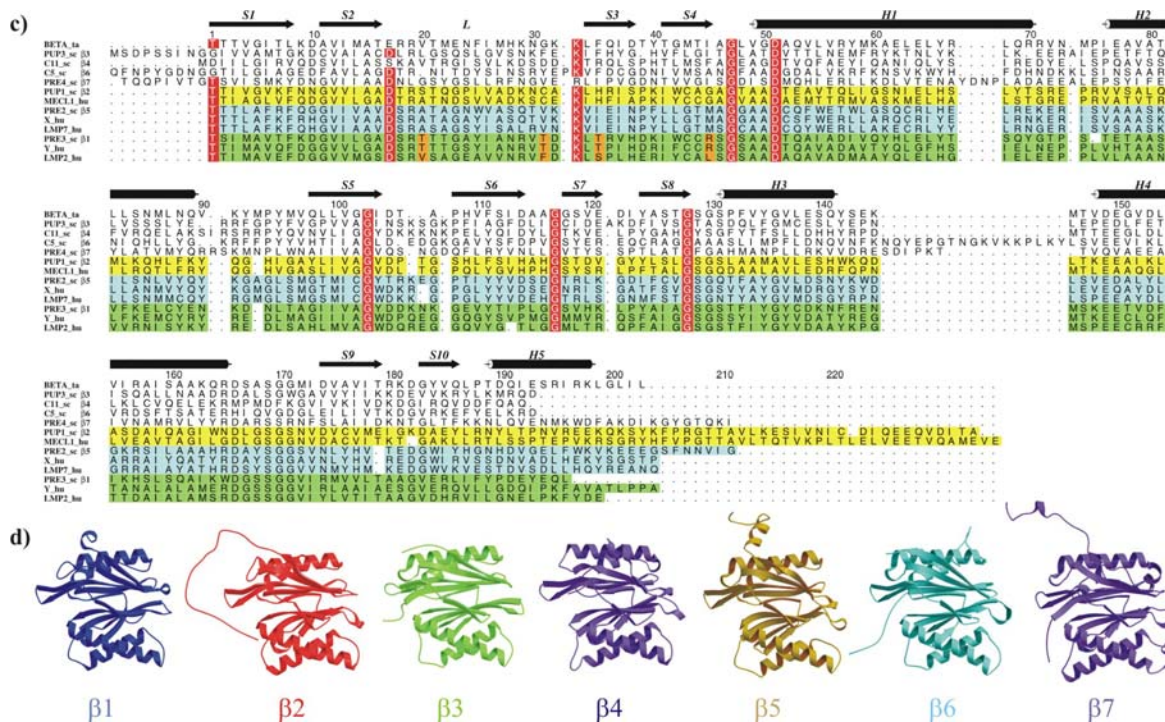
Eukaryontische 20S-Proteasome enthalten mindestens 14 verschiedene Untereinheiten von 21-34kDa (Rivett, 1989). Die Quartärstruktur des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae* ist

der des Komplexes aus *T. acidophilum* homolog (Groll *et al.*, 1997) (siehe Abb. 1d-f). Es handelt sich ebenfalls um ein zylinderförmiges Partikel (148 Å x 113 Å) mit drei großen Kavitäten. Die Moleküle besitzen eine pseudo-siebenzählige Symmetrie und bestehen aus zwei identischen Hälften ( $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}$ ;  $\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ ) die über eine zweizählige Rotationssymmetrie zueinander in Beziehung stehen (Kopp *et al.*, 1993). Die Kristallstruktur des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae* zeigt die räumliche Anordnung und Faltung der 14 verschiedenen Untereinheiten im 20S-Komplex (Groll *et al.*, 1997). Mit Hilfe der Struktur wurde eine neue Nomenklatur der 20S-Proteasomuntereinheiten eingeführt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wird. Die Numerierung der Aminosäuren in den Untereinheiten erfolgt analog einer Sequenzüberlagerung mit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aus *T. acidophilum* (siehe Abb. 4a,c). Alle 14 verschiedene Untereinheiten nehmen in der Struktur des Moleküls definierte Positionen ein. Sie sind mit Ausnahme weniger Insertionssegmente und Kettenenden in der Elektronendichte vollständig repräsentiert. Analog der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aus *T. acidophilum* besitzen sie je zwei fünfsträngige antiparallele  $\beta$ -Faltblätter, flankiert von Helices (siehe Abb. 4b,d).



**Abb. 4:** a) Sequenzüberlagerung der einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten aus *S. cerevisiae* und *T. acidophilum*. Konservierte Aminosäuren sind in rot eingefärbt,  $\beta$ -Stränge in Pfeil und Zylinderform dargestellt. b) Ribbonplot der einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten aus *S. cerevisiae*. Die Orientierung ist identisch zu der in Abb. 2 dargestellten Untereinheiten aus *T. acidophilum*.





c) Sequenzüberlagerung der einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten aus *S. cerevisiae* 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. Konservierte Aminosäuren sind in rot eingefärbt,  $\beta$ -Stränge in Pfeil und Zylinderform dargestellt. Die Aminosäuren 20, 31, 35 und 45 für  $\beta 1$  sind als spezifische Reste der S1-Tasche orange eingefärbt. d) Ribbonplot der einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten aus *S. cerevisiae*.

Die Überlagerung der sieben  $\alpha$ - und sieben  $\beta$ -Untereinheiten aus *S. cerevisiae* mit den *T. acidophilum*-Homologen deutet auf eine große Ähnlichkeit der Sekundärstruktur der proteasomalen Elemente hin. Allerdings befinden sich Unterschiede zwischen den einzelnen Untereinheiten in um bis zu zwei Aminosäureresten verlängerten Schleifen, langen Insertionen mit Sekundärstrukturelementen und den N- bzw. C-Termini (für die im Detail beschriebenen Abweichungen der Tertiärstrukturen der einzelnen Untereinheiten wird auf die Publikation Groll *et al* 1997 verwiesen). Viele dieser spezifischen strukturellen Besonderheiten in den einzelnen Untereinheiten sind an den Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten beteiligt. Diese bestimmen alle 14 verschiedenen Untereinheiten je zweimal an wohldefinierten Positionen im 20S-Partikel (siehe Abb. 5).



Abb. 5: Ausschnitt aus der Hefe-20S-Proteasomstruktur. Die  $C_{\alpha}$ -Ketten der Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 6'$  und  $\beta 7'$  sind in den Farben blau, rot, grün, zyan und lila dargestellt. Die für die verschiedenen Untereinheiten charakteristischen Wechselwirkungen sind als verstärkte Linien hervorgehoben

Bislang konnten elektronenmikroskopische Studien mit monoklonalen Antikörpern im 20S-Komplex aus *H. sapiens* die Besetzung der Untereinheiten analog zu *S. cerevisiae* identifizieren (Dahlmann *et al.*, 1999). Eine 20S-Proteasomkristallstruktur von Säugern gibt es nur von Rinderleber, die bezüglich der dreidimensionalen Struktur dem Hefe-20S-Proteasom identisch ist (Unno *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten eine universelle Architektur der Untereinheiten aller eukaryontischer 20S-Proteasome an.

## 2.2.4 Aufgaben der proteasomalen $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheiten

### Aufgaben der $\alpha$ -Untereinheit

Die N-Termini der  $\alpha$ -Untereinheiten enthalten mit der Helix H0 ein konserviertes Strukturmotiv, welches in den  $\beta$ -Untereinheiten fehlt, das aber für die 20S-Proteasomassemblierung wesentlich ist (Löwe *et al.*, 1995). Bestimmte  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen ebenso eine 'shuttling sequence', die den Austausch der 20S-Proteasome zwischen Cytosol und Kern ermöglicht (Tanaka *et al.*, 1990); (Lehmann *et al.*, 2002). Es wird vermutet, daß der Import des 20S-Proteasoms in den Kern auf phosphorylierungsbedingte Konformationserkennungen bestimmter Untereinheiten zurückzuführen ist. 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.*, 1991). Im gereiften 20S-Komplex bildet der  $\alpha$ -Ring eine physikalische Sperre (siehe 2.2.8 und 3.3), welche den Zugang gefalteter, cytosolischer Proteine in die innere proteolytische Kammer einschränkt (Löwe *et al.*, 1995). Zusätzlich befinden sich am  $\alpha$ -Ring Bindemotive für den 19S- (PA700), 11S- (PA28, PA26) und Blm3-Regulationskomplex, welche die proteolytischen Aktivitäten des 20S-Proteasoms modulieren (Voges *et al.*, 1999); (Li *et al.*, 2001); (Ustrell *et al.*, 2002).

### Aufgaben 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 (Autolyse) oder partiell prozessiert werden. Über den Schritt der Autolyse entstehen in den  $\beta$ -Untereinheiten mit den N-terminalen Threoninen die proteolytisch aktiven Zentren (Löwe *et al.*, 1995); (Ditzel *et al.*, 1998). In archaebakteriellen 20S-Proteasomen verhindert die Deletion der Prosequenz nicht die Synthese des funktionsfähigen Komplexes (Zwickl *et al.*, 1994), während in Eukaryonten diese Segmente für den Aufbau der 20S-Proteasome notwendig sind. So besitzen Hefe-

stämme, in denen die 20S-Proteasomuntereinheiten ohne Propeptide exprimieren, einen Phänotyp, der im schlimmsten Fall nicht überlebensfähig ist, wie am Beispiel der Untereinheit  $\beta 5$  gezeigt wurde (Chen *et al.*, 1996). Eine wesentliche Funktion der Propeptide ist der spezifische Einbau von  $\beta$ -Untereinheiten in das 20S-Proteasom. So bewirkt die Deletion des Propeptids von  $\beta 5i$ , daß das gereifte 20S-Proteasom nur die  $\beta 5$  und nicht mehr die  $\beta 5i$ -Untereinheit enthält (Schmidt *et al.*, 1999).

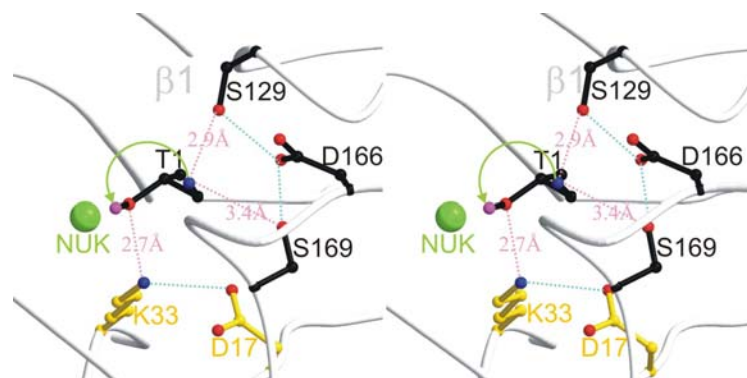
### **Regulierte Expression von 20S-Proteasomuntereinheiten in Säugern**

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 ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$ ) gegen drei neu synthetisierte LMP-Untereinheiten ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$ ) (Frentzel *et al.*, 1993); (Brown *et al.*, 1993); (Akiyama *et al.*, 1994); (Groettrup *et al.*, 1997). Das Vorkommen der Untereinheiten ist abhängig vom Zellentwicklungsstadium und der Gewebeart. Beispielsweise wurden in der Rinderhypophyse 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 (Kloetzel, 2001). Der Mechanismus der Substitution von Untereinheiten ist bislang kaum verstanden, lediglich, daß deren Einbau von der Stärke der Expression und zusätzlichen Assemblierungs-Cofaktoren abhängt (Früh *et al.*, 1994); (Ramos *et al.*, 1998); (Krüger *et al.*, 2001). Es gibt erste Befunde, daß die sogenannten immunoproteasomalen  $\beta i$ -Untereinheiten wichtigen Einfluß auf die Antigenpräsentation haben (Sibille *et al.*, 1995); (Stohwasser *et al.*, 1996); (Kloetzel, 2001) (*siehe* 2.2.6).

#### **2.2.5 Das proteolytisch aktive Zentrum im 20S-Proteasom**

In der *Thermoplasma*-20S-Proteasomstruktur mit gebundenem kompetitiven Inhibitor Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (Calpain-Inhibitor I) konnten die aktiven Zentren des Enzyms innerhalb der zentralen Kammer in jeder  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert werden (Löwe *et al.*, 1995) (*siehe* Abb. 1c,f,i). Der Tripeptidinhibitor bindet in einer ausgestreckten Konformation in die durch eine Schleife von zwei  $\beta$ -Faltblättern ausgeprägten hydrophoben 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<sup>γ</sup> der Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins der  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert. Das 20S-Proteasom

ist somit das erste Beispiel einer Threoninprotease, der detaillierte Reaktionsmechanismus blieb jedoch aufgrund der niederen Auflösung offen. Struktur- und Mutageneseuntersuchungen im *Thermoplasma*-20S-Proteasom konnten allerdings das katalytische System mit Thr1, Glu17 und Lys33 definieren. Zusätzlich befinden sich die Aminosäuren Ser129, Asp166 und Ser169 in der Nähe von Thr1 und tragen zur proteolytischen Aktivität bei, da sie für die strukturelle Integrität des aktiven Zentrums erforderlich sind (Löwe *et al.*, 1995); (Seemüller *et al.*, 1995). Die Röntgenkristallstruktur des Hefe-20S-Proteasoms bei 1.9Å Auflösung zeigt, daß im eukaryontischen 20S-Komplex nur drei der sieben verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten, nämlich  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  ein proteolytisch aktives Zentrum ausbilden (Groll *et al.*, 1997). Mit Hilfe der *Thermoplasma*- und der Hefe-20S-Proteasomstrukturen wurde erkannt, daß in allen proteolytisch aktiven Untereinheiten die Aminosäuren Thr1, Asp/Glu17, Lys33, Ser129, Asp166 und Ser169 invariant sind. Dieser Befund deutet auf einen identischen Proteolysemechanismus in 20S-Proteasomen hin.



**Abb. 6:** Stereoabbildung der räumlichen Anordnung der Aminosäuren rund um das Thr1 der proteolytisch aktiven Untereinheit  $\beta 1$ . Der Protein-backbone ist als weißer coil und die Aminosäuren Thr1, Asp17, Lys33, Ser129, Asp166 und Ser169, welche hauptsächlich für das nukleophile Zentrum verantwortlich sind, als balls-and-sticks dargestellt. Lys33 ist aufgrund der Bildung einer Salzbrücke mit Asp17 positiv geladen (zyane Rasterpunkte; beide Aminosäuren sind gelb eingezeichnet). Hierüber wird das elektrostatische Potential der Thr1O $^{\gamma}$ -Gruppe abgesenkt. In unmittelbarer Nachbarschaft zum Thr1 befinden sich die Aminosäuren Ser129, Asp166 und Ser169 (schwarz), welche für die konformelle Stabilität des Thr1 verantwortlich sind (lila Rasterpunkte). Das Wassermolekül NUK, eingezeichnet als grüne Kugel, befindet sich in der Elektronendichte nahe dem Thr1O $^{\gamma}$  und N und vermittelt einerseits über eine Shuttle-Funktion die Protonenübertragung, vom Thr1O $^{\gamma}$  zum N-Terminus (grüner Kreis) andererseits die Hydrolyse des Acylesterintermediats (Groll&Huber, 2003b).

Die hohe Auflösung im Hefe-20S-Proteasom lieferte weitere Kenntnisse bezüglich des proteolytischen Reaktionsmechanismus. So bildet das Thr1N eine Wasserstoffbrückenbindung zu Ser129O $^{\gamma}$ , Asp168O und Ser169O $^{\gamma}$ ; Thr1O $^{\gamma}$  zu Lys33N $^{\epsilon}$ . Asp17 erzeugt Wasserstoffbrücken über O $^{\gamma 1}$  zu Arg19N und Gly170N und über O $^{\gamma 2}$  zu Thr/Ser2N und Lys33N $^{\epsilon}$ . Der pKa-Wert und die Protonierung der relevanten ionisierbaren funktionellen Seitengruppen sind



unbekannt, aber das Muster der Wasserstoffbrückenbildung läßt vermuten, daß sowohl Asp17 als auch Lys33 geladen sind. Die positive Ladung von Lys33N<sup>e</sup> würde den intrinsischen pKa-Wert des Thr1O<sup>γ</sup> sowie des Thr1N verschieben und deren Nukleophilie verstärken. Thr1O<sup>γ</sup> reagiert daher mit den elektrophilen funktionellen Gruppen von Substraten und Inhibitoren, während Thr1N den Protonenakzeptor darstellt. Zusätzlich befindet sich in allen proteolytisch aktiven Untereinheiten nahe dem Thr1O<sup>γ</sup> und N, Ser129O<sup>γ</sup> und N sowie Gly47N ein vollständig gebundenes Lösungsmittelmolekül, bezeichnet als NUK. Die Funktion des Wassermoleküls liegt sowohl in der Protonenübertragung des Wasserstoffs vom Thr1O<sup>γ</sup> zum N-Terminus als auch in der Spaltung und damit Neugenerierung des Thr1O<sup>γ</sup> im Acylesterintermediat (*siehe Abb. 6*). Diese Annahme wird durch die Kristallstruktur des Komplexes des Hefe-20S-Proteasoms mit Lactacystin bekräftigt, in dem eine Esterbildung zwischen Lactacystin und Thr1O<sup>γ</sup> als Ergebnis einer β-Lactonringöffnung nach einem nukleophilen Angriff durch Thr1O<sup>γ</sup> zu beobachten ist. Eine analoge Reaktionssequenz wird für die Hydrolyse von peptidischen oder chromogenen Substraten vermutet.

Die Faltung der 20S-proteasomalen Untereinheiten stimmt weitgehend mit der Faltung einer Reihe von Hydrolasen überein, die jedoch zueinander keine Ähnlichkeiten in der Primärsequenz aufweisen. Bislang sind von dieser Proteinklasse 19 dokumentierte Kristallstrukturen in der PDB-Datenbank hinterlegt, wie beispielsweise die lysosomale Aspartylglucosaminidase (Oinonen *et al.*, 1995), die Penicillinacylase (Duggleby *et al.*, 1995), die Glutamin-PRPP-amidotransferase (Smith *et al.*, 1994) und die Glycosylasparaginase (Xu *et al.*, 1999). Die Proteine weisen zueinander kaum konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum auf, besitzen aber neben ihrem gemeinsamen Strukturmotiv alle einen nukleophilen N-Terminus (Brannigan *et al.*, 1995). Dies führte zu der Einteilung der Proteine in eine neue Familie, die Klasse der Ntn (N-terminal nukleophile)-Hydrolasen. Das im 20S-Proteasom zuvor beschriebene Lys33 ist in den Ntn-Hydrolasen nicht konserviert und deutet ebenso wie experimentelle Befunde an, daß der N-Terminus der Protonenakzeptor während der Peptidhydrolyse ist. Gleichermäßen zeigen die hinterlegten Kristallstrukturen von Ntn-Hydrolasen mit hoher atomarer Auflösung, wie beispielsweise die Penicillinacylase, am katalytischen Zentrum ein definiertes Wassermolekül, das in idealer räumlicher Anordnung für die Protonenübertragung sorgt. Es kann davon ausgegangen werden, daß der Reaktionsmechanismus aller Ntn-Hydrolasen in identischer Folge abläuft.

## 2.2.6 Spezifitäten der S1-Taschen in eukaryontischen 20S-Proteasomen

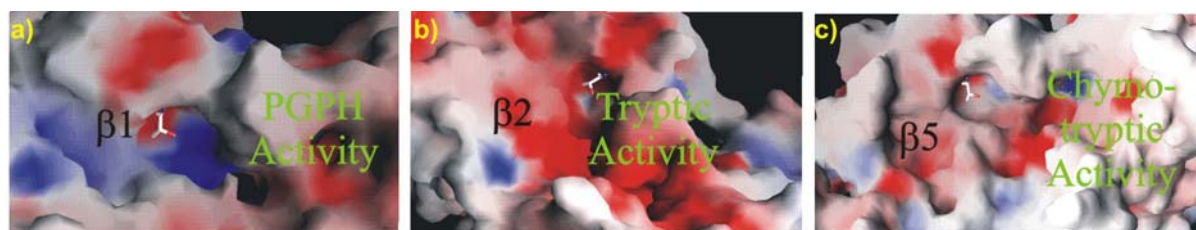
Eine besondere Eigenschaft eukaryontischer 20S-Proteasome ist die Vereinigung verschiedener Proteaseaktivitäten. So ergeben *in vitro*-Untersuchungen an eukaryontischen Zellen, daß die 20S-Partikel die Möglichkeit besitzen, nahezu nach jeder Aminosäure zu spalten (Arendt *et al.*, 1997); (Orlowski *et al.*, 2000). Allerdings zeigt die proteolytische Aktivität gegenüber chromogenen Testsubstraten fünf bevorzugte Schnittpräferenzen, die *Tabelle 1* zusammenfaßt (Orlowski *et al.*, 1993):

**Tabelle 1:** Bevorzugte Schnittpräferenzen eukaryontischer 20S-Proteasome

Name:	Chromogenes Substrat:
<i>Chymotrypsin like activity</i> (CL)	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC
<i>Trypsin like activity</i> (TL)	Bz-Val-Gly-Arg-AMC
<i>Peptidyl-glutamyl-protein-hydrolysing activity</i> (PGPH); <i>Caspase like activity</i>	Z-Leu-Leu-Glu-βNA
<i>Branched chain aminoacid preferring</i> (BrAAP)	Cbz-Gly-Gly-Leu-AMC
<i>Small neutral aminoacid preferring</i> (SNAAP)	Cbz-Gly-Pro-Ala-Gly-Gly-AMC

Bereits vor der Kenntnis des atomaren Aufbaus eukaryontischer 20S-Proteasome konnten im speziellen für die Untereinheit β5 die Proteolyseeigenschaften experimentell identifiziert werden. So besitzen 20S-Proteasome, deren Prosegment in β5 nicht mehr prozessiert wird (Chen&Hochstrasser, 1996) oder deren Mutation die β5-S1-Tasche deutlich verkleinert (Heinemeyer *et al.*, 1997), eine reduzierte chymotryptische Aktivität. Ebenso bewirkt der Inhibitor Lactacystin, der selektiv nur an die Untereinheit β5 bindet, lediglich Einfluß auf die CL-Aktivität (Fenteany *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse schließen eine gegenseitige allosterische Beeinflussung der proteolytisch aktiven Untereinheiten aus und stellen die Ursache für die verschiedenen Spaltungsspezifitäten im Molekül durch die vorhandenen charakteristischen S1-Taschen der proteolytisch aktiven Untereinheiten dar. Die Kristallstrukturen des Hefe-20S-Proteasoms in Komplex mit den Inhibitoren Calpain-Inhibitor I und Lactacystin lieferten eine ausführlichere Erklärung (Groll *et al.*, 1997). So befindet sich im Zentrum der S1-Tasche von β1 in Position 45 ein Arg, das mit Glutamaten gut interagieren kann und dieser Untereinheit die PGPH- oder Caspase-ähnliche Spaltungsspezifität verleiht (*siehe Abb. 7a*). Die vorhergesagte Spaltpräferenz wurde durch Mutageneseexperimente am proteolytisch aktiven Zentrum der Untereinheit β1 bestätigt (Heinemeyer *et al.*, 1997); (Ditzel *et al.*, 1998). Allerdings wurde in Abbauuntersuchungen von Enolase gefunden, daß die Untereinheit β1 neben der PGPH- auch limitierte BrAAP-Aktivität besitzt (Nussbaum *et al.*, 1998). Eine mögliche Erklärung für die duale Spalteigenschaft liefert die Kristallstruktur des Hefe-20S-Protea-

soms in Komplex mit dem Calpain-Inhibitor I, in der die apolare Inhibitor-Nle-Seitenkette mit der positiv geladenen S1-Tasche verankert vorliegt. Die Komplexstruktur zeigt zusätzliche Elektronendichte am Arg45, identifiziert als Bicarbonat-Anion, und begründet hierüber die Nle-Arg-Wechselwirkung. Die S1-Tasche der Untereinheit  $\beta 2$  ist durch das Gly45 sehr geräumig und deshalb bevorzugt für die Bindung großer Seitenketten geeignet. Neben einer großen Anzahl negativ geladener Aminosäuren, die der Untereinheit die charakteristisch tryptisch-ähnliche proteolytische Aktivität zuweisen, bildet Glu53 das Zentrum der S1-Tasche (siehe *Abb. 7b*). Diese Annahme wurde durch strukturelle Inhibitionsstudien von 20S-Proteasomen mit Mal- $\beta$ Ala-Val-Arg-CHO bzw. durch gezielten Thr1Ala-Austausch in der Untereinheit  $\beta 2$  bestätigt (Loidl *et al.*, 1999a); (Groll *et al.*, 1999); (Jäger *et al.*, 1999). Wie bereits angedeutet, besitzt die Untereinheit  $\beta 5$  die chymotrypsin-ähnliche proteolytische Aktivität. Nach der Struktur ist für diese Eigenschaft überwiegend das Met45 der Untereinheit  $\beta 5$  verantwortlich (siehe *Abb. 7c*). Jedoch ergeben Mutagenesestudien, daß die  $\beta 5$ -Untereinheit auch Substrate nach kleinen neutralen oder verzweigten Aminosäuren spaltet (SNAAP-, BrAAP-Aktivität) (Groll *et al.*, 1999). Eine Erklärung hierfür ist die freie Beweglichkeit des Met45, wodurch sich die Größe der S1-Tasche variieren läßt. So ist Met45 im Falle der Bindung von Lactacystin durch den engen Kontakt mit der verzweigten Seitenkette des Inhibitors Schlüsselkomponente für dessen Spezifität, während im 20S-Proteasom:Calpain-Inhibitor I-Komplex die sterisch anspruchsvolle Norleucinseitenkette die Met45-Seitenkette verschiebt und die S1-Tasche geräumiger erscheinen läßt (Groll *et al.*, 1997).



**Abb. 7:** a-c) Oberflächenmodell der drei verschiedenen proteolytisch aktiven Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  des Hefe-20S-Proteasoms. Die einzelnen Abbildungen zeigen das nukleophile Thr1 als *balls-and-sticks*. Basische Atome sind als blaue, saure Atome als rote und hydrophobe Atome als weiße Oberflächen eingezeichnet. In grün ist die für die jeweilige Untereinheit charakteristische Proteaseaktivität dargestellt.

Wie bereits beschrieben, findet in 20S-Säugerproteasomen 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. Es wurde gezeigt, daß diese ‚immuno‘-Untereinheiten die Anzahl der an der Zelloberfläche vorliegenden MHC-Klasse I-Moleküle regulieren (Fehling *et al.*, 1994); (Sibille *et al.*, 1995). Die Substitution der aktiven Untereinheiten durch die ‚immuno‘-Untereinheiten führt zur

Generierung von Peptiden, die über den C-terminalen *Anchorresidue* bevorzugt an MHC-Klasse I-Moleküle binden. Allerdings weisen die konstitutiven und die dazugehörigen ‚*immuno*‘-Untereinheiten einen hohen Grad an Sequenzidentität auf. Lediglich  $\beta 1i$  besitzt in der S1-Tasche zwei auffällige Unterschiede gegenüber der nicht  $\gamma$ -Interferon-induzierten Untereinheit, nämlich die Substitution von Thr31 zu Phe und von Arg45 zu Leu (*siehe Abb. 3c*). Modellierungen mit Hilfe der Hefe-20S-Proteasomkoordinaten zeigen, daß der Phe-Austausch die  $\beta 1i$ -S1-Tasche verkleinert und der Leu-Ersatz der  $\beta 1i$ -Spezifität apolaren Charakter verleiht. Dies bewirkt in ‚*immuno*‘-20S-Proteasomen einerseits eine reduzierte PGPH-, andererseits eine verstärkte chymotryptische und BRAAP-Aktivität (Groll *et al.*, 1997). Experimente in Zell-Linien von Mäusemutanten, denen die Expressionsfähigkeit der ‚*immuno*‘-Untereinheit  $\beta 1i$  fehlt, besitzen eine verminderte MHC-Klasse I-Präsentation (Driscoll *et al.*, 1993); (Gaczynska *et al.*, 1993); (Van Kaer *et al.*, 1994). Ein Grund für diese Beobachtungen liegt in der Antigenpräsentation, da die MHC-Klasse I-Moleküle bevorzugt Peptide mit basischen oder hydrophoben C-terminalen Aminosäuren einbauen (Engelhard, 1994). Bemerkenswerterweise führt die Substitution von  $\beta 2$  und  $\beta 5$  mit  $\beta 2i$  und  $\beta 5i$  zu keiner grundlegenden Änderung in der Anordnung und Spezifität der S1-Tasche. Jedoch ergaben *in vivo*-Experimente in mutierten Mäusen eine mechanistische Beeinflussung der MHC-Klasse I-Präsentation bezüglich der  $\beta 2i$ - und  $\beta 5i$ -Untereinheiten (Fehling *et al.*, 1994); (Stohwasser *et al.*, 1996). Die vorliegenden Kristallstrukturen der 20S-Proteasome aus Hefe und Rinderleber (Groll *et al.*, 1997); (Unno *et al.*, 2002) liefern hierfür keine Erklärung. Möglicherweise bewirkt der konservierte Ersatz der  $\beta 2$  und  $\beta 5$ -Untereinheiten eine Einschränkung in der Flexibilität und Größe der Spezifitätstaschen, wodurch ein entscheidender Einfluß auf die Schnittpräferenz entstehen könnte (*siehe 2.2.7*).

### 2.2.7 Generierung von Oligopeptiden durch das 20S-Proteasom

Das 20S-Proteasom generiert in der Regel Oligopeptide mit einer Länge von acht bis fünfzehn Aminosäuren. Es stellt sich daher die Frage, wie das Zusammenspiel der aktiven Untereinheiten die Produktverteilung steuert. Durch die reduzierte Anzahl proteolytisch aktiver Zentren in eukaryontischen 20S-Partikeln wurde anfangs vermutet, daß zusätzliche nicht Thr1-abhängige proteolytische Zentren existieren, die die Substrate unspezifisch nach bestimmter Länge spalten (Groll *et al.*, 1997). Einen Grund für diese Annahme lieferten die in der Kristallstruktur des Hefe-20S-Proteasoms ermittelten definierten Elektronendichten von den intermediär prozessierten inaktiven Untereinheiten  $\beta 6$  und  $\beta 7$ , deren Prosegmente jeweils

an der Grenzfläche der zentralen Kammer verankert vorliegen. Zusätzlich ergaben kristallographische Untersuchungen von verschiedenen Hefe-20S-Proteasommutanten, in denen proteolytisch aktive Zentren durch gezielte Punktmutationen inaktiviert wurden, weiterhin die definierte Elektronendichte sowie charakteristische Längenverteilung aller im Wildtyp auftretenden Prosegmente. Allerdings zeigt die N-terminale Sequenzierung der Untereinheiten  $\beta 6$  und  $\beta 7$  in 20S-Proteasommutanten mit proteolytisch deaktiviertem  $\beta 2$  im Vergleich zum Wildtyp verlängerte N-terminale Sequenzen, so daß diese Bereiche in den  $\beta 2$ -Mutanten lediglich einer kristallographischen Fehlordnung unterliegen (Ditzel *et al.*, 1998); (Groll *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse schließen zusätzlich vorkommende Endopeptidastellen in 20S-Proteasomen aus und weisen auf eine starke Umlagerung der teilprozessierten Propeptide  $\beta 6$  und  $\beta 7$  nach Hydrolyse an den proteolytisch aktiven Zentren hin.

Mit der Aufklärung der Kristallstruktur des 20S-Proteasoms aus *T. acidophilum* wurde postuliert, daß die Generierung der Oligopeptide vom Abstand der proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten abhängt (Löwe *et al.*, 1995). So beträgt die Distanz zweier benachbarter Threonine etwa 30Å und Peptide aus acht bis zehn Aminosäuren können diese in gestreckter Konformation gerade noch erreichen. In Hefe ist die Zahl der Proteolysezentren auf sechs reduziert. Zusätzlich ist es möglich, vier der sechs proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten,  $\beta 1$  und  $\beta 2$ , über einen Thr1Ala-Austausch zu inaktivieren (Heinemeyer *et al.*, 1997). Der Abstand der verbleibenden katalytisch aktiven  $\beta 5$ -Threonine beträgt etwa 49Å. Nach dem vorgeschlagenen Mechanismus der *Thermoplasma*-20S-Proteasom-Kristallstruktur wären in der Doppelmutante Produkte mit einer Länge von fünfzehn bis achtzehn Aminosäuren zu erwarten. Inkubationsversuche mit thermolabiler Hefe-Enolase zeigten jedoch, daß die Doppelmutante analog dem Wildtyp Proteolyseprodukte mit einer durchschnittlichen Längenverteilung von acht bis fünfzehn Aminosäuren liefert (Nussbaum *et al.*, 1998). Die einzelnen Fragmente der jeweiligen Experimente, Wildtyp und Doppelmutante, wurden über *reversed phase* LC-MS und N-terminale Sequenzierung identifiziert und wiesen lediglich Unterschiede in Bezug auf die Schnittstellen auf. Somit bildet in 20S-Proteasomen der etwa acht Aminosäure lange Kanal zum Thr1 eine Andockstelle für Substrate und ist das mittlere Maß für die Produktverteilung. Die Charakteristika der S1-S8-Taschen in den verschiedenen Untereinheiten bewirken für Substrate je nach Bindung unterschiedlich lange Verweilzeiten am Katalysezentrum und geben hierüber die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Proteolyse und damit die auftretende Schnittpräferenz wieder. Die Aufenthaltsdauer der Edukte und Produkte im 20S-Proteasom ist durch das gesamte Kanalsystem im Molekül vorgegeben und

erlaubt in der Regel eine Produktverteilung von 8-15 Aminosäuren (*siehe 2.2.8 und 3.3*). Eine Begründung hierfür liefert die ähnlich hohe mittlere Umsatzrate von thermolabiler Hefe-Enolase im Wildtypproteasom als auch in den proteolytisch reduzierten 20S-Proteasommutanten. Damit ist in 20S-Proteasomen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Zugänglichkeit der Substrate in das Molekülinnere sowie die Freilassung der Produkte aus der zentralen Kammern und nicht die Proteolysereaktion an den aktiven Untereinheiten. Möglicherweise ist dies ein Grund für die reduzierte Anzahl proteolytisch aktiver Untereinheiten in eukaryontischen 20S-Proteasomen, die sich über den Evolutionsverlauf gebildet haben. Nennenswert in diesem Zusammenhang sind jedoch die voneinander unterschiedlichen S1-Taschen in den wenigen verbleibenden proteolytisch aktiven Zentren, die eine nahezu unspezifische Spaltung der selektierten Substrate bezüglich der P1-Position ermöglichen (*siehe 2.2.6*).

### 2.2.8 Substratzugang in das 20S-Proteasom

Wie beschrieben befinden sich die proteolytisch aktiven Zentren des 20S-Proteasoms innerhalb der zentralen Kammer. Die Substrate müssen umprozessiert zu werden somit in das Partikelinnere eindringen und werden daraufhin zu Oligopeptiden fragmentiert, die anschließend wieder freigesetzt werden. Das 20S-Proteasom aus *T. acidophilum* zeigt in der Kristallstruktur an den  $\alpha$ -Ringen zwei Eintrittsöffnungen von 13Å, die durch eine Ringfläche von Schleifen-formierenden Tyr126-Gly-Gly-Val-Segmenten der sieben identischen  $\alpha$ -Untereinheiten begrenzt sind. Der Durchmesser der Öffnung in den  $\beta$ -Ringen ist mit 22Å etwas größer (Löwe *et al.*, 1995) (*siehe Abb. 1c*). Die N-terminalen 12 Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheiten befinden sich nahe der Eintrittsöffnung, sind aber in der Elektronendichte nicht definiert. Über die Funktion der N-Termini kann lediglich spekuliert werden. Allerdings ist die Eingangspore mit 13Å nur geringfügig größer als der Durchmesser einer  $\alpha$ -Helix, so daß der Zugang für den Durchlaß von gefalteten Proteinen nicht ausreicht. Dadurch entsteht im *Thermoplasma*-20S-Proteasom eine wichtige Steuerstelle für den regulierten und stufenweisen Abbau von Substraten, da die engen Einschnürungen für einen limitierten Zugang der Proteine sorgen und verhindern, daß teilweise abgebaute Polypeptide den Proteinkomplex vorzeitig verlassen (*siehe 2.2.7*).

Im Gegensatz zum *Thermoplasma*-20S-Proteasom ist die hydrolytische Kammer des Hefe-20S-Proteasoms für Substrate nahezu unerreichbar (*siehe Abb. 1f*). Die N-Termini im speziellen von  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_4$  bilden ineinander eine aus mehreren Schichten bestehende

Struktur, die den  $\alpha$ -Ring vollständig verschließt und somit einen Substrateintritt ohne Umlagerung nicht mehr gewährleistet. Das 19S-Partikel, welches für die ATP- und ubiquitinabhängige Proteolyse durch das Proteasom verantwortlich ist, bindet ATP-abhängig an die beiden Pole des 20S-Zylinders und bildet damit das 26S-Proteasom. Diese Assoziation führt zu einer vielfachen Erhöhung der katalytischen Aktivität gegenüber chromogenen und natürlichen Substraten (DeMartino *et al.*, 1994); (Hoffman *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß die Regulatorkappen Konformationsänderungen der  $\alpha$ -Ringsysteme und somit Zugang in das 20S-Partikel bewirken (*siehe 3.3*).

### 2.3 Inhalt der vorliegenden Arbeit

Die proteasomalen Kristallstrukturen aus den verschiedenen Organismen konnten bereits viele Fragen beantworten und neue Ideen bereitstellen. Einige funktionelle Zusammenhänge sind jedoch mit den bisher erarbeiteten Strukturkenntnissen der 20S-Proteasome nicht erklärbar, wie der Mechanismus des Partikelzusammenbaus, der Einfluß benachbarter Aminosäuren für das proteolytisch aktive Thr1, der Transport von markierten und entfalteten Substraten in das Molekülinnere eukaryontischer 20S-Proteasome sowie die Wirkung einer Vielzahl von Inhibitoren und deren therapeutisches Interesse.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch Kombination von biochemischen und kristallographischen Untersuchungen eine strukturbasierte Funktionsanalyse an 20S-Proteasomen durchgeführt: (1) Strukturelle Untersuchungen von frühen und späten Assemblierungsintermediaten des 20S-Proteasoms aus *A. fulgidus*. (2) Aufklärung des Mechanismus der Autolyse, Beiträge einzelner benachbarter Aminosäuren zum Mechanismus der Proteolyse durch ortsgerichtete Mutagenese, Einfluß der Prosegmente auf die Ausbildung der proteolytisch aktiven Zentren und Reaktivierungsstudien inaktiver  $\beta$ -Untereinheiten im Hefe-20S-Proteasom. (3) Untersuchungen zum Mechanismus des regulierten Substrattransports in eukaryontische und archaebakterielle 20S-Proteasome. (4) Kristallstrukturanalysen, Modellierungen, Totalsynthesen und Ermittlungen der Bindemodi von synthetischen und natürlichen spezifischen 20S-Proteasominhibitoren. Für eine ausführlichere Darstellung der in der vorliegenden Arbeit zusammengefaßten Ergebnisse wird auf die im Anhang unter dem Kapitel: *Eigene publizierte Arbeiten* aufgeführten Veröffentlichungen verwiesen.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Strukturelle Einblicke in die Reifung archaebakterieller 20S-Proteasome

#### 3.1.1 Das 20S-Proteasom aus *A. fulgidus*

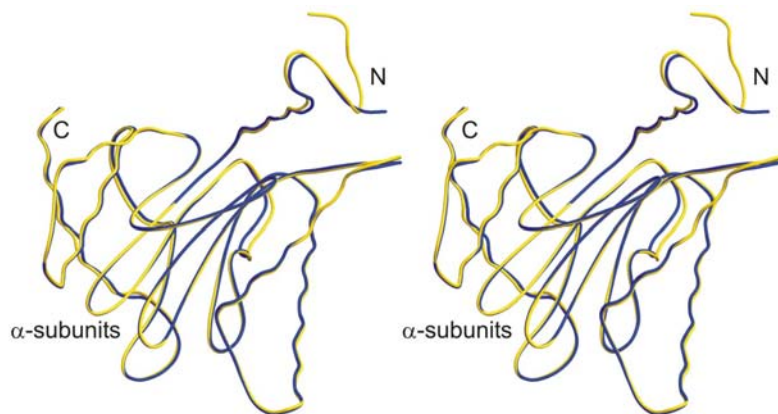
20S-Proteasome erreichen über ein kompliziertes Wechselspiel der Untereinheiten bezüglich Faltung, Zusammenbau und Prozessierung ihren letztendlich gereiften und proteolytisch aktiven Zustand. Im Gegensatz zu eukaryontischen 20S-Proteasomen erfolgt der Partikelbau in Archaeen ohne Verwendung von zusätzlichen Chaperonen (Zwickl *et al.*, 1992). Beispielsweise ist es möglich, rekombinant in *E. coli* die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aus dem Organismus *Archaeoglobus fulgidus* getrennt zu exprimieren und zu reinigen (Groll *et al.*, 2003a). Nach dem Mischen von stöchiometrischen Mengen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten wird augenblicklich proteolytische Aktivität gemessen und die SDS-Gelelektrophorese des Gemisches deutet mit der vollständig autoproteolytischen Abspaltung der Prosegmente von den  $\beta$ -Vorläufern auf eine effiziente und augenblickliche Partikelassemblierung hin. Die Ergebnisse zeigen somit einen intakten Zusammenbau des *Archaeoglobus*-20S-Proteasoms unter *in vitro* Bedingungen und liefern die Grundlage für eine Untersuchung früher und später Assemblierungsintermediate. Für einen strukturellen Vergleich verschiedener Zwischenstufen wurde zu Beginn die Kristallstruktur des gereiften 20S-Proteasoms sowie des 20S-Proteasom:Calpain-Inhibitor I-Komplexes aus *A. fulgidus* bei 2.25Å bzw. 2.8 Å bestimmt. Die Gesamtstruktur des *Archaeoglobus*-20S-Proteasoms ist erwartungsgemäß analog zum *Thermoplasma*-20S-Partikel: das Molekül ist zylinderförmig aufgebaut und besteht aus drei Kammern, die in sich mit engen Einschnürungen in Verbindung stehen; die ersten elf Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheiten sind in der Elektronendichte ähnlich wie im *Thermoplasma*-20S-Proteasom nicht definiert und vermitteln den Eindruck eines zentralen offenen Kanals (siehe Abb. 9a). Zusätzlich läßt die hohe Auflösung des *Archaeoglobus*-20S-Partikels am proteolytisch aktiven Zentrum ebenfalls das bereits im Hefe-20S-Proteasom gefundene nukleophile Wassermolekül erkennen und belegt den universell vorgeschlagenen proteolytischen Reaktionsmechanismus archaebakterieller und eukaryontischer 20S-Proteasome (siehe 2.2.5 und 3.2).

#### 3.1.2 Der $\alpha$ -Ring aus *A. fulgidus*: ein frühes Assemblierungsintermediat

Es ist bekannt, daß sich archaebakterielle proteasomale  $\alpha$ -Untereinheiten spontan zu einem Siebenring zusammenlagern, während die  $\beta$ -Untereinheiten alleine keinen Ringschluß



eingehen, jedoch mit den  $\alpha$ -Ringern zum funktionellen 20S-Proteasom assemblieren (Zwickl *et al.*, 1994). Überraschenderweise ist der Aufbau proteolytisch aktiver chimärer 20S-Proteasome über die  $\alpha$ -Untereinheiten aus *A. pernix* und die  $\beta$ -Untereinheiten aus *A. fulgidus* möglich (Groll *et al.*, 2003a). Nennenswert in diesem Zusammenhang ist die voneinander weitentfernte phylogenetische Entwicklung der verwendeten Archaeen: *A. fulgidus* gehört zu der Familie der Euryarchaeota und *A. pernix* zu der Familie der Crenarchaeota. Ebenso ergibt die strukturelle Überlagerung der  $C_{\alpha}$ -Atome der Koordinaten der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten aus *A. fulgidus* mit denen aus *T. acidophilum* eine weitgehende Übereinstimmung, was prinzipiell für einen zeitlich allgemeinentwickelten Assemblierungsmechanismus archaeobakterieller 20S-Proteasome spricht. Für die unassemblierten  $\beta$ -Untereinheiten ergeben Aktivitätsuntersuchungen gegenüber chromogenen Testsubstraten eine defiziente Proteolyse und die N-terminale Sequenzierung zeigt ein Ausbleiben der intramolekularen Autoproteolyse (*siehe* 3.2.1). Somit ist für die proteolytische Aktivität als auch für die Fähigkeit der Substratspaltung eine oligomere Assemblierungsanordnung der  $\beta$ -Untereinheiten in 20S-Proteasomen von grundlegender Bedeutung. Dieser Befund ist nur über konformelle Strukturumlagerungen in den Untereinheiten während der 20S-Partikelreifung zu erklären. Allerdings ist bislang noch keine Kristallstruktur für eine unkomplexierte  $\beta$ -Untereinheit verfügbar, um den Mechanismus detailliert beschreiben zu können. Hingegen war es möglich, eine Röntgenkristallstruktur für den  $\alpha_7$ -Ringvorläufer aus *A. fulgidus* bei 2.45Å Auflösung zu erhalten (Groll *et al.*, 2003a). Überraschenderweise zeigt dieser alleine eine identische Konformation zum  $\alpha_7$ -Ring aus dem gereiften 20S-Proteasom mit Ausnahme des N-terminalen Bereichs, der im  $\alpha_7$ -Assembly strukturell geordnet vorliegt (*siehe* Abb. 8).



**Abb. 8:** Stereoabbildung der strukturellen Überlagerung der  $C_{\alpha}$ -Atome von der  $\alpha$ -Untereinheit aus dem  $\alpha_7$ -Ring (gelb) mit der  $\alpha$ -Untereinheit aus dem 20S-Proteasom (blau) von *Archaeoglobus fulgidus*. Die N- bzw. C-Termini der jeweiligen Untereinheiten sind in schwarz beschriftet.

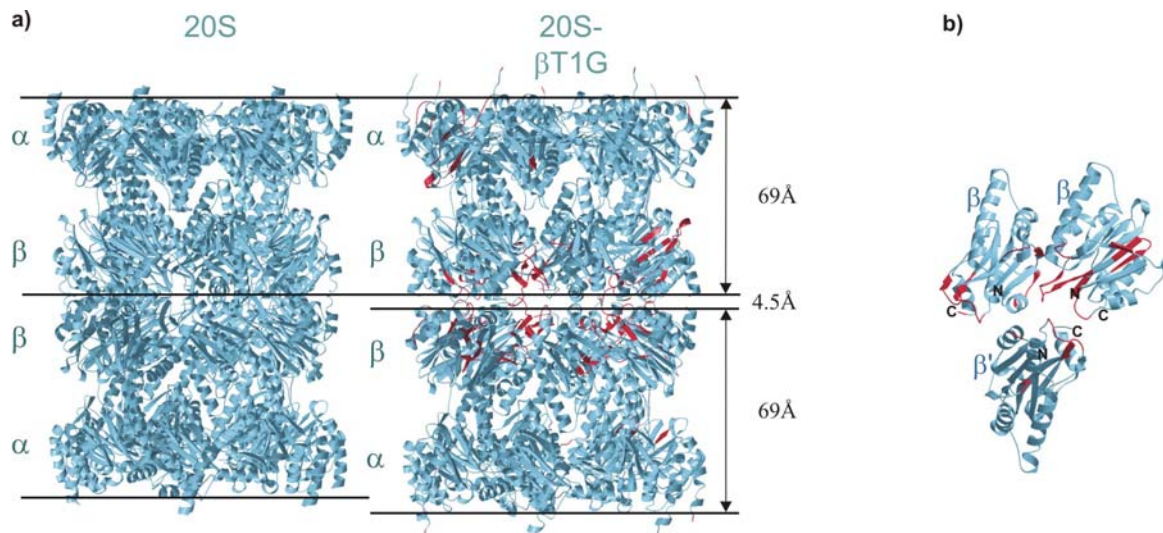
Das Ergebnis der Strukturüberlagerung der  $\alpha$ -Untereinheiten aus den verschiedenen *Archaeoglobus*-Komplexen ergibt, daß der  $\alpha_7$ -Ring während der 20S-Partikelzusammensetzung bereits ein stabiles und starres Gerüst bildet und damit das Fundament für die Anlagerung der  $\beta$ -Precursorproteine darstellt. Sogar die Kontaktflächen in den  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms besitzen keine signifikanten strukturellen Unterschiede zu den  $\alpha$ -Untereinheiten im  $\alpha_7$ -Ring und belegen eine bereits voreingenommene Erhaltung der  $\alpha$ - $\beta$ -Kontaktfläche.

Während die Assemblierung in Archaeen als konserviert erscheint wechselt der Mechanismus der Reifung mit Anstieg der Komplexizität. In eukaryontischen 20S-Proteasomen erfordert der Zusammenbau der unterschiedlichen Untereinheiten zusätzliche regulatorische Faktoren, die möglicherweise als Chaperone für korrekte Faltung sorgen und lediglich transient mit dem sich aufbauenden Komplex assoziieren (Ramos *et al.*, 1998); (Witt *et al.*, 2000). Jedoch ist es notwendig, daß in der Entstehung und in der Reifung der 20S-Proteasome eine etablierte Ordnung eingehalten wird, um den unkontrollierten und vorzeitigen Proteinabbau in der Zelle zu verhindern. Diese Voraussetzung erfordert ein grundlegendes Prinzip für den Zusammenbau von 20S-Proteasomen aus allen Organismen. Der detaillierte Assemblierungsmechanismus ist weiterhin fraglich und erfordert weitere Experimente.

### 3.1.3 Die $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Proteasommutante aus *A. fulgidus*: ein spätes Assemblierungsintermediat

In eukaryontischen 20S-Proteasomen bilden sich die proteolytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten über intramolekulare Autolyse unabhängig von der Anwesenheit anderer aktiver Zentren (siehe 3.3.2) (Heinemeyer *et al.*, 1997); (Ditzel *et al.*, 1998); (Groll *et al.*, 1999). Dieser Prozeß ist der letzte Schritt in der 20S-Proteasom-Reifung und generiert das funktionstüchtige Kernpartikel. Es ist gelungen, von einer proteolytisch inaktiven 20S- $\beta$ Thr1Gly-Proteasommutante aus *A. fulgidus* bei 4Å Auflösung eine Kristallstruktur zu bestimmen (Groll *et al.*, 2003a). Durch die Mutation kann der Komplex den Reifungsprozeß nicht abschließen und stellt damit eines der letzten 20S-Proteasom-Assemblierungsintermediate dar. In den aufgenommenen Reflexen ergibt die Selbstrotationssuche nach zweizähligen Achsen in der Patterson-Karte nur eine schwache 72-Symmetrie des Moleküls und deutet auf eine beträchtliche Fehlordnung hin. Die Kristallstrukturanalyse und Positionierung der Untereinheiten konnte lediglich mit Hilfe der einzelnen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringe des *Archaeoglobus*-20S-Partikels über Patterson-Such-Methoden ermittelt werden, gefolgt von einer individuellen *rigid body* Minimierung. Die Strukturüberlagerungen der Hauptkettenatome der  $\alpha$ -Ringe aus

Wildtyp und  $\beta$ -Thr1Gly-Mutante zeigen identische Schwerpunkte sowie analoge  $\alpha_7\beta_7$ -Anordnungen halber 20S-Proteasomkomplexe. Jedoch befindet sich im Vergleich zum Wildtyp in der Mutante zwischen den beiden Hälften ein Abstand von  $4.5\text{\AA}$  der die  $\alpha_7\beta_7$ -Assoziatone voneinander separiert (siehe Abb. 9a).



**Abb. 9:** a) Ribbonplot des *Archaeoglobus*-20S-Proteasoms aus Wildtyp und der  $\beta$ -Thr1Gly-Mutante. Die in der Kristallstruktur geordneten Aminosäuren sind in blau eingezeichnet, die fehlgeordneten Aminosäuren sind in rot dargestellt. Die schwarzen gestrichelten Linien deuten mit einer Länge von  $69\text{\AA}$  den gemeinsamen Schwerpunkt halber 20S-Proteasome an. Im Falle der  $\beta$ -Thr1Gly-Mutante sind im Unterschied zum Wildtyp die halben 20S-Partikel über eine  $4.5\text{\AA}$  Lücke voneinander getrennt. b) Ribbonplot von drei benachbarten  $\beta$ -Untereinheiten der  $\beta$ -Thr1Gly-Mutante mit struktureller Fehlordnung innerhalb der  $\beta$ - $\beta$ -Schnittfläche.

Die berechnete  $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte der  $\beta$ -Thr1Gly-Mutante ergibt eine deutlich niederaufgelöstere Elektronendichte als die zu erwartende und deutet auf eine umfassende Fehlordnung im Kristall hin. Im speziellen konnten keine Elektronendichten für die Prosegmente und Aminosäuren im Bereich der  $\beta$ - $\beta$ -Schnittfläche erkannt werden. Allerdings zeigt die N-terminale Sequenzierung sowie die Analyse der SDS-Gelelektrophorese, daß in der Mutante die Vorläufer der  $\beta$ -Untereinheiten noch intakt sind und somit keiner Autolyse unterliegen.

Bereits am Beispiel von Hefe-20S-Proteasom-Mutanten wurde eine Umorientierung der  $\beta$ -Propeptide nach fortgeschrittener proteolytischer Spaltung durch benachbarte aktive  $\beta$ -Untereinheiten gefunden (Ditzel *et al.*, 1998); (Groll *et al.*, 1999) (siehe 2.2.7). Dabei nehmen die prozessierten Prosegmente eine analoge Konformation wie gebundene Inhibitoren an den aktiven Zentren ein (siehe 3.4.1), in denen sie den Spalt zwischen den Falblättern der Aminosäuren 19-22, 45-52 und 112-120 besetzen. Teile dieser Sequenzen sind in der Kristallstruktur der  $\beta$ Thr1Gly-Mutante aus *A. fulgidus* nicht definiert und weisen auf ein proteolytisch nicht

funktionstüchtiges aktives Zentrum hin. Des Weiteren sind in der Mutante die beiden  $\alpha_7\beta_7$ -Doppelringe strukturell nicht assoziiert (siehe Abb. 9b). Allerdings ergibt die Gelfiltrationschromatographie der Mutante bezüglich der Retentionszeit Hinweise auf bereits assemblierte  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Precursorkomplexe, und die dynamische Lichtstreuung zeigt eine im Vergleich zum Wildtyp leicht verlängerte Molekülform. Diese Experimente bestätigen den nahezu abgeschlossenen Reifungszustand des *Archaeoglobus*-20S- $\beta$ Thr1Gly-Proteasoms, so daß diese Mutante einem späten Assemblierungsintermediat gleichzusetzen ist.

Archaeobakterielle und eukaryontische 20S-Proteasome sind in ihrer Sequenz und Struktur zueinander ähnlich (Bochtler *et al.*, 1999); (Groll *et al.*, 2003a). Die eukaryontischen 20S-Partikel assemblieren aus halben 13-16S-Komplexen (Schmidtke *et al.*, 1997) und besitzen gleiche Eigenschaften hinsichtlich der Autolyse ihrer Propeptide (Ditzel *et al.*, 1998); (Groll *et al.*, 1999). Es erscheint somit wahrscheinlich, daß erste Schritte im Zusammenbau, im speziellen die initiale Ausbildung der  $\alpha$ -Ringe, auch in eukaryontischen 20S-Proteasomen existieren. Hingegen zeigen die Prosegmente der  $\beta$ -Untereinheiten in Eukaryonten zueinander nur wenige Homologien. Die Kristallstruktur der  $\beta$ Thr1Gly-Mutante aus *A. fulgidus* läßt trotz Erhalt der Rotationssymmetrie keine eindeutigen Kontakte der beiden halben 20S-Proteasome zu. Möglicherweise haben die unterschiedlichen  $\beta$ -Prosegmente in eukaryontischen 20S-Proteasomen unter Zuhilfenahme von Chaperonen wie ump/pomp (Ramos *et al.*, 1998); (Witt *et al.*, 2000) die Funktion eines stringenten Aufbaus der C2-Symmetrie im Molekül während der Partikelreifung.

## 3.2 Proteolyse- und Autolysemechanismus von 20S-Proteasomen

### 3.2.1 Der Mechanismus der Autoproteolyse

Wie bereits ausführlich beschrieben, zeigen die Kristallstrukturanalysen der 20S-Proteasome aus *T. acidophilum*, *S. cerevisiae* und *A. fulgidus* die Ursache der proteolytischen Spaltung in den  $\beta$ -Untereinheiten (Groll&Huber, 2003b). Dabei exprimieren diese in Form von Precursorkomplexen und aktivieren sich im finalen Assemblierungsschritt durch eine intramolekulare Autoprozessierung der Gly(-1)-Thr1-Bindung (siehe 3.1.3). Mit der Freisetzung von Thr1 entsteht im Falle der eukaryontischen 20S-Proteasome 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 den Untereinheiten  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  und  $\beta_6$ , denen Thr1 fehlt, sowie der Untereinheit  $\beta_7$ , in der in Position 33 Lys gegen Arg und in Position 129 Ser gegen Phe ausgetauscht ist (Groll *et al.*, 1997). Reaktivierungsversuche der

inaktiven Untereinheiten über Mutagenese blieben bislang erfolglos, obwohl der Verlauf der Hauptkettengeometrie sowie die überwiegende Zahl der für das proteolytische Zentrum notwendigen Aminosäuren auch in den inaktiven Untereinheiten vorhanden ist. Für eine ausführliche Darstellung der Experimente wird auf die Publikation Groll *et al.*, 1999 verwiesen. Ebenso ist in Eukaryonten, anders als in Archaeobakterien, der Aufbau von chimären 20S-Proteasomen über den Austausch von homologen Untereinheiten aus verschiedenen Organismen nur im Fall von Drosophila/Maus betreffend der  $\alpha 2$ -Untereinheit gezeigt worden (Seelig *et al.*, 1993), während in Hefen bislang keine chimären CPs gefunden wurden (Heinemeyer, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse zeigen, daß die fehlerfreie Assemblierung der 20S-Protease weitaus mehr Aminosäuren benötigt, als letztendlich diejenigen, die im gereiften Molekül für die proteolytischen Aktivitäten analysiert worden sind. Umgekehrt lassen sich alle aktiven Untereinheiten durch Einzelmutationen in den katalytisch notwendigen Aminosäuren beeinflussen. So führt der Austausch von Thr1 zu Ala in den Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  zu deren Inaktivierung. In Hefezellen ist dieser Ersatz für die Untereinheit  $\beta 5$  letal, jedoch kann diese Untereinheit durch Mutation von Lys33 zu Ala oder Arg inaktiviert werden (Heinemeyer *et al.*, 1997); (Groll *et al.*, 1999); (Jäger *et al.*, 1999).

Kristallographische und biochemische Untersuchungen der *active-site*-Mutanten ergeben, daß die Autolyse intramolekular und innerhalb einer Untereinheit erfolgt (Ditzel *et al.*, 1998). Die Reaktionsfolge der Autolyse beinhaltet eine N-O-Umlagerung, 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 Threonin-enthaltenen Peptiden beobachtet (Hübener *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. 10*). Für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurde die  $\beta 1$ -Thr1Ala-Hefe-20S-Proteasommutante chemisch und strukturell charakterisiert (Ditzel *et al.*, 1998). Die  $\beta$ -Untereinheiten werden analog des Wildtypproteins prozessiert, mit Ausnahme der Untereinheit  $\beta 1$ , die zwischen Arg(-10) und Leu(-9) gespalten ist. Das komplette Prosegment der Untereinheit  $\beta 1$  ist in der Elektronendichte definiert. Die strukturelle Überlagerung der Untereinheit  $\beta 1$  aus Mutante und Wildtyp ergibt kaum eine Abweichung der jeweiligen Hauptkettenatomen und ermöglicht somit die Modellierung des Ala1 in der Mutante durch Koordinaten des Thr1, erhalten aus dem Wildtyp. Das



Ähnlich wie die Seitengruppen des Tripeptidaldehyds reicht die Leu(-2)-Seitenkette in die S1-Tasche von  $\beta 1$  (siehe 2.2.6). Dabei interagiert die Guanidiniumgruppe der Aminosäure Arg45 analog wie im Falle des Hefe-20S-Proteasom:Calpain-Inhibitor I-Komplexes mit einem Bicarbonatanion, wodurch die Polarität der S1-Tasche vermindert wird, was wiederum eine Wechselwirkung mit der Leu(-2)-Seitengruppe ermöglicht. Lys33N<sup>ε</sup> befindet sich in zentraler Position und besitzt Wasserstoffbrückenbindungen zur Asp17-Seitengruppe und zum Carbonylsauerstoff von Arg19. Zwischen der Carbonylgruppe von Leu(-2) und Lys33N<sup>ε</sup> finden ebenfalls Wechselwirkungen statt. Die Carbonylsauerstoffe von Gly(-1) und Thr1 zeigen in Richtung der helikalen Windung um Ser129 und bilden je zwei Wasserstoffbrücken zum N von Ser129 und Gly130. Ser129O<sup>γ</sup> interagiert mit Asp166. Thr1O<sup>γ</sup> ist zentral zum  $\gamma$ -turn positioniert und in unmittelbarer Nähe der beiden Carbonylkohlenstoffatome von Leu(-2) und Gly(-1), so daß bei weiterer Rotation der Thr1O<sup>γ</sup>-Seitengruppe sich ein pyramidaler Übergangszustand der Carbonylkohlenstoffatome ausbildet, dem eine nukleophile Additionsreaktion folgt (siehe Abb. 10). Beide Carbonylkohlenstoffatome sind über Wasserstoffbrücken stark polarisiert, so daß der nukleophile Angriff analog der Bindung von zu spaltenden Peptidgruppen in Oxyanionholes erleichtert wird. Als Intermediat entsteht ein Hydroxazolidin, gefolgt von einer Esterbildung durch die Spaltung der C-N-Bindung. In der Umgebung von Thr1O<sup>γ</sup> befindet sich keine basische funktionelle Aminosäure mit Ausnahme eines nukleophilen Wassers, das auch in den Wildtyp 20S-Proteasomstrukturen gesehen wird. Dies führt zu der Vermutung, daß das NUK die Base in der Additionsreaktion ist und somit als Protonendonator für den Amidostickstoff fungiert, wenn die C-N-Bindung unter der Ausbildung des Esters gespalten wird. Die Autoproteolyse endet mit der Esterhydrolyse, bei der das NUK letztendlich in das Produkt eingebaut wird.

### 3.2.2 Die Funktion der $\beta$ -Propeptide

Alle  $\beta$ -Untereinheiten exprimieren als *Precursor*untereinheiten, die ihr Prosegment während der Partikelreifung teilweise oder im Falle der aktiven Untereinheiten autoproteolytisch abspalten. Es stellt sich daher die Frage nach der Funktion der  $\beta$ -Propeptide. In Archaeobakterien besitzen die Propeptide keine wesentliche Funktion für eine korrekte Molekülassemblierung sowie Generierung der proteolytisch aktiven Zentren. Anders hingegen in Eukaryonten: so konnte in Hefen gezeigt werden, daß das Propeptid der Untereinheit  $\beta 5$  für die Zellen lebensnotwendig ist und Einfluß im 20S-Proteasomaufbau besitzt (Chen&Hochstrasser, 1996); (Ramos *et al.*, 1998). Die Prosegmente der restlichen aktiven



Untereinheiten sind in Hefen ebenfalls für den Molekülaufbau erforderlich, bewirken jedoch bei chromosomaler Deletion keinen Zelltod (Arendt *et al.*, 1999). Um die Funktion des Propeptids der Untereinheit  $\beta 1$  im Detail zu verstehen, wurde das Prosegment dieser Untereinheit durch Ubiquitin ersetzt (Groll *et al.*, 1999); (Jäger *et al.*, 1999). Wie in anderen linearen Ubiquitininfusionen (Bachmair *et al.*, 1986) wird Ubiquitin augenblicklich nach der Translation über C-terminale Ubiquitinhydrolasen von der  $\beta 1$ -Untereinheit abgespalten, gefolgt von der Generierung des N-terminalen Threonins. Überraschenderweise besitzt aber das mutierte 20S-Partikel trotz geordneter Assemblierung keine proteolytische Aktivität in der Untereinheit  $\beta 1$ . Die davon ermittelte Kristallstrukturanalyse ergibt für die Untereinheit  $\beta 1$  im Vergleich zum Wildtyp keine signifikanten strukturellen Unterschiede mit Ausnahme von zusätzlicher Elektronendichte an der Aminogruppe des Thr1. Diese konnte mit Hilfe von Massenspektrographie als Acetylgruppe identifiziert werden, so daß das  $\beta 1$ -Propeptid die co- oder posttranslationale Acetylierung und damit Inaktivierung der proteolytischen Zentren verhindert. Der Verlust der enzymatischen Aktivität der N-Acetyl- $\beta 1$ -Mutante bekräftigt den für die Katalyse bereits vorgeschlagenen Mechanismus (Groll&Huber, 2003b) (*siehe Abb. 6*) und schreibt wiederum der Aminogruppe des Thr1, nicht aber dem Lys33 die Funktion des Protonenakzeptors zu (*siehe 2.2.5*). Ebenso wäre durch die Acetylgruppe eine sterische Hinderung der Substratbindung und damit Inaktivierung der Untereinheit denkbar. Allerdings liefert die Kristallstruktur als wesentlichen Grund für die unterdrückte Autolyse in der Mutante die sterische und elektrostatische Anordnung der Acetylgruppe. Parallel zu den strukturellen Ergebnissen zeigten genetische Experimente, daß die N $\alpha$ -Acetyltransferase für die posttranslationale Modifizierung verantwortlich ist und im Falle der chromosomalen Deletion die über Ubiquitin transformierten Untereinheiten  $\beta 1$ , als auch  $\beta 2$  und  $\beta 5$  weiterhin proteolytisch aktiv vorliegen (Arendt&Hochstrasser, 1999).

### 3.2.3 Die Funktion von Lys33 in der Proteolyse

Die grundlegende Aufgabe der konservierten Lys33-Reste in den proteolytisch aktiven Untereinheiten liegt in der Aufrechterhaltung der räumlichen Struktur sowie des elektrostatischen Potentials des Katalysezentrums und nicht in der Protonenakzeptorfunktion. So verhindert im *Thermoplasma*-20S-Proteasom der konservierte Ersatz von Lys33 mit Arginin in den  $\beta$ -Untereinheiten die Proteolyse als auch die Autolyse (Seemüller *et al.*, 1996). Überraschenderweise ist diese Substitution in eukaryontischen 20S-Partikeln für die Untereinheit  $\beta 7$  bereits im Wildtyp vorhanden. Die Kristallstruktur des Hefe-20S-Proteasoms erklärt die



fehlende proteolytische Aktivität als auch die unterbleibende Autolyse für  $\beta 7$ , da die im Vergleich zum Lys33 sterisch anspruchsvollere Seitenkette des Arg33 die Position des Thr1 verschiebt und somit das nukleophile Zentrum zerstört. Reaktivierungsversuche der Untereinheit  $\beta 7$  durch Mutation von Arg33Lys und Phe129Ser blieben jedoch erfolglos (Groll *et al.*, 1999). Für eine ausführlichere Charakterisierung des Lys33-Restes wurde in Hefe diese Aminosäure in der proteolytisch aktiven Untereinheit  $\beta 5$  durch Arg ersetzt (Groll *et al.*, 1999). Die Kristallstrukturanalyse der Mutante ergibt für die Untereinheit  $\beta 5$  mit Ausnahme des Arginins analog zur Wildtypstruktur eine identische Anordnung aller Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums, einschließlich der Position des Thr1. Die strukturelle Überlagerung der  $\beta 5$ -Untereinheiten von Mutante und Wildtyp zeigen für das Arg33 eine ähnliche Orientierung wie für das Lys33 mit der Einschränkung, daß die Guanidinogruppe zur Aminogruppe des Lys33 verkippt vorliegt und der dominierenden Position des Thr1 ausweicht. Trotz der strukturellen Homologien erzeugt die Mutation jedoch einen Verlust der chymotryptischen Aktivität gegenüber chromogenen Substraten. Somit findet entgegen Beobachtungen im *Thermoplasma*-20S-Proteasom weiterhin die intramolekulare Autolyse-reaktion statt. Diese Tatsache hat möglicherweise ihre Ursache in einer eingeschränkten verbleibenden proteolytischen Aktivität der mutierten Untereinheit, so daß durch die kovalente Bindung des Propeptids die Autolyse weiterhin erfolgt, jedoch die mittlere Verweilzeit der Substrate am aktiven Katalysezentrum für die Spaltung nicht mehr ausreicht. Die Mutante ist im Vergleich zur  $\beta 5$ -Thr1Ala-Mutante überlebensfähig, weist aber bereits bei 30°C einen starken Wachstumsdefekt sowie eine proteasomale Überexpression auf. Der Auslöser des Phänotyps kann einerseits durch den Verlust der chymotryptischen Aktivität oder aber durch eine beeinträchtigte Reifung der 20S-Proteasome erklärt werden. Genetische und biochemische Studien der Mutante deuten auf eine Anreicherung von 20S-Precursor-intermediaten hin (Heinemeyer *et al.*, 1997); (Jäger *et al.*, 1999) und favorisieren somit die verzögerte Partikelassemblierung.

Da die Autolyse in der  $\beta 5$ -Lys33Arg-Mutante unmerklich stattfindet, ist im nächsten Schritt die  $\beta 5$ -Lys33Ala-Mutante strukturell charakterisiert worden (Groll *et al.*, 1999). Der Hefestamm ist überlebensfähig, obwohl die Zellen bei 30°C kaum Wachstumstendenz sowie ein zehnfach vergrößertes Volumen im Vergleich zum Wildtyp haben und ähnlich wie in der  $\beta 5$ Lys33Arg-Mutante ungewöhnlich große Mengen an 20S-Proteasom bilden (Heinemeyer *et al.*, 1997); (Jäger *et al.*, 1999). Die Kristallstrukturanalyse der Mutante zeigt definierte Elektronendichte für das  $\beta 5$ -Propeptid und eine wesentliche Neuorientierung des Thr1, das

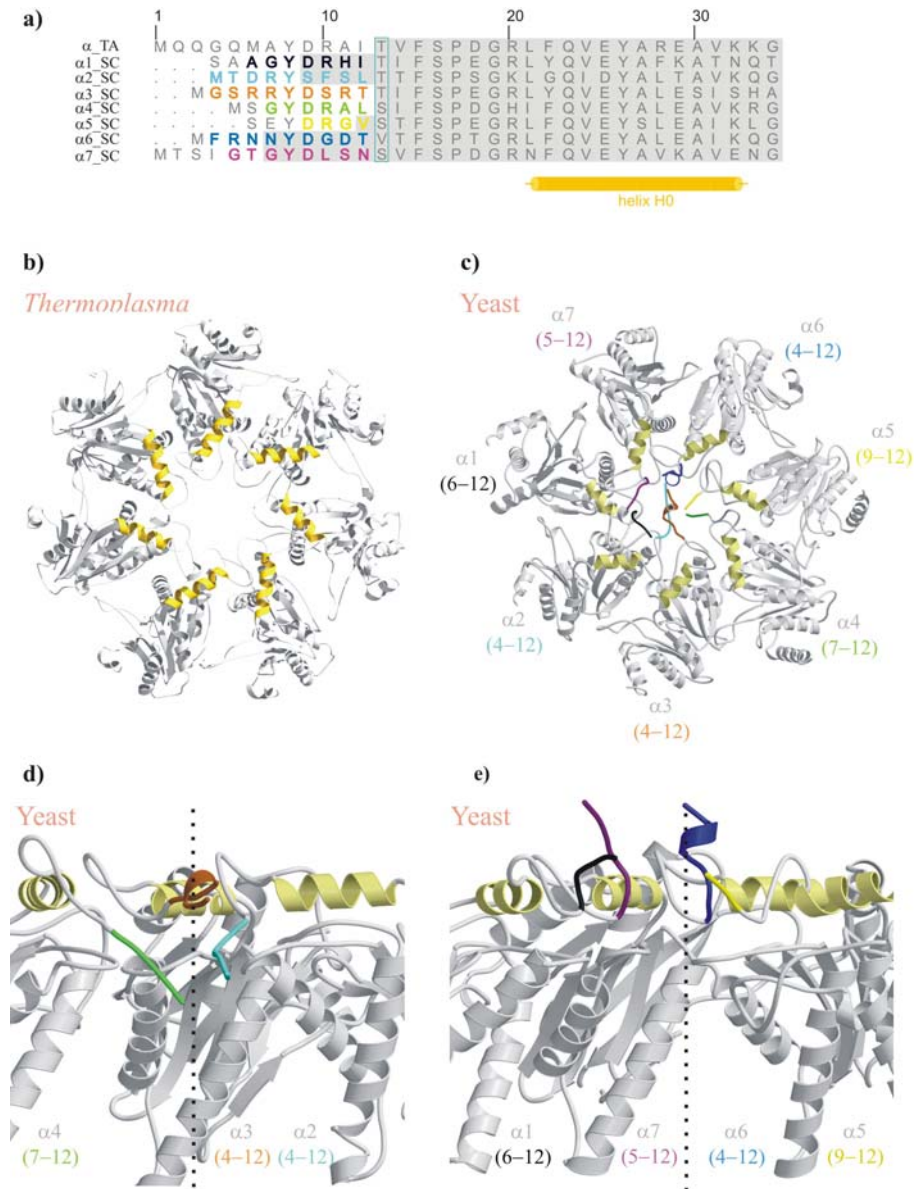
die Kavität, generiert durch den Lys-Ala-Ersatz, ausfüllt (Groll *et al.*, 1999). Die strukturellen Änderungen der  $\beta$ 5Lys33Ala-Mutante erklären die fehlende Autolyse und Proteolyse in der Untereinheit und teilen dem Lys33 neben der Aufrechterhaltung des elektrostatischen Potentials die Funktion des strukturellen Aufbaus des Katalysezentrums zu.

### 3.3 Substratzugang zum proteolytisch aktiven Zentrum in 20S-Proteasomen

#### 3.3.1 Strukturelle Unterschiede prokaryontischer und eukaryontischer 20S-Proteasome

Der strukturelle Aufbau eukaryontischer 20S-Proteasome trennt die proteolytischen Kammern räumlich von den zellulären Komponenten ab, so daß einerseits der unvorhergesehene Abbau von endogenen Proteinen verhindert, andererseits die vollständige Prozessierung von zu spaltenden Polypeptiden ermöglicht wird (*siehe Abb. 1 und 2.2.8*). Jedoch bewirkt diese strukturelle Gliederung hohe Anforderungen für den Zugang von Substraten in das Partikelinnere sowie für die Freigabe der bereits vollständig gespaltenen Produktfragmente. Das *Thermoplasma*-20S-Proteasom besitzt zwei Eingangsportale an den vertikalen Enden des zylinderförmigen Partikels, deren ringförmige Öffnungen aufgrund von schleifenformierenden Segmenten in den sieben identischen  $\alpha$ -Untereinheiten auf etwa 13Å Durchmesser beschränkt sind (*siehe Abb. 11b*) (Löwe *et al.*, 1995). Nennenswert in diesem Zusammenhang sind jedoch die Fehlordnungen der N-terminalen 12 Aminosäuren aller  $\alpha$ -Untereinheiten im Kristall, wodurch die strukturelle Zuordnung dieser Reste nicht möglich ist. Im Gegensatz zum archaebakteriellen 20S-Komplex zeigt das Hefe-20S-Proteasom eine fest verschlossene hydrolytische Kammer, mit Ausnahme weniger Seitenöffnungen an der Grenzfläche der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringe (*siehe Abb. 1f*) (Groll *et al.*, 1997). Allerdings erscheinen diese *Fenster* für einen regulierten Substratzutritt als zu engmaschig. Im eukaryontischen 20S-Komplex füllen die N-terminalen Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheiten die in archaebakteriellen 20S-Proteasomen gefundenen Öffnungen der  $\alpha$ -Ringe in mehreren Schichten durch stark ineinandergreifende Wechselwirkungen der Seitenketten komplett aus (*siehe Abb. 11c*). Experimentelle Befunde zeigen aber, daß die Peptidaseaktivität eukaryontischer 20S-Proteasome von vielen Faktoren abhängt: (1) Die Aktivierung erfolgt im Falle der Bindung von 20S-Proteasomen mit den 19S-Regulatorkomplexen zu 26S-Proteasomen (DeMartino *et al.*, 1994); (Hoffman&Rechsteiner, 1996); (2) es existieren weitere endogene Regulatoren wie beispielsweise der  $\gamma$ -Interferon-abhängige PA28- oder der PA200/Blm3-Komplex, die mit dem 20S-Proteasom einen stabilen Komplex formieren (Gray *et al.*, 1994); (Realini *et al.*,

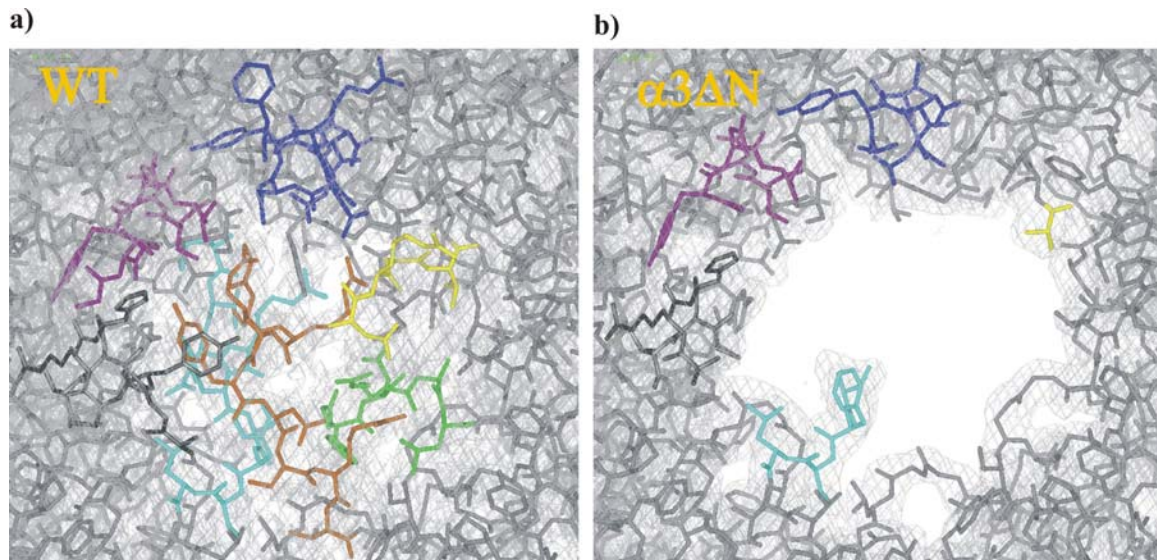
1997); (Ustrell *et al.*, 2002); (3) chemische Detergenzien, wie niedere Mengen an Natriumdodecylsulfat (SDS), können Einfluß auf die proteolytische Aktivität des 20S-, nicht aber des 26S-Proteasoms ausüben (Orlowski *et al.*, 1991).



**Abb11:** **a)** Sequenzalignierung der verschiedenen N-Termini von den proteasomalen  $\alpha$ -Untereinheiten aus *T. acidophilum* (TA) und *S. cerevisiae* (SC). Die Numerierung der Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheiten aus Hefe ist der Primärsequenz der  $\alpha$ -Untereinheit aus *Thermoplasma* angepaßt. Mit Aminosäure Thr13 beginnt in den  $\alpha$ -Untereinheiten von *Thermoplasma* definierte Elektronendichte (vertikale blaue Umrandung). Links vom Kasten befinden sich die N-terminalen Aminosäuren (*N-terminal tails*), die im Falle der Hefeuntereinheiten jeweils eine entsprechende Farbkodierung besitzen. Aminosäuren mit struktureller Fehlordnung sind in grau dargestellt; Aminosäuren, die in den Kristallstrukturen des *Thermoplasma*-20S-Proteasoms sowie der Hefe-20S- $\alpha$ 3 $\Delta$ N-Mutante definierte Elektronendichten zeigen, sind über einen grauen Hintergrund hervorgehoben. Es wurden ausschließlich die über N-terminale Sequenzanalyse identifizierte Aminosäuren verwendet. Die konservierte Helix H0 ist als gelber Balken eingezeichnet. **b-d)** *Ribbonplot* der  $\alpha$ -Ringe aus *T. acidophilum* und Hefe. Für Hefe sind die *N-terminalen tails* mit der in (a) verwendeten Farbkodierung in Klammern angegeben. In den Hefestrukturen ist die pseudosiebenzählige Symmetrieachse als schwarzer Kreis (c) bzw. als schwarze Rasterlinie (d) und (e) eingezeichnet.

### 3.3.2 Der Mechanismus der Kanalbildung in eukaryontischen 20S-Proteasomen

Der Aktivierung in 20S-Proteasomen wurde ebenso wie in anderen ATP-abhängigen Proteasen oft eine allosterische Regulation der proteolytisch aktiven Zentren zugemessen. Dahingegen gibt es für das eukaryontische 20S-Partikel aus struktureller Sicht keine Anzeichen, die obige Annahme bestätigen. Alternativ kann die Aktivierung des eukaryontischen 20S-Komplexes in Zusammenhang mit einer Ausbildung eines zentralen Kanals in das Molekülinnere gebracht werden. Diese Vorstellung erfordert jedoch eine beträchtliche Reorganisation der N-terminalen Segmente verschiedener  $\alpha$ -Untereinheiten und legt aufgrund der Aktivierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Substrathydrolyse über den Zugang zu den proteolytisch aktiven Zentren fest. Mit der Kristallstrukturanalyse einer N-terminalen Deletionsmutante des Hefe-20S-Proteasoms konnte das Prinzip und der Mechanismus des regulatorischen Öffnens und Schließens aufgeklärt werden (Groll *et al.*, 2000a). Als Ansatz für die Deletion wurde das N-terminale Segment der Untereinheit  $\alpha_3$  gewählt, da es gegenüber den anderen N-Termini quer über den  $\alpha$ -Ring ragt, orthogonal zur pseudo-siebenzähligen Achse orientiert ist, Kontakte mit allen anderen  $\alpha$ -N-Termini eingeht und in einer einzigartigen Strukturanordnung vorliegt (*siehe Abb. 11c und 11d*). Mit Hilfe der strukturellen Ergebnisse aus dem *Thermoplasma*-20S-Proteasom und dem Sequenzvergleich der  $\alpha$ -Untereinheiten aus Archaeen und Eukaryonten wurde eine ähnliche Kanalbildung wie im *Thermoplasma*-20S-Proteasom vermutet und somit die ersten neun Aminosäuren der Untereinheit  $\alpha_3$  chromosomal entfernt (diesbezüglich die Bezeichnung  $\alpha_3\Delta N$ -Mutante) (*siehe Abb. 11a*). Überraschenderweise wies die  $\alpha_3\Delta N$ -Mutante keine besonderen Phänotypen auf, jedoch ließ die Kristallstruktur dieser Mutante einen offenen Kanal mit ähnlichen Dimensionen wie bei den Eintrittsöffnungen im *Thermoplasma*-20S-Partikel durch das gesamte Molekül erkennen (*siehe Abbildung 12*). Der Wegfall der Elektronendichte begründete sich sowohl aus der chemischen Entfernung der N-terminalen Aminosäuren der Untereinheit  $\alpha_3$  als auch aus den Fehlordnungen der N-Termini der anderen  $\alpha$ -Untereinheiten. In der Deletionsmutante zeigt die Untereinheit  $\alpha_3$  keine Einschränkungen in der Faltung und widerlegt Annahmen der Kanalbildung in der  $\alpha_3\Delta N$ -Mutante durch möglicherweise auftretende Assemblierungsdefekte.



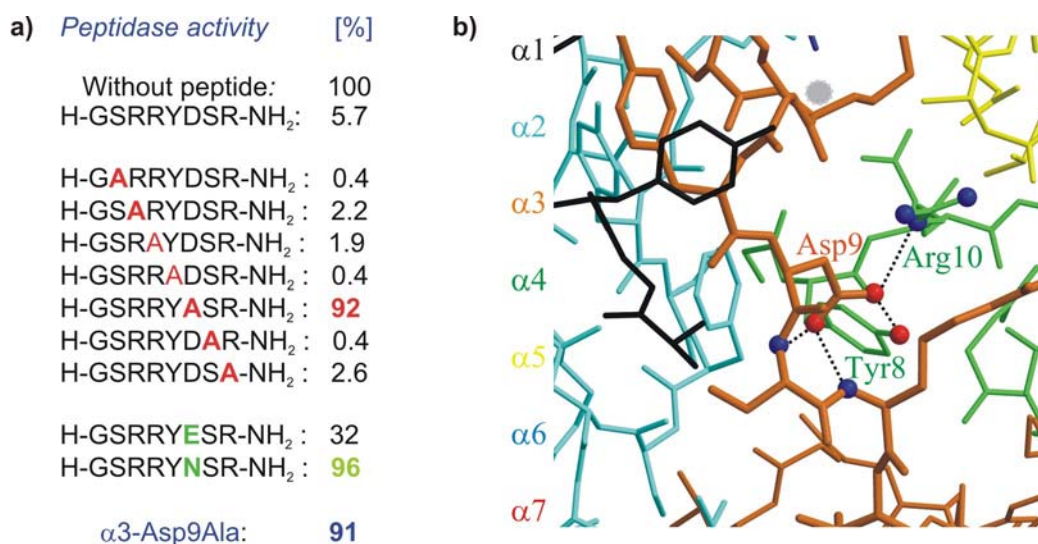
**Abb12:** Elektronendichtekarten der  $\alpha$ -Ringe des Hefe-20S-Proteasoms aus **a)** Wildtyp und **b)**  $\alpha 3\Delta N$ -Zellen. Die Elektronendichten sind mit 2FoFc-Koeffizienten nach zweifacher Mittelung bei  $1\sigma$  konturiert. Die *N-terminalen tails* sind entsprechend der Farbkodierung von *Abbildung 11a* wiedergegeben.

Im Vergleich zum Wildtyp besitzt das 20S-Proteasom der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante gegenüber den chromogenen Peptidsubstraten eine stark erhöhte proteolytische Aktivität, die ähnlich zu der in 26S-Proteasomen ist. Die strukturellen Überlagerungen der  $\beta$ -Untereinheiten der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante und des Wildtyps zeigen zueinander keine Unterschiede und schließen somit einen allosterischen Einfluß aus. Des Weiteren findet in der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante keine wie im Wildtyp gefundene Aktivitätssteigerung bei SDS-Zusatz statt, so daß der Detergenseffekt für natürlich vorkommende eukaryontische 20S-Proteasome über eine Kanalöffnung im  $\alpha$ -Ring zu erklären ist. Die  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante verändert nicht die Stabilität oder Abundanz von 26S-Proteasomen, und die Holoenzyme des Wildtyps und der N-terminalen Deletionsmutante haben gleiche proteolytische Aktivität gegenüber chromogenen Testsubstraten. Diese Beobachtung ergibt, daß die Bindung des regulatorischen 19S-Partikels an das 20S-Proteasom eine Umlagerung der N-terminalen Aminosäuren der Untereinheit  $\alpha 3$  auslöst und analog der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante eine ähnliche Struktur im 20S-Komplex generiert. Der verschlossene Kanal, wie auch in der Kristallstruktur des Hefe-20S-Proteasoms gefunden, ist somit die überwiegend auftretende Konformation von eukaryontischen 20S-Partikeln in Lösung und stellt für die Substrathydrolyse den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.

Ein bemerkenswertes Ergebnis liefert die Vorinkubation der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante mit dem synthetischen Nonapeptid, das die N-terminale  $\alpha 3$ -Sequenzfolge aufweist, da sich innerhalb von 15 Minuten die erhöhte proteolytische Aktivität der Deletionsmutante wieder auf die des Wildtyps zurücksetzen läßt. Dieser Befund veranlaßte eine vereinzelte Alaninabfrage im



synthetischen Nonapeptid und zeigte, daß mit Ausnahme der Aminosäure Asp9 alle anderen Substitutionen im Peptid die proteolytische Aktivität der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante inhibieren. Ein Austausch des Asp9 zum Asn im Nonapeptid ergab erwartungsgemäß und analog zur Asp9Ala-Substitution ebenfalls kaum einen Einfluß auf die proteolytische Aktivität der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante (siehe Abb. 13a). Auch die chromosomale  $\alpha 3$ -Asp9Ala-Punktmutation wies eine proteolytisch verstärkte Aktivität ähnlich wie die der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante auf, so daß dem  $\alpha 3$ -Asp9 im 20S-Komplex eine Schlüsselfunktion bezüglich des regulierten Öffnens und Schließens der  $\alpha$ -Ringe zuzuschreiben ist. In der Wildtypstruktur des Hefe-20S-Proteasoms als auch in der Kristallstruktur des Rinder-20S-Proteasoms (Groll *et al.*, 1997); (Unno *et al.*, 2002) geht die Aminosäure  $\alpha 3$ -Asp9 charakteristische Wechselwirkungen mit den räumlich benachbarten Aminosäuren  $\alpha 4$ -Tyr8 und  $\alpha 4$ -Arg10 ein. In eukaryontischen 20S-Proteasomen erfolgt der spezifische Regulationsmechanismus somit über dieses signifikante Strukturmotiv (*YDR-Motiv*) (siehe Abb. 12a und Abb. 13b).



**Abb13: a)** Einfluß von modifizierten synthetischen  $\alpha 3$ -N-terminalen tail-Peptiden auf die proteolytische Aktivität der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante gegenüber chromogenen Substraten. Die proteolytische Aktivität der Proteasommutante wird auf 100% festgelegt. Abhängig von der Sequenzfolge (*Polyalaninscan*, eingezeichnet in rot) zeigen die Peptide mit Ausnahme des Asp9Ala-Ersatzes bei Konzentrationen von 5mM und einer Vorinkubation von 15min starke Wechselwirkungen mit der Mutante. Ebenso wie die Asp9Ala-Substitution besitzt der konservierte Austausch von Asp9Glu oder Asp9Asn im Peptid (eingezeichnet in grün) wenig bzw. kaum einen Einfluß auf die proteolytische Aktivität der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante. **b)** Atomarer Ausschnitt des Eingangsportals in der geschlossenen Konformation des Hefe-20S-Proteasoms aus Wildtypzellen. Die N-terminalen Reste sind in gleicher Farbkodierung dargestellt wie in Abb. 11a. Interaktionen zwischen den verschiedenen Aminosäuren sind nur für das *YDR-Motiv* als schwarze Rasterlinien eingezeichnet. Die Carboxylatgruppe von Asp9 der Untereinheit  $\alpha 3$  bildet sowohl eine Salzbrücke mit der Guanidiniumgruppe von Arg10 als auch eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylgruppe des Tyr8 der benachbarten Untereinheit  $\alpha 4$ . Die Carboxylatgruppe wechselwirkt ebenso mit den Amidstickstoffen der Proteinhauptkette Ser10 und Arg11 der Untereinheit  $\alpha 3$ . Die Ergebnisse erlaubten Planung und Umsetzung der  $\alpha 3$ -Asp9Ala-Mutante (dargestellt in blau). Diese besitzt gegenüber chromogenen Substraten eine ähnliche proteolytische Aktivität wie die  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante (a). Asp9 nimmt somit eine Schlüsselfunktion für den Regulationsmechanismus des Öffnens und Schließens ein.

Das *YDR-Motiv* ist am Außenrand der Pforte lokalisiert und gewährleistet durch Wechselwirkungen mit dem regulatorischen 19S-Komplex die Bildung eines durchgängigen Kanals. Ebenso sind die N-terminalen Segmente durch ihre Lage strukturell nicht eingeschränkt und zeigen größtenteils keine Sekundärstrukturen, wodurch die Konformationsänderungen im  $\alpha$ -ring über einzelne Aminosäuren und energetisch rationell gesteuert werden. Der Erhalt des Tyr8 ist in allen  $\alpha$ -Untereinheiten stringent, während Asp9 in sechs der sieben  $\alpha$ -Untereinheiten auftaucht und Arg10 weniger konserviert vorliegt. Nennenswert ist, daß Überlagerungen aller bislang ermittelten eukaryontischen Sequenzen in den Untereinheiten  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  das *YDR-Motiv* aufweisen (Groll *et al.*, 2000a). Eine Begründung der Evolution liegt in der natürlichen Mutation, die bevorzugt an oberflächenexponierten Aminosäuren mit fehlenden Strukturmotiven erfolgt. Die Primärsequenzen der sieben verschiedenen N-Termini in den  $\alpha$ -Untereinheiten sind zueinander mit Ausnahme des Tyr8 und Asp9 nicht homolog, besitzen aber nahezu Identität mit den Sequenzen anderer eukaryontischer Organismen. Beispielsweise zeigen die beiden Spezies *S. cerevisiae* und *H. sapiens* nahezu gleiche Anordnung in ihren N-terminalen Aminosäuren der  $\alpha$ -Untereinheiten, trotz der schon früh eingetretenen Differenzierung. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß bereits eukaryontische Vorfahren über Besitz, Funktion und Struktur des *YDR-Motivs* verfügten. Nicht zu erklären ist jedoch der bislang noch fehlende Phänotyp der  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante in Hefen.

### 3.3.3 Die Regulatoren von eukaryontischen 20S-Proteasomen

Wie bereits kurz beschrieben stimulieren endogene Regulatoren die Peptidhydrolyse über das 20S-Proteasom (DeMartino *et al.*, 1999). Kürzlich konnte die Kristallstruktur des Hefe-20S-Proteasoms komplexiert mit einem zur PA28-Familie (REG $\alpha$ , REG $\beta$  und REG $\gamma$ ) homologen PA26-Molekül aus Trypanosomen aufgeklärt werden (Whitby *et al.*, 2000). Die Struktur zeigt wie die  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante eine Kanalbildung im  $\alpha$ -Ring des 20S-Proteasoms. Dabei sind die N-terminalen Segmente der  $\alpha$ -Untereinheiten größtenteils fehlgeordnet und können nicht mehr in der Elektronendichtekarte zugeordnet werden. Die Umlagerung der  $\alpha$ -N-Termini bewirkt die gegenüber fluorophoren Testsubstraten gesteigerte proteolytische Aktivität und weist Parallelen zur bereits beschriebenen  $\alpha 3\Delta N$ -Mutante auf. PA26 besitzt in seiner Struktur und Funktion nicht die Fähigkeit Nukleotide zu binden. Die Öffnung der  $\alpha$ -Ringe erfolgt hierbei durch Wechselwirkungen der C-Termini von PA26 mit *reversen turns*, die zwischen der Helix H0 und den N-terminalen Segmenten der  $\alpha$ -Untereinheiten im 20S-Komplex zu finden sind. Obwohl der regulatorische 19S- als auch der PA26/28-Komplex an

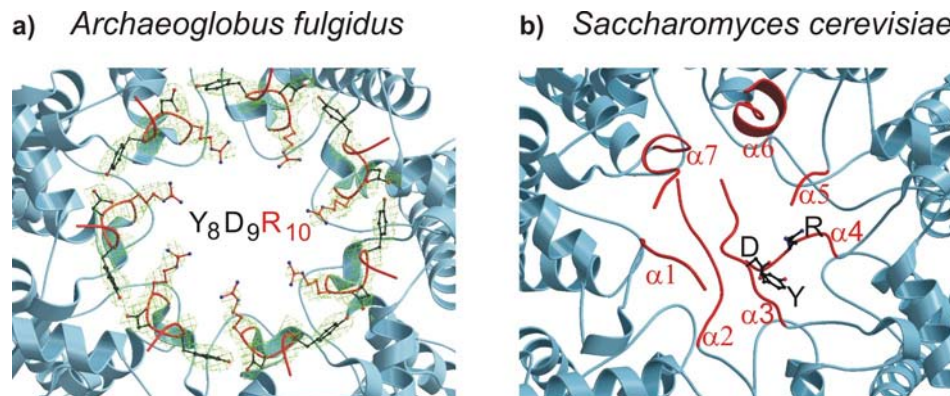
die  $\alpha$ -Ringe des 20S-Proteasoms binden, unterscheiden sich beide Komponenten voneinander im Aktivierungsmechanismus. So besitzt PA26 keine ersichtliche Sequenzähnlichkeit zu den Untereinheiten des 19S-Regulators und liegt als heptamerer Ring vor, während der 19S-Komplex an der 20S-Proteasom-Kontaktfläche einen sechsgliedrigen Ring aus sequenzverwandten ATPase-Untereinheiten bildet (Glickman *et al.*, 1998). Ebenso zeigen Experimente in denen das Nukleotidbindemotiv in der ATPase-Untereinheit Rpt2 über Mutagenese gestört wurde, ein 26S-Proteasom mit eingeschränkter proteolytischer Aktivität gegenüber chromogenen Substraten, ähnlich wie das latente 20S-Proteasom (Köhler *et al.*, 2001).

### 3.3.4 Das *YDR-Motiv* in archaebakteriellen 20S-Proteasomen

Im Vergleich zu eukaryontischen 20S-Proteasomen besitzen die einfacher aufgebauten prokaryontischen Kernpartikel nicht die Fähigkeit ein multifunktionales 26S-Proteasom aufzubauen, da in diesen Organismen die meisten Gene für den regulatorischen 19S-Komplex fehlen. Trotzdem enthalten alle bislang sequenzierten archaebakteriellen 20S-Proteasomen in ihren  $\alpha$ -Untereinheiten das *YDR-Motiv*. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß der Mechanismus des Öffnens und des Schließens von 20S-Proteasomen Allgemeingültigkeit hat. Die Kristallstrukturanalysen der 20S-Proteasome aus *T. acidophilum* und *A. fulgidus* zeigen jedoch eine strukturelle Fehlordnung in den N-terminalen Segmenten der  $\alpha$ -Untereinheiten und illustrieren demgemäß einen zentralen durchgängigen Kanal in den Molekülen (Löwe *et al.*, 1995); (Groll *et al.*, 2003a). Innerhalb dieser fehlgeordneten Aminosäuren befindet sich unter anderem das *YDR-Motiv*. N-terminale Sequenzierungen ergeben keinen Abbau oder posttranslationale Modifikation der  $\alpha$ -N-Termini und deuten auf eine intakte Funktion dieser Reste hin. Würden jedoch die N-terminalen Segmente für jeden einzelnen Strang eine für die Untereinheit charakteristische Struktur einnehmen, die einer siebenfachen Symmetrie nicht mehr gehorcht, so wäre diesem Bereich durch die statistische Anordnung der Moleküle im Kristall keine Elektronendichte zuzuschreiben und die Interpretation der Kristallstruktur eine artifizielle Annahme. Allerdings besitzt die  $\alpha$ 3-Asp9Ala-Mutante des Hefe-20S-Proteasoms eine im Vergleich zum Wildtyp zwanzigfach gesteigerte Aktivität gegenüber chromogenen Substraten, während die  $\alpha$ -Asp9Ala-Mutante des *Archaeoglobus*-20S-Partikels nur wildtyp-ähnliche Aktivität aufweist (Groll *et al.*, 2000a); (Groll *et al.*, 2003a). Dieses Ergebnis widerlegt angesichts der zentralen Funktion des Asp9 im *YDR-Motiv* den in eukaryontischen 20S-Proteasomen gefundenen Regulationsmechanismus für die Ausbildung und Stabilität des Steuerelements. Überraschenderweise ergab die Kristallstrukturanalyse des  $\alpha$ -Rings von *A.*



*fulgidus* alleine eine definierte Elektronendichte für den gesamten N-Terminus (siehe 3.1.2) (Groll *et al.*, 2003a). Die N-Termini besitzen in dieser Struktur eine siebenfache Symmetrie, ragen vom Molekülzentrum nach außen und folgen der Sekundärstruktur einer  $3_{10}$ -Helix (siehe Abb. 14a).



**Abb14:** Ribbonplot der  $\alpha$ -Ringe von a) *A. fulgidus* und b) Hefe (dargestellt in blau). Die N-terminalen Segmente sind in rot eingezeichnet. Das YDR-Motiv ist als *balls-and-sticks* gezeigt und Kontakte mit benachbarten Untereinheiten sind schwarz gefärbt. In *A. fulgidus* und in Hefe liegt jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asp9 und dem benachbarten Tyr8 vor, jedoch unterscheiden sich die Tertiärstrukturen voneinander deutlich. In a) ist für das YDR-Motiv die siebenfach gemittelte Elektronendichte mit  $2F_o - F_c$ -Koeffizienten bei  $1\sigma$  dargestellt.

Ausgebildet durch die individuellen  $\alpha$ -Untereinheiten formiert diese Anordnung im  $\alpha$ -Ring einen Kanal von ca.  $13\text{\AA}$  Durchmesser, der über die Schleifensegmente Tyr126, Gly127 und Gly128 begrenzt wird und identisch zur 20S-Proteasom-Wildtypstruktur ist. Die N-terminalen Segmente sind miteinander ausschließlich über das YDR-Motiv in Wechselwirkung. Im speziellen interagiert Asp9 mit Tyr8 der benachbarten Untereinheit, während Arg10 auf die Pore ausgerichtet ist und dem Kanal ein stark positives Potential verleiht. Es ist unwahrscheinlich, daß die unterschiedliche Konformation der N-terminalen Segmente im  $\alpha$ -Ring des 20S-Proteasoms verglichen mit der des freien  $\alpha$ -Rings allosterisch durch die  $\beta$ -Untereinheiten verursacht wird, da die  $\alpha$ -Untereinheiten mit Ausnahme der N-Termini einschließlich der  $\alpha\beta$ -Grenzflächen in beiden Molekülen nahezu identische Tertiärstrukturen aufweisen (siehe Abb. 8 und 3.1.2). Eine mögliche Erklärung für diese strukturellen Abweichungen könnten die verschiedenen Kristallisationspufferbedingungen sein. Voraussichtlich ist die globale Konformation der archaebakteriellen N-Termini in 20S-Proteasomen mit nur geringer Diskrepanz in den einzelnen  $\alpha$ -Untereinheiten ähnlich zu der im  $\alpha$ -Ring aus *A. fulgidus* ermittelten. Jedoch rufen die geringfügig unterschiedlichen Konstellationen die kristallographischen Fehlorderungen der N-terminalen Bereiche hervor. Die starke Sequenzhomologie der  $\alpha$ -Untereinheiten beginnt mit dem YDR-Motiv, während die vorhergehenden Aminosäure-

reste zueinander keine Ähnlichkeiten in ihrer Länge und ihrer Ladungsverteilung aufweisen. Die strukturellen Ergebnisse zeigen, daß die N-terminalen Segmente miteinander ausschließlich über das *YDR-Motiv* in Wechselwirkungen stehen. Somit könnten willkürliche Mutationen im *YDR-Motiv* die Ausbildung der  $3_{10}$ -Helix in den N-Termini unterbinden und im ungünstigsten Fall den Kanal des  $\alpha$ -Rings für den Substratzugang abriegeln. In eukaryontischen 20S-Proteasomen ist das *YDR-Motiv* unter den sieben verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten nicht konserviert. Die Ursache hierfür könnte sich aus der Genduplikation in der frühen Entwicklungsgeschichte ergeben haben, bei der sich die Neubildung eines regulierten Öffnungs- und Schließmechanismus durch die voneinander verschiedenen  $\alpha$ -N-Termini ereignet hat. Somit entsteht durch den Verlust der Symmetrie in eukaryontischen 20S-Komplexen eine neue Steuerkomponente für den Substratzugang, die in prokaryontischen Kernpartikeln fehlt. Die gewonnene Erkenntnis über das *YDR-Motiv* ist außergewöhnlich, da es einerseits in der Primärstruktur der  $\alpha$ -Untereinheiten aller Organismen erscheint, andererseits aber in Eukaryonten und Archaeobakterien voneinander unabhängige Tertiärstrukturen mit unterschiedlichen Funktionen annimmt.

### 3.4 Inhibitoren des 20S-Proteasoms

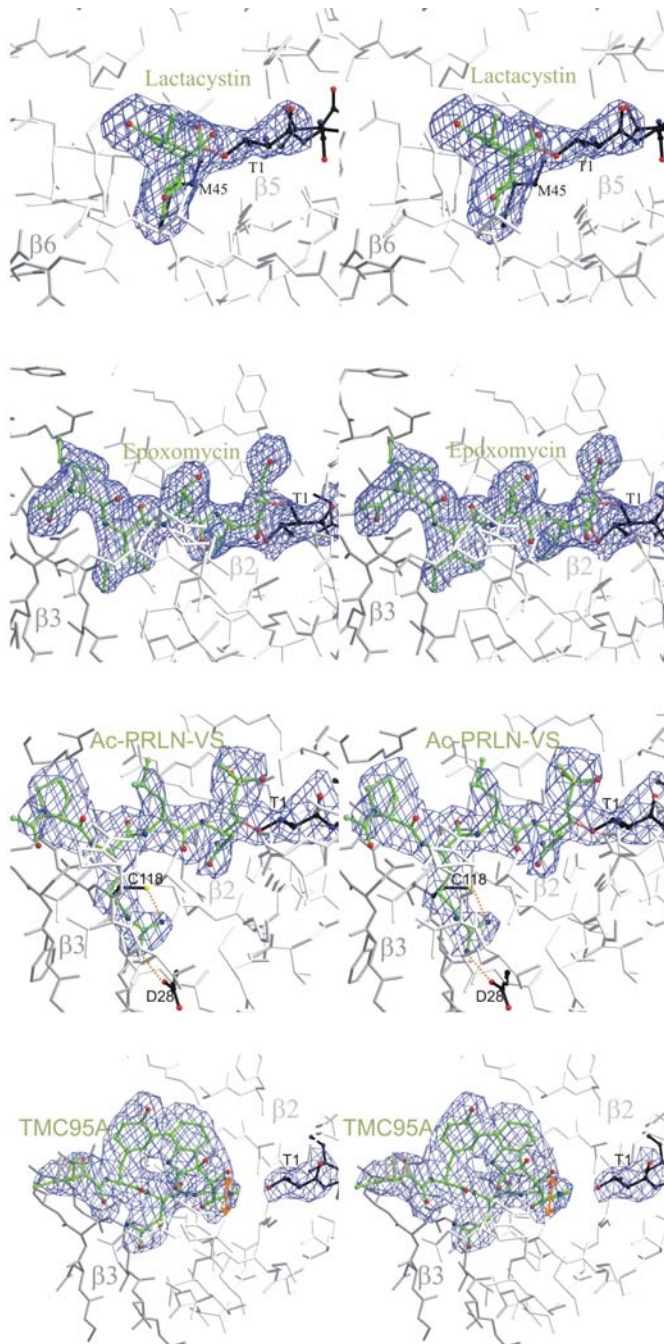
#### 3.4.1 Kovalent bindende 20S-Proteasominhibitoren

Der regulierte Abbau von ubiquitinierten Proteinen über das Proteasom hat einen wesentlichen Einfluß auf den streng kontrollierten Ablauf einer großen Zahl biologischer Prozesse in der Zelle wie Apoptose, Zellteilung, Zelldifferenzierung und Entzündungsbildung (Kloetzel, 1998). Somit liegt es nahe, daß spezifische Proteasominhibitoren als Medikamente für die Bekämpfung von Karzinomen oder als Antiphlogistika zukünftig eingesetzt werden könnten. Einer der zuerst gefundenen unspezifischen Proteasominhibitoren war die Verbindung N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal (Ac-LLnL-al, Calpain-Inhibitor I), die im wesentlichen Kenntnisse bezüglich der Proteolyseeigenschaften des 20S-Proteasoms gebracht hat (Vinitsky *et al.*, 1994). Die Kristallstrukturanalyse des *Thermoplasma*-20S-Proteasoms mit Ac-LLnL-al zeigt den Inhibitor reversibel als Hemiacetal an das N-terminale Thr10<sup>y</sup> gebunden (Löwe *et al.*, 1995). Der Inhibitor nimmt in der Struktur eine ausgedehnte Konformation an und besetzt unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen den Spalt zwischen den Faltblättern der Aminosäuren 19-22, 45-52 und 112-120 als antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt. Die S1-Norleucin-Seitenkette des Inhibitors bildet dabei starke Wechselwirkungen mit dem Protein, während die Leucin-Seitenkette in S2 keine Kontakte mit dem Protein eingeht. Die S3-Leucin-Seiten-

kette von Ac-LLnL-al interagiert mit Aminosäuren der benachbarten 20S-Proteasomuntereinheit, so daß der Inhibitor im 20S-Komplex generell stark verankert vorliegt. In eukaryontischen 20S-Proteasomen blockiert der Inhibitor bevorzugt die CL-Aktivität, während die TL- und PGPH-Aktivität nur mäßig unterdrückt werden (Figueiredo-Pereira *et al.*, 1994). Hingegen ergibt die Kristallstrukturanalyse des Hefe-20S-Proteasoms in Komplex mit dem Calpain-Inhibitor I aufgrund der hohen eingesetzten Konzentrationen an Inhibitor (Ac-LLnL-al: 1mM) eine vollständige Besetzung aller proteolytisch aktiven Untereinheiten (Groll *et al.*, 1997). Allerdings können die unterschiedlichen Polaritäten der S1-Taschen in eukaryontischen 20S-Proteasomen den Einfluß des Inhibitors auf die verschiedenen proteolytisch aktiven Zentren erklären (*siehe 2.2.6*).

Der zuerst gefundene natürlich vorkommende Proteasominhibitor war Lactacystin aus *Streptomyces*. Es wurde festgestellt, daß der Metabolit Auswirkungen auf das Nervenwachstum von Neuroblastoma-Zelllinien in Mäusen hat (Fenteany *et al.*, 1995). Radioaktiv-Experimente mit Tritium-markiertem Lactacystin zeigten nach Inkubation mit humanem 20S-Proteasom die Verbindung kovalent gebunden an die proteasomale Untereinheit  $\beta 5$ , obwohl Lactacystin unter bestimmten Bedingungen alle proteolytischen Aktivitäten beeinflusst. Ursprünglich wurde angenommen, daß das Naturprodukt spezifisch für 20S-Proteasome ist, jedoch wurden später auch Kreuzreaktionen mit anderen Proteinasen wie lysosomales Cathepsin A nachgewiesen. In wäßriger Lösung bei einem pH-Wert von acht hydrolysiert Lactacystin augenblicklich zu *clasto*-Lactacystin- $\beta$ -lacton, welches die reaktive Bindekomponente mit dem Thr10<sup>y</sup> des Proteasoms darstellt. Die Kristallstruktur des Komplexes des Hefe-20S-Proteasoms mit Lactacystin zeigt das Inhibitormolekül nur an die Untereinheit  $\beta 5$  gebunden (Groll *et al.*, 1997) und steht damit in Übereinstimmung mit den zuvor gefundenen Ergebnissen (Fenteany *et al.*, 1995). Grundsätzlich ist der Inhibitor am proteolytisch aktiven  $\beta 5$ -Zentrum über eine große Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen mit Proteinhauptkettenatomen stabilisiert. Die irreversible Hemmung des 20S-Proteasoms durch Lactacystin ist auf eine kovalente Esterbindung des Inhibitors mit dem N-terminalen Thr1 zurückzuführen (*siehe Abb. 15a*). Obwohl Lactacystin ebenso gleiche Interaktionen mit den Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  eingehen kann, ergibt die Kristallstrukturanalyse des Komplexes in diesen Untereinheiten keine definierte Elektronendichte für den Inhibitor. Wesentliche Gründe hierfür sind die Abweichungen der S1-Taschen der Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$  verglichen mit der Untereinheit  $\beta 5$ . Eine Hauptfunktion der Spezifitätstaschen ist, die mittlere Verweilzeit von Substraten am aktiven Zentrum durch charakteristische Wechselwirkungen zu verlängern, damit die proteo-

lytische Reaktion ablaufen kann. Die Dimethylseitenkette des Lactacystins imitiert ein Valin oder Leucin und interagiert im speziellen mit der Aminosäure Met45 der Untereinheit  $\beta_5$ , während in den Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  die große Anzahl polarer Seitenketten den Inhibitor destabilisiert und damit die Reaktion verhindert.



**Abb. 15:** **a)** Stereoabbildung der Hefe-20S-Proteasom-Untereinheiten (dargestellt in weiß und grau) komplexiert mit den Inhibitoren (dargestellt in grün) **a)** Lactacystin, **b)** Epoxomicin, **c)** MB1 und **d)** TMC95A. Die Elektronendichtekarten (dargestellt in blau) sind über  $1\sigma$  konturiert und zeigen jeweils eine ähnliche Orientierung des Thr1 (dargestellt in schwarz) mit  $2F_o - F_c$ -Koeffizienten nach zweifacher zyklischer Mittelung. Es wurden keine großen strukturellen Veränderungen im Proteinmolekül mit Ausnahme des gebundenen Inhibitors gefunden. Die Temperaturfaktorverfeinerung deutet auf eine vollständige Besetzung aller Inhibitor-Bindestellen hin. Die Inhibitoren wurden für die Berechnungen der Elektronendichten ausgeschlossen. **a)** Die Untereinheit  $\beta_5$  kovalent gebunden an den *Streptomyces*-Metaboliten Lac-tacystin. Die P1-Taschen der Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\beta_2$  unterscheiden sich von der P1-Tasche in der Untereinheit  $\beta_5$  und zeigen keine Komplexbildung mit Lactacystin. Met45 der Untereinheit  $\beta_5$  (dargestellt in schwarz) ist hauptsächlich für den hydrophoben Charakter der  $\beta_5$ -S1-Tasche verantwortlich und bestimmt aufgrund der Wechselwirkung mit der verzweigten Seitenkette von Lactacystin die Untereinheitenspezifität. **b)** Die Untereinheit  $\beta_2$  kovalent gebunden mit dem natürlich vorkommenden 20S-Proteasominhibitor Epoxomicin. Die Elektronendichte zeigt eine hexamere Ringbildung von Epoxomicin am proteolytisch aktiven Zentrum. Dieses Morpholinoderivat resultiert aus der Adduktformation zwischen Epoxomicin und dem proteasomalen Thr1O $\gamma$  und N und erklärt die Selektivität von Epoxomicin gegenüber der Klasse der Ntn-Hydrolasen. **c)** Die Untereinheit  $\beta_2$  kovalent gebunden mit dem spezifischen synthetischen Inhibitor Ac-PRLN-vs. Günstige Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Arg-Seitenkette des Vinylsulfons mit den für die P3-Tasche verantwortlichen Aminosäuren  $\beta_2$ -Asp28 und  $\beta_3$ -Cys118 sind als orange Punkte dargestellt und verantworten die Selektivität dieses Inhibitors. Die Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\beta_5$  zeigen keine Inhibitor-Bindestellen. **d)** Die Untereinheit  $\beta_2$  nicht-kovalent gebunden mit dem Naturprodukt TMC-95A aus *Apio-spora montagnei*. TMC-95A bindet lediglich in die Substratbindetaschen aller aktiven Untereinheiten und modifiziert somit nicht das nukleophile Thr1O $\gamma$ . Die Wechselwirkungen des Inhibitors sind begründet durch die Faltung des Proteinmoleküls, so daß die Klasse der TMC-95-Verbindungen keine Effekte bezüglich anderer Proteasen aufzeigt.

fons mit den für die P3-Tasche verantwortlichen Aminosäuren  $\beta_2$ -Asp28 und  $\beta_3$ -Cys118 sind als orange Punkte dargestellt und verantworten die Selektivität dieses Inhibitors. Die Untereinheiten  $\beta_1$  und  $\beta_5$  zeigen keine Inhibitor-Bindestellen. **d)** Die Untereinheit  $\beta_2$  nicht-kovalent gebunden mit dem Naturprodukt TMC-95A aus *Apio-spora montagnei*. TMC-95A bindet lediglich in die Substratbindetaschen aller aktiven Untereinheiten und modifiziert somit nicht das nukleophile Thr1O $\gamma$ . Die Wechselwirkungen des Inhibitors sind begründet durch die Faltung des Proteinmoleküls, so daß die Klasse der TMC-95-Verbindungen keine Effekte bezüglich anderer Proteasen aufzeigt.

Im Gegensatz zu Lactacystin bindet der Calpain-Inhibitor I trotz hydrophober S1-Reste auch an die Untereinheiten  $\beta 1$  und  $\beta 2$ . Die Aldehydgruppe stellt aber im Vergleich zum  $\beta$ -Lactonring eine weitaus reaktivere funktionelle Gruppe dar und sorgt somit für eine schnellere Reaktion des Calpain-Inhibitor I am Thr10<sup>7</sup>, was die unterschiedlichen Spezifitäten der beiden Inhibitoren erklärt. Dieses Ergebnis lieferte den Anstoß zur ersten strukturbasierten Entwicklung von Inhibitoren für einzelne proteolytisch aktive Untereinheiten im 20S-Komplex ((Loidl *et al.*, 1999a). Da allerdings das 20S-Proteasom für den Abbau von entfaltenen Polypeptiden unspezifisch bezüglich der Selektion des Substrates und der Erkennung des Spaltmusters ist, gestaltete sich ein Design von peptidbasierten selektiven Inhibitoren anfangs als problematisch. Aufgrund der Kenntnis der Kristallstruktur des Hefe-20S-Proteasoms konnte jedoch für die Untereinheit  $\beta 2$  ein erster bifunktionaler Inhibitor, Maleoyl- $\beta$ -alanyl-valyl-arginal geplant und erfolgreich umgesetzt werden. So befindet sich die Seitenkette von Cys118 der Untereinheit  $\beta 3$  in der S3-Tasche des proteolytisch aktiven Zentrums von  $\beta 2$ . Die Orientierung dieser Aminosäure wurde für die rationale Synthese eines bivalenten Inhibitors mit einer Malenimid-Gruppe in der S3-Position für die kovalente Bindung mit der Thiolgruppe und einer carboxyterminalen Aldehydgruppe für die Hemiacetalformation mit der Thr1-Hydroxylgruppe am aktiven Zentrum genutzt. Die strukturbasierte Modellierung lieferte das Verständnis für den optimalen Abstand der Maleinimidgruppe zum P1-P2-Dipeptidaldehyd, und durch die Spezifität der S1-Tasche konnte die inhibitorische Aktivität für die Untereinheit  $\beta 2$  begrenzt werden. Die Röntgenstrukturanalyse des Hefe-20S-Proteasom:Inhibitor-Addukts bestätigt die zusätzliche irreversible Bindung des Inhibitors in der S3-Tasche. Bezogen auf die TL-Aktivität deutet der Vergleich des IC<sub>50</sub>-Wertes von Mal- $\beta$ AVR-al (0.5 $\mu$ M) dem IC<sub>50</sub>-Wert von Calpain-Inhibitor I (200 $\mu$ M) die potentielle Inaktivierung der Untereinheit  $\beta 2$  an und gibt erste Ideen für die Synthese neuer Inhibitoren.

Andererseits kann der eben beschriebene Mal- $\beta$ AVR-al-Inhibitor aufgrund der Reaktivität der Malenimidgruppe mit sämtlichen Thiolgruppen nur für proteasomale *in vitro*-Untersuchungen verwendet werden und steht für eine medizinische Anwendung nicht zur Verfügung. Mit Hilfe der strukturellen Daten des Hefe-20S-Proteasoms besteht allerdings auch Kenntnis über die einzigartige Topographie der Untereinheiten und die damit verbundenen Abstandskriterien der proteolytisch aktiven Zentren im 20S-Komplex. Somit bietet sich die Gelegenheit einer Synthese von homo- und heterobivalenten Inhibitoren, basierend auf Aldehyd-Kopfgruppen, die mit einem Zwischenstück entsprechend der Distanz der proteolytisch aktiven Untereinheiten zueinander verknüpft sind. In ersten Versuchen wurden als

Abstandshalter Peptide wie Gastrin (17mer) oder Sekretin (27mer) verwendet, die jedoch augenblicklich durch die Protease abgebaut werden. Diese Ergebnisse waren Anlaß für die Suche nach einem geeigneteren Zwischenstück, das in seiner Erscheinungsform einer entfalteten Polypeptidkette ähnelt und deshalb für die proteolytische Kammer des 20S-Partikels zugänglich ist, aber durch das 20S-Proteasom selber nicht mehr gespalten wird. Polyethylenglykole (PEG) sind durch ihre Flexibilität, Linearität und Proteasebeständigkeit für diese Art von Verwendung ideal geschaffen. So ergibt das Koppeln der N-Termini zweier Tripeptid-aldehyde mit dem *Polymerspacer*, der passend für die simultane Bindung an zwei unterschiedlichen proteolytisch aktiven Untereinheiten von den *nonprimed*-Spezifitätstaschen ausgewählt wurde, proteaseresistente bivalente Proteasominhibitoren (Loidl *et al.*, 1999b). Die Röntgenkristallstrukturen der synthetisierten Verbindungen mit dem Hefe-20S-Proteasom definieren jedoch nur die Aldehyd-Kopfgruppen und zeigen aufgrund der Flexibilität des PEG-*Spacers* hierfür keine Elektronendichten. Hingegen deuten die um zwei Größenordnungen reduzierten IC<sub>50</sub>-Werte der bifunktionalen Verbindungen (im nM-Bereich) verglichen mit den pegylierten monovalenten Aldehyden (im µM-Bereich) klar auf die bivalente Bindung hin. Das Prinzip der Multivalenz ist in der Natur allgegenwärtig und wurde bereits erfolgreich in der Vergangenheit für die Verbesserung von Affinitäten und von molekularen Erkennungsprozessen für Liganden eingesetzt. Die gegenwärtigen Resultate bestätigen, daß dieses Prinzip auch in bemerkenswerter Art und Weise für die Inhibition von multikatalytischen Proteasen genützt werden kann. Des weiteren ist PEG für seine Atoxizität, niedere Immunogenität, harmlose Entsorgung, hohe Wasserlöslichkeit und im wesentlichen für den erleichterten Molekültransport über Zellmembranen bekannt. Bislang wurde jedoch nicht überprüft, ob die Verbindungen zellpermeabel oder zytotoxisch sind und eine zukünftige Anwendung in der intrazellulären Medizin finden könnten.

Kürzlich wurde gezeigt, daß das Naturprodukt Epoxomicin, ein peptidisches  $\alpha',\beta'$ -Epoxyketon, irreversibel die proteolytisch aktiven Zentren von 20S-Proteasomen inhibiert (Meng *et al.*, 1999). Anders als bei einer Vielzahl von Proteasominhibitoren geht Epoxomicin spezifisch nur Bindungen mit dem 20S-Komplex ein, nicht aber mit Proteasen wie Calpain, Papain, Cathepsin A, Trypsin oder Chymotrypsin. Die Bestimmung der Kristallstruktur des Hefe-20S-Proteasom:Epoxomicin-Komplexes konnte die molekulare Grundlage für diese charakteristische und spezifische Eigenschaft der  $\alpha',\beta'$ -Epoxyketon-Inhibitoren aufklären (Groll *et al.*, 2000b). Die Elektronendichte läßt einen unerwarteten Morpholinoringschluß zwischen dem aminoterminalen Thr1 der aktiven  $\beta$ -Untereinheiten und Epoxomicin erkennen

und liefert erste Ideen bezüglich der einzigartigen Spezifität von Epoxomicin gegenüber 20S-Proteasomen (*siehe Abb. 15b*). So setzt sich das Morpholinoderivat höchstwahrscheinlich in einem Zweistufenprozeß zusammen. Im ersten Schritt wird das Thr10<sup>γ</sup> über die N-terminale Aminogruppe mit Hilfe eines Wassermoleküls zum Nukleophil aktiviert, welches augenblicklich mit dem Carbonylkohlenstoff des Epoxyketon-Pharmakophor unter Ausbildung eines Hemiacetals abreagiert, in analoger Reaktion wie bereits für den Calpain-Inhibitor I:20S-Proteasom-Komplex beschrieben. Die Formation des Hemiacetals erlaubt daraufhin die Produktbildung zum Morpholinoring. Während dieser Zyklisierung öffnet der N-Terminus des Thr1 den Epoxidring über eine intramolekulare Umlagerung unter Inversion des Kohlenstoffs in der C2-Position. Somit ist die beobachtete stringente Spezifität von Epoxomicin gegenüber 20S-Proteasomen aufgrund der Forderung nach jeweils einer N-terminalen nukleophilen Aminogruppe und einer nukleophilen Seitenkette für die Reaktion zu erklären und deutet darauf hin, daß die funktionelle Epoxyketon-Gruppe lediglich mit der kleinen Klasse der Ntn-Hydrolasen reagiert. Allerdings zeigt Epoxomicin aufgrund der irreversiblen Bindung an das proteolytisch aktive Zentrum zytotoxisches Verhalten gegenüber Zellen und ist somit als Therapeutikum nicht geeignet.

Eine neue Klasse von Proteasominhibitoren umfaßt Peptide mit einer funktionellen Vinylsulfon-Gruppe, welche im Vergleich zu der Aldehydgruppe weniger reaktiv ist (Bogyo *et al.*, 1997). Jedoch besitzen diese Verbindungen ähnlich begrenzte medizinische Relevanz wie die bereits aufgeführten Peptidaldehyde, da gefunden wurde, daß sie ebenso intrazelluläre Cysteinproteasen wie beispielsweise Cathepsin S hemmen und an 20S-Proteasome irreversibel binden. Die Kristallstruktur des Hefe-20S-Proteasom:Ac-YLLN-vs-Komplexes läßt eine kovalente Bindung zwischen den Thr10<sup>γ</sup>s aller proteolytisch aktiven Untereinheiten mit dem β-Kohlenstoffatom der Vinylsulfon-Gruppe erkennen (Groll *et al.*, 2002). Aufgrund von zwischenzeitlich gefundenen Ergebnissen von peptidbasierenden kovalenten Proteasominhibitoren wurde nach wesentlichen Grundbestandteilen, die selektiv an einzelne proteolytisch aktive proteasomale Untereinheiten binden, gesucht (Loidl *et al.*, 1999b); (Loidl *et al.*, 1999a) und für die Synthese neuer spezifischer Vinylsulfon-Inhibitoren verwendet (Nazif *et al.*, 2001). Dank des Vergleichs der Bindemodi von Peptidaldehyden mit dem 20S-Partikel konnte die Synthese eines proteasomspezifischen Vinylsulfons Ac-PRLN-vs, geplant und umgesetzt werden. Diese Verbindung besitzt im Vergleich zur Ausgangsverbindung Ac-YLLN-vs lediglich unterschiedliche Seitenketten in der P3- und P4-Position und inhibiert auch in Konzentrationen bis zu 10mM nur die Untereinheit β2. Die Kristallstrukturanalyse



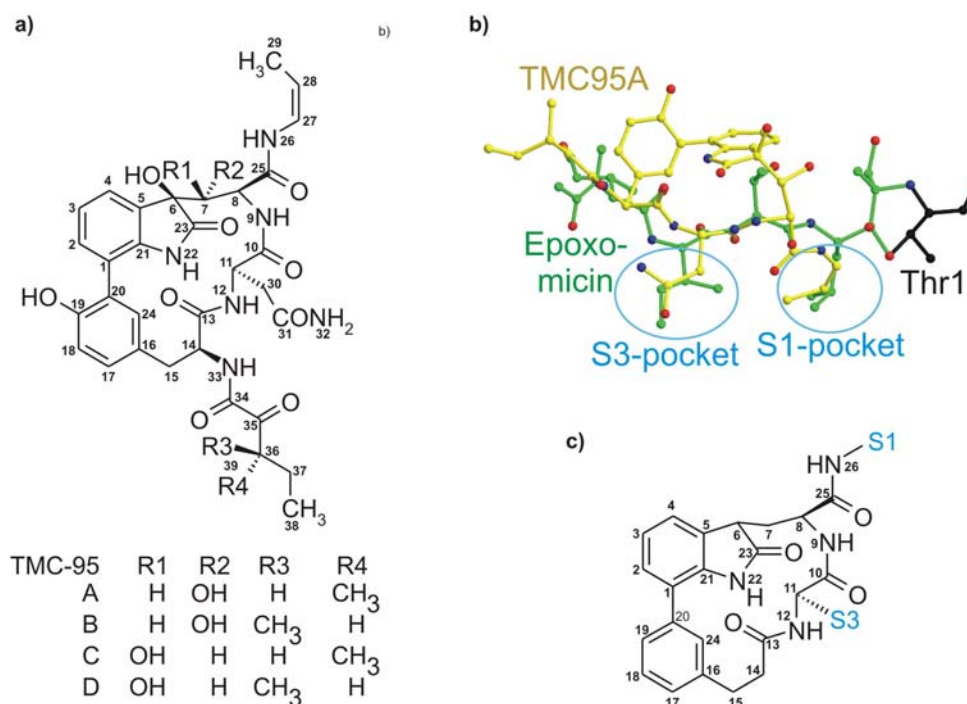
des Hefe-20S-Proteasoms mit dem Vinylsulfon erklärt die stringente Inhibitionseigenschaft der Verbindung infolge der günstigen Wechselwirkungen zwischen der P3-Seitenkette des Inhibitors und der großen S3-Tasche im 20S-Komplex, generiert durch die Grenzfläche der benachbarten  $\beta$ -Untereinheiten (*siehe Abb. 15c*) (Groll *et al.*, 2002). Bemerkenswert ist der Befund, daß lediglich der Austausch der S3- und S4-Seitenkette diesen Einfluß auf die Selektivität der proteasomalen Untereinheiten bewirkt, während die S1-Seitenkette Asparagin entgegen unspezifischer elektrostatischer Wechselwirkungen keinen Einfluß auf die Spezifität nimmt. Somit ist ein Design von zukünftigen Inhibitoren mit spezifischen Aminosäuren für Interaktionen mit Proteinseitenketten ausschließlich in der S3-Tasche möglich. Die zuvor schon beschriebene bivalente Verbindung Maleoyl- $\beta$ -alanyl-valyl-arginal, die für eine kovalente Bindung mit dem Cys118 der S3-Tasche geplant wurde und spezifisch die TL-Aktivität des Hefe-20S-Proteasom hemmt, lieferte ebenfalls erste Ideen für eine zukünftige struktur-basierte Modellierung rationaler Inhibitoren. Folglich erlauben die hier in Kürze zusammengefaßten Ergebnisse aufgrund der charakteristischen Spezifitätsmerkmale der S1- und S3-Positionen im 20S-Proteasom die einfache Synthese neuer Verbindungen, die zweifelsohne noch wirksamere, spezifischere und abstimmbare 20S-Proteasominhibitoren mit  $IC_{50}$  Werten weit im subnanomolaren Bereichen darstellen.

### 3.4.2 Nicht kovalent bindende 20S-Proteasominhibitoren

Das Proteasom besitzt eine notwendige Rolle für viele intrazelluläre irreversible Prozesse wie Mitose/Meiose, Zelldifferenzierung, Signalübertragung und Immunantwort. Alle bislang aufgeführten Proteasominhibitoren hemmen den 20S-Komplex jedoch kovalent und damit irreversibel, so daß ein möglicher Einsatz dieser Verbindungen im medizinischen Sektor weiterhin fraglich bleibt, da durch diese Eigenschaft die Apoptose in den Zellen induziert und folglich der Zelltod verursacht wird (Orlowski, 1999). Eine reversible und zeitbegrenzende Inaktivierung der spezifischen Untereinheiten im 20S-Partikel könnte eventuell die Zytotoxizität unterdrücken. Kürzlich wurde entdeckt, daß die Naturprodukte des japanischen Bergpilzes *Apiospora montagnei*, klassifiziert als TMC-95A-D, die proteolytische Aktivität von 20S-Proteasomen selektiv und im niederen nanomolaren Bereich blocken (Koguchi *et al.*, 2000); (Kohno *et al.*, 2000). Die Grundstruktur der Inhibitoren besteht aus modifizierten Aminosäuren, die miteinander ein heterocyclisches Ringsystem aufbauen und damit keinerlei Ähnlichkeiten zu den bisher bekannten Proteasominhibitoren haben (*siehe Abb. 16a*). Die Kristallstrukturanalyse des Hefe-20S-Proteasoms komplexiert mit TMC95A zeigt definierte Elektronendichte für den Inhibitor in allen proteolytisch aktiven Zentren (Groll *et al.*, 2001).



Die strukturellen Ergebnisse veranschaulichen, daß der Inhibitor nicht-kovalent und nur in Nähe der Thr10's bindet und entgegen den Befunden von allen anderen Proteasominhibitoren das N-terminale Threonin nicht modifiziert (*siehe Abb. 15d*). TMC95A wird in erster Linie durch eine große Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein stabilisiert. Im besonderen sind alle auftretenden Interaktionen über Wechselwirkungen zwischen TMC95A und Proteinhauptkettenatomen bzw. konservierten Aminosäuren im 20S-Proteasom definiert und weisen auf einen allgemeingültigen Bindungsmodus dieser Verbindungen mit Proteasomen verschiedenster Organismen hin. Die Anordnung von TMC-95A im 20S-Komplex ist ähnlich wie für die bereits beschriebenen Aldehyd- und Vinylsulfonverbindungen sowie Epoxomicin (*siehe Abb 16b*). So ragt die n-Propylenseitengruppe in die P1-Spezifitätstasche und wird zusätzlich über schwache hydrophobe Kontakte mit Lys33 gefestigt, während die S2-Subsite keinen Beitrag zur Stabilisierung des Naturprodukts liefert. Die Seitenkette des Asparagins von TMC95A ist tief in die S3-Spezifitätstasche inseriert und übernimmt dadurch einen großen Anteil für die unterschiedlichen IC<sub>50</sub>-Werte betreffend der verschiedenen proteolytisch aktiven Untereinheiten.



**Abb. 16:** **a)** Chemische Strukturformel der TMC-95-Verbindungen mit den Diastereomeren A-D. **b)** Überlagerung der  $\beta 5$ -Untereinheiten komplexiert mit TMC-95A und Epoxomicin. Die Abbildung ist auf die Inhibitoren (TMC-95A, dargestellt in gelb und Epoxomicin, dargestellt in grün) und das proteolytisch aktive Thr1 (dargestellt in schwarz) beschränkt. Die Überlagerung deutet auf eine analoge Anordnung der Seitenketten für die P1- und P3-Tasche für beide Inhibitoren hin und erlaubt somit das Design einer möglichen Leitstruktur von Proteasominhibitoren. **c)** Leitstruktursegment der TMC-95-Verbindungen, das für die spezifische Hemmung der Proteasome verantwortlich ist. Die Reste S1 und S2, dargestellt in blau, markieren die spezifischen Seitenketten, die hauptsächlich die Selektivität der verschiedenen Untereinheiten bestimmen.

Aufgrund der strukturbedingten Vorgabe inhibiert die Klasse der TMC-95-Verbindungen keine anderen Proteasen. Die hohe Spezifität und die niederen  $IC_{50}$ -Werte des natürlich vorkommenden Inhibitors erklären sich aus der Überlagerung der NMR-Struktur von TMC-95A in Lösung mit der Struktur der Verbindung im 20S-Proteasomkomplex, die keine konformellen Unterschiede des Inhibitors zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand erkennen läßt. Verantwortlich für die starre Konformation des TMC95-Inhibitors ist die starke Ringspannung im Molekül, die sich aufgrund der Querverbindung zwischen dem Tyrosin und der Oxindolseitenkette bildet. Somit entstehen bei der Komplexbildung des 20S-Proteasoms mit den TMC-95-Verbindungen gegensätzlich zu den flexiblen Liganden keine wesentlichen Umlagerungen und Einschränkungen von Freiheitsgraden, so daß die niedrigen  $IC_{50}$ -Werte entropischen Ursprungs sind. Eine bemerkenswerte Übereinstimmung zeigt die Überlagerung der  $\beta 2$ -Untereinheiten der Hefe-20S-Proteasomkristallstrukturen mit TMC-95A und mit AcPRLN-vs: die *backbone*-Amide und die S1- und S3-Seitenketten nehmen trotz nicht-kovalenter Bindung im Falle vom TMC-95A nahezu identische Positionen ein. Mit Hilfe der Informationen der strukturellen Ergebnisse besteht nun die Möglichkeit, über eine Leitstruktur basierend auf der Geometrie der Bindung von TMC-95A an das Hefe-20S-Proteasom neue reversible, selektive und für die Untereinheiten spezifische Inhibitoren zu planen (*siehe Abb. 16c*), die möglicherweise zukunftsnahe medizinisch relevante Verbindungen darstellen. Erste Ergebnisse liegen bereits mit der Totalsynthese der Leitstruktur, die ähnliche inhibitorische Eigenschaften wie das TMC-95-Naturprodukt aufweist, vor (Kaiser *et al.*, 2002).

## Literaturverzeichnis

- Akiyama K., Kagawa S., Tamura T., Shimbara N., Takashina M., Kristensen P., Hendil K.B., Tanaka K. and Ichihara A. (1994). Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon-gamma for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. *FEBS Lett* **343**(1), 85-8.
- Arendt C.S. & Hochstrasser M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14), 7156-61.
- Arendt C.S. & Hochstrasser M. (1999). Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *Embo J* **18**(13), 3575-85.
- Arrigo A.P., Tanaka K., Goldberg A.L. and Welch W.J. (1988). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* **331**(6152), 192-4.
- Bachmair A., Finley D. and Varshavsky A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186.
- Bainton D.F. (1981). The discovery of lysosomes. *J. Cell. Biol.* **91**, 66-76.
- Bergmann M., Brand E. and F. W. (1923). Umlagerung peptidischer Stoffe II. Derivate der  $\gamma$ -Amino- $\beta$ -oxybuttersäure. *Hoppe-Seyler's Zeitsch. F. Physiol. Chem.* **131**, 1-17.
- Bochtler M., Ditzel L., Groll M., Hartmann C. and Huber R. (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**(7), 295-317.
- Bochtler M., Ditzel L., Groll M. and Huber R. (1997). Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12), 6070-4.
- Bogyo M., McMaster J.S., Gaczynska M., Tortorella D., Goldberg A.L. and Ploegh H. (1997). Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13), 6629-34.
- Brannigan J.A., Dodson G., Duggleby H.J., Moody P.C., Smith J.L., Tomchick D.R. and Murzin A.G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* **378**(6555), 416-9.
- Brown M.G., Driscoll J. and 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 Immunol* **151**(3), 1193-204.
- Chen P. & Hochstrasser M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* **86**(6), 961-72.
- Chuang S.E., Burland V., Plunkett G., Daniels D.L. and 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), 1-6.
- Ciechanover A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* **79**(1), 13-21.
- Colman P., Jansonius J. and Matthews B. (1972). The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution. *J Mol Biol.* **70**(3), 701-724.

- Coux O., Tanaka K. and Goldberg A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**(1), 801-47.
- Dahlmann B., Kopp F., Kristensen P. and Hendil K.B. (1999). Identical subunit topographies of human and yeast 20S proteasomes. *Arch Biochem Biophys* **363**(2), 296-300.
- Dahlmann B., Kopp F., Kuehn L., Niedel B., Pfeifer G., Hegerl R. and Baumeister W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaebacteria. *FEBS Lett* **251**(1-2), 125-31.
- Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. (1990). Molecular cell biology. *W.H. Freeman and Company, New York*, 167-169.
- DeMartino G.N., McGuire M.J., Reckelhoff J.F., McCullough M.L. and Croall D.E. (1989). ATP-dependent mechanisms for protein degradation in mammalian cells. *Revis Biol Celular* **20**(4), 181-96.
- DeMartino G.N., Moomaw C.R., Zagnitko O.P., Proske R.J., Chu-Ping M., Afendis S.J., Swaffield J.C. and Slaughter C.A. (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* **269**(33), 20878-84.
- DeMartino G.N. & Slaughter C.A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem* **274**(32), 22123-6.
- Ditzel L., Huber R., Mann K., Heinemeyer W., Wolf D.H. and Groll M. (1998). Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome. *J Mol Biol* **279**(5), 1187-91.
- Driscoll J., Brown M.G., Finley D. and Monaco J.J. (1993). MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* **365**(6443), 262-4.
- Duggleby H.J., Tolley S.P., Hill C., Dodson E.J., Dodson G. and Moody P.C. (1995). Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre. *Nature* **373**, 264-268.
- Engelhard V. (1994). Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol.* **6**(1), 13-23.
- Etlinger J. & Goldberg A. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**(1), 54-58.
- Falkenburg P.E., Haass C., Kloetzel P.M., Niedel B., Kopp F., Kuehn L. and Dahlmann B. (1988). Drosophila small cytoplasmic 19S ribonucleoprotein is homologous to the rat multicatalytic proteinase. *Nature* **331**(6152), 190-2.
- Fehling H.J., Swat W., Laplace C., Kuhn R., Rajewsky K., Muller U. and von Boehmer H. (1994). MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* **265**(5176), 1234-7.
- Fenteany G., Standaert R.F., Lane W.S., Choi S., Corey E.J. and Schreiber S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **268**(5211), 726-31.
- Figueiredo-Pereira M.E., Banik N. and Wilk S. (1994). Comparison of the effect of calpain inhibitors on two extralysosomal proteinases: the multicatalytic proteinase complex and m-calpain. *J Neurochem* **62**(5), 1989-94.
- Frentzel S., Kuhn-Hartmann I., Gernold M., Gott P., Seelig A. and Kloetzel P.M. (1993). The major-histocompatibility-complex-encoded beta-type proteasome subunits LMP2 and LMP7. Evidence that LMP2 and LMP7 are synthesized as proproteins and that cellular levels of both mRNA and LMP-containing 20S proteasomes are differentially regulated. *Eur J Biochem* **216**(1), 119-26.

- Früh K., Gossen M., Wang K., Bujard H., Peterson P.A. and Yang Y. (1994). Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *Embo J* **13**(14), 3236-44.
- Gaczynska M., Rock K.L. and Goldberg A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* **365**(6443), 264-7.
- Glickman M.H., Rubin D.M., Coux O., Wefes I., Pfeifer G., Cjeka Z., Baumeister W., Fried V.A. and Finley D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**(5), 615-23.
- Goldberg A. & Dice J. (1974). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annu Rev Biochem.* **43**, 835-69.
- Gray C.W., Slaughter C.A. and DeMartino G.N. (1994). PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol* **236**(1), 7-15.
- Groettrup M., Standera S., Stohwasser R. and Kloetzel P.M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17), 8970-5.
- Groll M., Bajorek M., Köhler A., Moroder L., Rubin D.M., Huber R., Glickman M.H. and Finley D. (2000a). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* **7**(11), 1062-7.
- Groll M., Brandstetter H., Bartunik H., Bourenkow G. and Huber R. (2003a). Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes. *J Mol Biol.* **327**(1), 75-83.
- Groll M., Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik H.D. and Huber R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**(6624), 463-71.
- Groll M., Heinemeyer W., Jager S., Ullrich T., Bochtler M., Wolf D.H. and Huber R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20), 10976-83.
- Groll M., Kim K.B., Kairies N., Huber R. and Crews C.M. (2000b). Crystal structure of epoxomicin : 20S proteasome reveals a molecular basis for selectivity of alpha',beta'-epoxyketone proteasome inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **122**(6), 1237-1238.
- Groll M., Koguchi Y., Huber R. and Kohno J. (2001). Crystal structure of the 20 S proteasome:TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor. *J Mol Biol* **311**(3), 543-548.
- Groll M., Nazif T., Huber R. and Bogoyo M. (2002). Probing structural determinants distal to the site of hydrolysis that control substrate specificity of the 20S proteasome. *Chemistry&Biology* **9**, 1-20.
- Groll M. & Huber R. (2003b). Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol.* **35**(5), 606-616.
- Harris J. (1968). Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta.* **150**(3), 534-537.
- Hegerl R., Pfeifer G., Puhler G., Dahlmann B. and Baumeister W. (1991). The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting. *FEBS Lett* **283**(1), 117-21.
- Heinemeyer W., Fischer M., Krimmer T., Stachon U. and Wolf D.H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* **272**(40), 25200-9.

- Hershko A. & Ciechanover A. (1986). The ubiquitin pathway for the degradation of intracellular proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **33**, 19-56.
- Hershko A. & Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**(10), 425-79.
- Hoffman L., Pratt G. and Rechsteiner M. (1992). Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* **267**(31), 22362-8.
- Hoffman L. & Rechsteiner M. (1996). Regulatory features of multicatalytic and 26S proteases. *Curr Top Cell Regul* **34**(1-3), 1-32.
- Hübener G., Göhring W., Musiol H.-J.-. and Moroder L. (1992). N alpha-trifluoroacetylation of N-terminal hydroxyamino acids: a new side reaction in peptide synthesis. *Pept Res.* **5**(5), 287-292.
- Jäger S., Groll M., Huber R., Wolf D.H. and Heinemeyer W. (1999). Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* **291**(4), 997-1013.
- Kaiser M., Groll M., Renner C., Huber R. and Moroder L. (2002). The Core Structure of TMC-95A is a promising lead for Reversible Proteasome inhibition. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**(5), 780-783.
- Kloetzel P. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**(3), 179-187.
- Kloetzel P.M. (1998). The proteasome system: a neglected tool for improvement of novel therapeutic strategies? *Gene Ther* **5**(10), 1297-8.
- Koguchi Y., Kohno J., Nishio M., Takahashi K., Okuda T., Ohnuki T. and Komatsubara S. (2000). TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation, and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **53**(2), 105-9.
- Köhler A., Cascio P., Leggett D.S., Woo K.M., Goldberg A.L. and Finley D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Molecular Cell* **7**(6), 1143-1152.
- Kohno J., Koguchi Y., Nishio M., Nakao K., Kuroda M., Shimizu R., Ohnuki T. and Komatsubara S. (2000). Structures of TMC-95A-D: novel proteasome inhibitors from *Apiospora montagnei* sacc. TC 1093. *J Org Chem* **65**(4), 990-5.
- Kopp F., Dahlmann B. and Hendil K.B. (1993). Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J Mol Biol* **229**(1), 14-9.
- Krüger E., Kloetzel P. and Enenkel C. (2001). 20S proteasome biogenesis. *Biochimie.* **83**(3-4), 289-293.
- Lehmann A., Janek K., Braun B., Kloetzel P. and C. E. (2002). 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol.* **317**(3), 401-413.
- Li J. & Rechsteiner M. (2001). Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators. *Biochimie* **83**(3-4), 373-383.
- Loidl G., Groll M., Musiol H.J., Ditzel L., Huber R. and Moroder L. (1999a). Bifunctional inhibitors of the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes. *Chem Biol* **6**(4), 197-204.
- Loidl G., Groll M., Musiol H.J., Huber R. and Moroder L. (1999b). Bivalency as a principle for proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10), 5418-22.

- Löwe J., Stock D., Jap B., Zwickl P., Baumeister W. and Huber R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**(5210), 533-9.
- Lupas A., Zwickl P. and Baumeister W. (1994). Proteasome sequences in eubacteria. *Trends Biochem Sci* **19**(12), 533-4.
- Meng L., Mohan R., Kwok B.H., Elofsson M., Sin N. and Crews C.M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18), 10403-8.
- Nazif T. & Bogyo M. (2001). Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6), 2967-2972.
- Nussbaum A.K., Dick T.P., Keilholz W., Schirle M., Stevanovic S., Dietz K., Heinemeyer W., Groll M., Wolf D.H., Huber R. *et al.* (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21), 12504-9.
- Oinonen C., Tikkanen R., Rouvinen J. and Peltonen L. (1995). Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. *Nat Struct Biol* **2**(12), 1102-1108.
- Orlowski M., Cardozo C., Hidalgo M.C. and Michaud C. (1991). Regulation of the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry* **30**(24), 5999-6005.
- Orlowski M., Cardozo C. and Michaud C. (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* **32**(6), 1563-72.
- Orlowski M. & Wilk S. (2000). Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* **383**(1), 1-16.
- Orlowski R.Z. (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**(4), 303-13.
- Peters J.M. (1994). Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends Biochem Sci* **19**(9), 377-82.
- Pühler G., Weinkauff S., Bachmann L., Müller S., Engel A., Hegerl R. and Baumeister W. (1992). Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *Embo J* **11**(4), 1607-16.
- Ramos P.C., Hockendorff J., Johnson E.S., Varshavsky A. and Dohmen R.J. (1998). Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* **92**(4), 489-99.
- Realini C., Jensen C.C., Zhang Z., Johnston S.C., Knowlton J.R., Hill C.P. and Rechsteiner M. (1997). Characterization of recombinant REGalpha, REGbeta, and REGgamma proteasome activators. *J Biol Chem* **272**(41), 25483-92.
- Rivett A.J. (1989). The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* **268**(1), 1-8.
- Rohrwild M., Coux O., Huang H.C., Moerschell R.P., Yoo S.J., Seol J.H., Chung C.H. and Goldberg A.L. (1996). HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12), 5808-13.

- Scherrer K. & Bey F. (1994). The prosomes (multicatalytic proteinases; proteasomes) and their relationship to the untranslated messenger ribonucleoproteins, the cytoskeleton, and cell differentiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **49**(1), 1-64.
- Schmidt M., Zantopf D., Kraft R., Kostka S., Preissner R. and Kloetzel P.M. (1999). Sequence information within proteasomal prosequences mediates efficient integration of beta-subunits into the 20 S proteasome complex. *J Mol Biol* **288**(1), 117-28.
- Schmidtke G., Schmidt M. and Kloetzel P.M. (1997). Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Mol Biol* **268**(1), 95-106.
- Seemüller E., Lupas A. and Baumeister W. (1996). Autocatalytic processing of the 20S proteasome. *Nature* **382**(6590), 468-71.
- Seemüller E., Lupas A., Stock D., Löwe J., Huber R. and Baumeister W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**(5210), 579-82.
- Seelig A., Multhaup G., Pesold-Hurt B., Beyreuther K. and Kloetzel P.M. (1993). Drosophila proteasome Dm25 subunit substitutes the mouse MC3 subunit in hybrid proteasomes. The N-terminal domain is essential for subunit incorporation. *J Biol Chem.* **268**(34), 25561-7.
- Sibille C., Gould K.G., Willard-Gallo K., Thomson S., Rivett A.J., Powis S., Butcher G.W. and De Baetselier P. (1995). LMP2+ proteasomes are required for the presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr Biol* **5**(8), 923-30.
- Smith J.L., Zaluzec E.J., Wery J.P., Niu L., Switzer R.L., Zalkin H. and Satow Y. (1994). Structure of the allosteric regulatory enzyme of purine biosynthesis. *Science* **264**, 1427-1433.
- Stock D., Nederlof P.M., Seemüller E., Baumeister W., Huber R. and Löwe J. (1996). Proteasome: from structure to function. *Curr Opin Biotechnol* **7**(4), 376-85.
- Stohwasser R., Kuckelkorn U., Kraft R., Kostka S. and Kloetzel P.M. (1996). 20S proteasome from LMP7 knock out mice reveals altered proteolytic activities and cleavage site preferences. *FEBS Lett* **383**(1-2), 109-13.
- Tamura T., Nagy I., Lupas A., Lottspeich F., Cejka Z., Schoofs G., Tanaka K., De Mot R. and Baumeister W. (1995). The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*. *Curr Biol* **5**(7), 766-74.
- Tanaka K., Yoshimura T., Tamura T., Fujiwara T., Kumatori A. and Ichihara A. (1990). Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Lett* **271**(1-2), 41-6.
- Unno M., Mizushima T., Morimoto Y., Tomisugi Y., Tanaka K., Yasuoka N. and Tsukihara T. (2002). The Structure of the Mammalian 20S Proteasome at 2.75 Å Resolution. *Structure* **10**(5), 609-18.
- Ustrell V., Hoffman L., Pratt G. and Rechsteiner M. (2002). PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair. *EMBO J.* **21**(13), 3516-25.
- Van Kaer L., Ashton-Rickardt P., Eichelberger M., Gaczynska M., Nagashima K., Rock K., Goldberg A., Doherty P. and Tonegawa S. (1994). Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity* **1**(7), 533-541.
- Vinitzky A., Cardozo C., Sepp-Lorenzino L., Michaud C. and Orłowski M. (1994). Inhibition of the proteolytic activity of the multicatalytic proteinase complex (proteasome) by substrate-related peptidyl aldehydes. *J Biol Chem* **269**(47), 29860-6.



- Voges D., Zwickl P. and Baumeister W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**(1), 1015-68.
- Waxman L., Fagan J. and Goldberg A. (1987). Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *262* **6**, 2451-2457.
- Whitby F.G., Masters E.I., Kramer L., Knowlton J.R., Yao Y., Wang C.C. and Hill C.P. (2000). Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**(6808), 115-20.
- Witt E., Zantopf D., Schmidt M., Kraft R., Kloetzel P.M. and Kruger E. (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* **301**(1), 1-9.
- Woese C., Kandler O. and Wheelis M. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**(12), 4576-9.
- Xu Q., Buckley D., Guan C. and Guo H.C. (1999). Structural insights into the mechanism of intramolecular proteolysis. *Cell* **98**(5), 651-661.
- Yu B., Pereira M.E. and Wilk S. (1993). Changes in the structure and catalytic activities of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex following dialysis. *J Biol Chem* **268**(3), 2029-36.
- Zwickl P., Kleinz J. and Baumeister W. (1994). Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol* **1**(11), 765-70.
- Zwickl P., Lottspeich F. and Baumeister W. (1992). Expression of functional *Thermoplasma acidophilum* proteasomes in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **312**(2-3), 157-60.
- Zwickl P., Lottspeich F., Dahlmann B. and Baumeister W. (1991). Cloning and sequencing of the gene encoding the large (alpha-) subunit of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* **278**(2), 217-21.

## Abkürzungen

Englische Fachausdrücke sind im Text kursiv hervorgehoben. Ebenso sind lateinische Speziesnamen und Genbezeichnungen schräg gedruckt. Zwei kleine Buchstaben vor einem Protein- oder Gennamen identifizieren die zugehörige Spezies (z.B. *ec* – *Escherichia coli*). Für Aminosäuren werden sowohl der Ein- als auch der Drei-Buchstaben-Kode benutzt, für Nukleotide die gängigen Ein-Buchstaben-Abkürzungen.

Å	Angström (=0.1nm)	m	milli (10 <sup>-3</sup> )
Ac	Acetyl	min	Minute
<i>active site</i>	Aktivzentrum	M	Mol
AMC	7-Aminomethylcoumarin	MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
AS	Aminosäure	PGPH	<i>Peptidylglutamyl peptide hydrolase</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	RP	Regulator Partikel
<i>ball-and-stick</i>	Kugel-Stäbchen Modell	<i>rigid body</i>	starrer Körper
BrAAP	<i>Branched chain aminoacid-prefering</i>	r.m.s.d.	<i>root-mean-square deviation</i>
<i>coil</i>	unstrukturierte Region	RNA	Ribonukleinsäure
CL	<i>Chymotrypsin like</i>	S	Svedberg
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfonat
EC	<i>Enzyme Commission</i>	<i>spacer</i>	Zwischenstück
EM	Elektronenmikroskopie	SnAAP	<i>Small aminoacid-prefering</i>
kDa	Kilodalton	Suc	Succinyl
KP	<i>core particle</i> ; Kernpartikel	TL	<i>Trypsin like</i>
LMP	<i>Low molecular weights proteins</i>	<i>turn</i>	Umkehrschleife, Kehrtwendung
<i>loop</i>	Schleife	wt	Wildtyp
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )	Z	Carbobenzoxy

### Verwendete Nomenklatur der Aminosäuren

<i>Aminosäure</i>	<i>3-Buchstabencode</i>	<i>1-Buchstabencode (im Text verwendet)</i>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Cyclohexylalanin	Cha	Z
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
beliebige Aminosäure	Xaa	X

## Lebenslauf und Publikationen

### Dr. rer. nat. Michael Groll

Geburtstag-/ort 23.09.1971 in Donauwörth

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern: Dr. med. Christl Groll  
Dr. med. Hans Groll

Dienstadresse: Adolf-Butenandt-Institut  
der Universität München  
Institut für Physiologische Chemie  
Butenandtstr. 5, Gebäude B  
D-81377 München  
Tel.: +49-(0)89-2180-7-7086  
Fax: +49-(0)89-2180-7-7093  
EM: michael.groll@bio.med.uni-muenchen.de

### Schulbildung

1990 Abitur, Naturwissenschaftliches Gymnasium in Pocking, Landkreis Passau.

### Universitätsausbildung

- 2003–heute Wissenschaftlicher Assistent am Adolf Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der LMU.
- 1999–heute Habilitation am Universitätsklinikum Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Biochemie unter Leitung von Prof. Dr. P.-M. Kloetzel: "Strukturelle und funktionelle Zusammenhänge archaebakterieller und eukaryontischer 20S Proteasome"
- 1995-1998 Dissertation an der Fakultät Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München. Durchführung der Arbeit am Max Planck Institut für Biochemie, in Martinsried der Abteilung Strukturforschung unter Leitung von Prof. Dr. Robert Huber: "Kristallographische und biochemische Untersuchungen am 20S-Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae*"  
Prädikat: mit Auszeichnung bestanden.
- 1990-1995 Studium der Chemie an der Fakultät Chemie, Biologie und Geowissenschaften der Technischen Universität München.
- 1995 Diplomzeugnis in Chemie mit Beendigung der Diplomarbeit.  
Prädikat: sehr gut bestanden

**Auszeichnungen**

- 2001 Biotechnologiepreis der Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung, verliehen von Traudl Engelhorn-Vechiatto für "Intrazelluläre ATP-abhängige Proteolyse: Aufklärung der Röntgenstruktur des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae*", Klosters, 15/01/01.
- 1997 Kristallisationspreis, verliehen von Prof. Dr. R. Huber für Kristallisation von hslV aus *Escherichia coli*, Martinsried, 14/08/1997.
- 1996 Kristallisationspreis, verliehen von Prof. Dr. R. Huber für Kristallisation des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae*, Martinsried, 14/08/1996.

**Wissenschaftliche Kooperationen**

- 2002 Auslandsaufenthalt an der Harvard Medical School, Department of Cell Biology, Boston. Gemeinsame Projekte mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Finley; Prof. Dr. A. Goldberg; Prof. Dr. T. Walz und Prof. Dr. T. Rapoport [32].
- 2001 Gemeinsames Projekt mit Prof. Dr. M. Bogoy der University of California, Department of Biochemistry and Biophysics, San Francisco: "Röntgenstrukturanalyse von Vinylsulfonen komplexiert mit dem Hefe-20S-Proteasom: Neue Erkenntnisse über selektive Inhibition" [21].
- 2000 Gemeinsames Projekt mit der pharmazeutischen Industrie Tanabe Seiyaku Co., Discovery Research Laboratory, Japan: "Röntgenstrukturanalyse und biochemische Charakterisierung des Naturprodukts TMC-95A in Komplex mit dem 20S Proteasom: Identifizierung der Komponente als erster nichtkovalenter Proteasominhibitor" [17].
- 1999 Gemeinsames Projekt mit Prof. Dr. C. Crews der Yale University, Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, New Haven: "Aufklärung eines neuen Mechanismus zur irreversiblen Inhibition von Ntn-Hydrolasen am Beispiel von Epoxomicin komplexiert mit dem 20S Proteasom" [13].
- 1999 Gemeinsames Projekt mit Prof. Dr. H-G. Rammensee/Dr. H. Schild der Universität Tübingen, Institut für Zellbiologie: "Abbauuntersuchungen von Enolase 1 über das Hefe-20S-Proteasom" [5], [6].
- 1998-2003 Gemeinsame Projekte mit Prof. Dr. D. Finley der Harvard Medical School, Department of Cell Biology, Boston: a) "Charakterisierung und kristallographische Untersuchung von unterschiedlichen Eingangskonformationen des 20S Proteasoms aus *Saccharomyces cerevisiae*" b) "Erste strukturelle Erkenntnisse der 20S Proteasomenregulation vermittelt durch den 19S Komplex" [15], [16], [18].
- 1997-1998 Gemeinsames Projekt mit Prof. Dr. D. Wolf/Dr. W. Heinemeyer der Universität Stuttgart, Institut für Biochemie: a) "Mutationsstudien und kristallographische Untersuchungen der katalytischen 20S-Proteasomzentren aus *Saccharomyces*

*cerevisiae*." b) "Aufklärung des Mechanismus der Oktapeptidgenerierung durch das 20S Proteasom" [4], [8], [10].

1997-2004 Gemeinsame Projekte mit Prof. Dr. L. Moroder am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Bioorganische Chemie, Martinsried: "Planung, Synthese und kristallographische Untersuchungen von Inhibitoren des eukaryontischen 20S-Proteasoms" [3], [7], [9], [14], [20], [24], [27], [29], [31].

### Finanzierungsanträge

2001-2004 SFB 1887 *Molecular machines in protein folding and protein transport*, Projekt „HslUV and proteasome associated proteases.“

2004-2008 SFB 594 *Molecular machines in protein folding and protein transport*, Projekt „Structural characterisation of the mitochondrial TOM and Tob55 complexes.“

### Patentanmeldungen

2002 Europäisches Patent über "Verfahren zum Identifizieren von Inhibitoren des 20S und 26S Proteasoms" mit dem Industrieunternehmen Bayer AG.

2002 Patent über: "Non-covalent Proteasome Inhibitors", (I.P.C. A61K 38/55; G06F 17/30) mit dem Pharmaunternehmen Tanabe, Japan.

1998 Europäisches Patent über: "Bivalente Inhibitoren des Proteasoms" (GI-Zeichen 0204-2507), Garching Innovation GmbH.

### Eigene publizierte Arbeiten in referierten Journalen

[38] Borissenko L. and **Groll M.** (2004).

Crystal structure of TET protease reveals complementary protein degradation pathways in prokaryotes.

*Manuscript submitted.*

[37] Locher M., Lehnert B., Krauss K., Heesemann J., **Groll M.** and Gottfried W. (2004).

Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT.

*Manuscript submitted.*

[36] Umbreen S., Braun H., **Groll M.**, Kuckelkorn U., Wiegand E., Drung I., Kloetzel P., Schmidt B. (2004).

Tripeptide mimetics inhibit the 20S proteasome by covalent bonding to active threonines.

*Manuscript submitted.*

[35] Goettig P., Brandstetter H., **Groll M.**, Göhring W., Konarev P., Svergun DI., Huber R. and Kim J. (2004).

X-ray snapshots of peptide processing in mutants of tricorn interacting factor F1 from *T. acidophilum*.

*Manuscript submitted.*

- [34] **Groll M.**, Bochtler M., Brandstetter H., Clausen T. and Huber R. (2004).  
Molecular machines for protein degradation.  
*Chembiochem.* in press.
- [33] **Groll M.** and Huber R. (2004).  
Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle.  
*Biochim Biophys Acta.* **1695(1-3)**, 33-44
- [32] Ye1 J., Osborne A., **Groll M.** and Rapoport T. (2004).  
RecA-like Motor ATPases - lessons from structures.  
*Biochim Biophys Acta.* **1659 (1)**, 1-18.
- [31] **Groll M.\***, Kaiser M.\*, Siciliano C., Assfalg-Machleidt I., Weyher E., Kohno J.,  
Milbradt A., Renner C., Huber R. and Moroder L. (2004).  
Inhibition of eukaryotic 20S proteasome by TMC-95A analogues: factorising structural  
determinants.  
*Chembiochem.* **5 (9)**, 1256-66.
- [30] Neumayer W., **Groll M.**, Lehmann V., Antoneka U., Kahler S., Heesemann J. and  
Wilharm G. (2004).  
Yersinia enterocolitica type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression,  
purification, characterisation, and crystallisation.  
*Protein Expr Purif.* **35 (2)**, 237-47.
- [29] Kaiser M., Milbradt AG., Siciliano C., Assfalg-Machleidt I., Machleidt W., **Groll M.**,  
Renner C. and Moroder L. (2004).  
TMC-95A Analogues with Endocyclic Biphenyl Ether Group as Proteasome Inhibitors  
*Chemistry & Biodiversity* **1**, 161-173.
- [28] **Groll M.** and Clausen T. (2003).  
Molecular shredders: How proteasomes fulfill their job.  
*Curr. Opin. Struc Biol.* **13 (6)**, 665-673.
- [27] Kaiser M., Siciliano C., Assfalg-Machleidt I., **Groll M.**, Milbradt AG. and Moroder L.  
(2003).  
Synthesis of a TMC-95A Ketomethylene Analogue by Cyclization via Intramolecular  
Suzuki Coupling.  
*Org Lett.* **18;5(19)**, 3435-7.
- [26] **Groll M.** and Huber R. (2003).  
Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle.  
*Internat. J. Biochem. & Cell Biol.* **5**, 606-616.
- [25] **Groll M.**, Brandstetter H., Bartunik HD., Bourenkow G. and Huber R. (2003).  
Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes.  
*J. Mol. Biol.* **327**, 75-83.
- [24] Kim JS., **Groll M.**, Musiol H.J., Behrendt R., Kaiser M., Moroder L., Huber R., and  
Brandstetter H. (2002).

- Navigation inside a protease: substrate selection and product exit in the tricorn protease from *Thermoplasma acidophilum*.  
*J. Mol. Biol.* **324**, 1041-1050.
- [23] Brandstetter H., Kim JS., **Groll M.**, Göttig P. and Huber R. (2002).  
Structural basis for the processive protein degradation by tricorn protease.  
*Biol. Chem.*, **383**, 1157-1165.
- [22] Göttig P., **Groll M.**, Kim JS. and Brandstetter H. (2002).  
Structures of the tricorn-interacting aminopeptidase F1 with different ligands explain its mechanism.  
*EMBO J.* **21(20)**, 5343-5351.
- [21] **Groll M.**, Nazif T., Huber R. and Bogyo M. (2002).  
Probing structural determinants distal to the site of hydrolysis that control substrate specificity of the 20S proteasome.  
*Chem. & Biol.* **9**, 655-62.
- [20] Kaiser M., **Groll M.**, Renner C., Huber R. and Moroder L. (2002).  
The core structure of TMC-95A is a promising lead for reversible proteasome inhibition.  
*Angew. Chem. Int. Ed.* **41/5**, 780-783.
- [19] Brandstetter H., Kim JS., **Groll M.** and Huber R. (2001).  
Crystal structure of the tricorn protease reveals a protein disassembly line.  
*Nature* **414**, 466-470.
- [18] Finley D., Glickman M., Rubin D., **Groll M.**, Schmidt M., Kohler A., Huber R., and Braun B. (2001).  
The proteasome regulatory particle.  
*YEAST* **18**, S27-S27.
- [17] **Groll M.**, Koguchi Y., Huber R. and Kohno J. (2001).  
Crystal structure of the 20S proteasome:TMC-95A complex: A non-covalent proteasome inhibitor.  
*J. Mol. Biol.* **311**, 543-548.
- [16] Kohler A., Bajorek M., **Groll M.**, Moroder L., Rubin DM., Huber R., Glickman M. and Finley D. (2001).  
The substrate translocation channel of the proteasome.  
*Biochimie.* **83**, 325-332.
- [15] **Groll M.**, Bajorek M., Kohler A., Moroder L., Rubin DM., Huber R., Glickman M. and Finley D. (2000).  
A gated channel into the proteasome core particle.  
*Nature Struct. Biol.* **7**, 1062-1067.
- [14] Loidl G., Musiol HJ., **Groll M.**, Huber R. and Moroder L. (2000).  
Synthesis of bivalent inhibitors of eucaryotic proteasomes.  
*Journal of Peptide Science.* **6**, 36-46.

- [13] **Groll M.**, Kim KB., Kairies N., Huber R. and Crews CM. (2000).  
Crystal structure of epoxomicin:20S proteasome reveals molecular basis for selectivity of  $\alpha'$  $\beta'$ -epoxyketone proteasome inhibitors.  
*J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1237-1238.
- [12] Schmidtke G., Holzhütter H., Bogyo M., Kairies N., **Groll M.**, Emch R. and Groettrup M. (1999).  
How an inhibitor of the HIV-I protease modulates proteasome activity.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 35734-35740.
- [11] Bochtler M., Ditzel L., **Groll M.**, Hartmann C. and Huber R. (1999).  
The proteasome.  
*Annu. Rev. Biophys. & Biomol. Struct.* **28**, 295-306.
- [10] **Groll M.**, Heinemeyer W., Jäger S., Ullrich T, Bochtler M., Wolf DH. and Huber R. (1999).  
The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: A mutational and crystallographic study.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10976-10983.
- [9] Loidl G., **Groll M.**, Musiol HJ., Ditzel L., Huber R. and Moroder L. (1999).  
Bifunctional inhibitors of the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes.  
*Chem. & Biol.* **6**, 197-204.
- [8] Jäger S., **Groll M.**, Huber R., Wolf DH. and Heinemeyer W. (1999).  
Proteasome beta-type subunits: Unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function.  
*J. Mol. Biol.* **29**, 997-1013.
- [7] Loidl G., **Groll M.**, Musiol HJ., Huber R. and Moroder L. (1999).  
Bivalency as a principle for proteasome inhibition.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5418-5422.
- [6] Nussbaum AK., Dick TP., Keilholz W., Schirle M., Stevanovic S., Dietz K., Heinemeyer W., **Groll M.**, Wolf DH., Huber R., Rammensee HG. and Schild H. (1998).  
Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase I.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12504-12509.
- [5] Dick TP., Nussbaum AK., Deeg M., Heinemeyer W., **Groll M.**, Schirle M., Keilholz W., Stevanovic S., Wolf DH., Huber R., Rammensee HG. and Schild H. (1998).  
Contribution of proteasomal  $\beta$ -subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 25637-25646.
- [4] Ditzel L., Huber R., Mann K., Heinemeyer W., Wolf DH. and **Groll M.** (1998).  
Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome.  
*J. Mol. Biol.* **279**, 1187-1191.



- [3] Escherich A., Ditzel L., Musiol HJ., **Groll M.**, Huber R. and Moroder L. (1997).  
Synthesis, kinetic characterization and X-ray analysis of peptide aldehydes as inhibitors of the 20S proteasome from *Thermoplasma acidophilum* and *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Biol. Chem.* **378**, 893-898.
- [2] Bochtler M., Ditzel L., **Groll M.**, Huber R. (1997).  
Crystal structure of heat shock locus V (HslV) from *Escherichia coli*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6070-6074.
- [1] **Groll M.**, Ditzel L., Löwe J., Stock D., Bochtler M., Bartunik HD. and Huber R. (1997).  
Structure of the 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution.  
*Nature*. **386**, 463-471.

### Buchkapitel

- [4] **Groll M.** and Huber R. (2004).  
Structures of the yeast proteasome core particle in complex with inhibitors  
In: *Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy* (Adams, J.) Humana Press., New York.
- [3] **Groll M.** and Coux O. (2000).  
Proteasomes.  
In: *Proteinase and Peptidase Inhibition: Recent potential targets for drug development*  
(Smith, H. J. and Simons, C., Eds.) Taylor & Francis, London, New York.
- [2] Bochtler M., Ditzel L., Stock D., Löwe J., Hartmann, C. Dorowski A., Huber R. and **Groll M.** (1999).  
Proteasome crystal structures.  
In: *The role of regulated proteolysis* (Hilt, W. and Wolf, D. H., Eds.) RG Landes Bioscience, Georgetown, Texas.
- [1] **Groll M.** (1998).  
Crystallographic and Biochemical Characterisation of the 20S Proteasome from *S. cerevisiae*.  
Ph.D. thesis, Faculty of Chemistry, Biology and Earth Science of the Technical University of Munich.

## Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## Sonderdrucke

**Groll M.**, Kim KB., Kairies N., Huber R. and Crews CM. (2000).

Crystal structure of epoxomicin:20S proteasome reveals molecular basis for selectivity of a'b'-epoxyketone proteasome inhibitors.

*J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1237-1238.

**Groll M.**, Bajorek M., Kohler A., Moroder L., Rubin DM., Huber R., Glickman M. and Finley D. (2000).

A gated channel into the proteasome core particle.

*Nature Struct. Biol.* **7**, 1062-1067.

**Groll M.**, Koguchi Y., Huber R. and Kohno J. (2001).

Crystal structure of the 20S proteasome:TMC-95A complex: A non-covalent proteasome inhibitor.

*J. Mol. Biol.* **311**, 543-548.

**Groll M.**, Nazif T., Huber R. and Bogyo M. (2002).

Probing structural determinants distal to the site of hydrolysis that control substrate specificity of the 20S proteasome.

*Chem. & Biol.* **9**, 655-62.

**Groll M.**, Brandstetter H., Bartunik HD., Bourenkow G. and Huber R. (2003).

Investigations on the maturation and regulation of archaeobacterial proteasomes.

*J. Mol. Biol.* **327**, 75-83.