

2 Einleitung

2.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Ubiquitinierung ist eine reversible post-translationale Modifikation, die biologische Aktivitäten von Proteinen moduliert und in die Regulation nahezu aller zellulären Vorgänge eingreift. Ihre am besten charakterisierte Rolle ist die eines Degradationssignals. Hierzu wird Ubiquitin, ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren, isopeptidisch mit einem Zielprotein verknüpft. Die Verknüpfung mit mindestens drei weiteren Ubiquitineinheiten, die zur Bildung einer Poly-Ubiquitinkette führt, bewirkt, dass das Zielprotein spezifisch vom 26S Proteasom erkannt und durch Proteolyse entsorgt werden kann. Ubiquitinierung erfolgt über eine hierarchisch geordnete Reaktionskette von Ubiquitin aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen. Die Basis des UPS bildet eine makromolekulare Protease, das Proteasom, das für die Degradation der poly-ubiquitylierten Substrate verantwortlich ist. Die Endprodukte des proteasomalen Abbaus sind im allgemeinen Oligopeptide, während das Signalpeptid Ubiquitin recycelt wird (als Übersichtsartikel siehe (Hershko and Ciechanover, 1998); Abb. 2).

In einer Hefezelle gibt es ca. 20,000 26S Proteasomen (Ghaemmaghami et al., 2003; Russell et al., 1999). Jedes besteht aus einem proteolytisch aktivem Kernkomplex, dem 20S Proteasom, an das sich ein oder zwei regulatorische 19S „cap“ Komplexe anlagern können. In Säugetierzellen wurden zu den „cap“ Komplexen alternative Regulatoren gefunden. Der 11S Regulator (PA28) ist an der proteasomalen Epitopgenerierung aus intrazellulären Antigenen beteiligt (Kloetzel, 2004). Der PA200 Regulator wurde in Verbindung mit DNA Reparaturmechanismen gebracht (Rechsteiner and Hill, 2005).

Säugetierzellen verfügen über konstitutive und konditionelle 20S Proteasomen. Letztere werden durch Zytokine induziert gebildet und Immunproteasomen genannt. Hefen als einzellige Eukaryontenzellen verfügen über konstitutive Proteasomen.

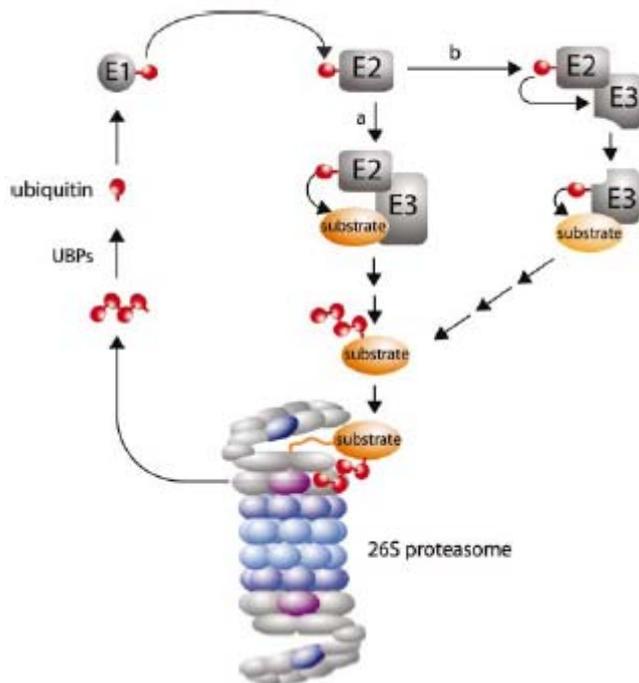


Abb. 2: Das UPS. Ubiquitin-prozessierende Hydrolasen (UBPs) setzen Ubiquitin (rot) frei. Ubiquitin-aktivierende (E1), -konjugierende (E2) und -ligierende (E3) Enzyme versehen ein spezifisches Substrat (orange) mit Polyubiquitinketten. Das polyubiquitylierte Substrat wird vom 26S Proteasom erkannt und als entfaltete Polypeptidkette den katalytisch aktiven Seitenketten im Inneren des 20S Proteasoms zugeführt. Das Substrat wird zu kurzen Oligopeptiden hydrolysiert, während Ubiquitin recycelt wird (Reprinted by permission from EMBO J. (Kostova and Wolf, 2003), copyright (2005) Macmillan Publishers Ltd.)

Über die Evolution hat sich die Grundstruktur des UPS von Hefe bis Mensch erhalten. Die Konserviertheit seiner Komponenten legitimierte die prinzipiellen Vorgänge des UPS in Hefe als Modellorganismus der Eukaryontenzelle zu untersuchen. Die Zugänglichkeit einer Vielzahl von genetischen und molekularbiologischen Methoden erleichterte zudem die Arbeit in Hefe. Aus Studien an Hefezellen konnten Prinzipien zellulärer Vorgänge erkannt, Modelle abgeleitet und auf das Säugetiersystem übertragen werden. Fundamentale Entdeckungen in der Hefeforschung, die zu einem besseren Verständnis der Biologie menschlicher Zellen beitragen, wurden mit der Vergabe von Nobelpreisen honoriert wie z. B. 2001 auf dem Gebiet der Zellzykluskontrolle, bei dem das UPS eine entscheidende Rolle spielt (Nurse et al., 1998).

2.2 Die Quarternärstruktur des eukaryontischen 20S Proteasoms

1968 veranschaulichten erstmals elektronenmikroskopische Untersuchungen das 20S Proteasom als zylinderförmiges Partikel (Harris, 1968). Mit einer Länge von ungefähr 15 nm und einem Durchmesser von 11 nm setzt sich der Zylinder aus 4 gestapelten Ringen zusammen. Der detaillierte Aufbau wurde 1997 mit der Röntgenstrukturanalyse des 20S Proteasoms aus Hefe *Saccharomyces cerevisiae* geklärt (Groll et al., 1997). Jeder Ring besteht aus je sieben verschiedenen Untereinheiten mit einer molekularen Masse zwischen 21 und 34 kDa, so dass sich für den gesamten Komplex eine molekulare Masse von ca. 700 kDa ergibt. Ein Homologievergleich der Primärsequenzen ordnet die Untereinheiten dem α - oder β -Typ zu, deren Klassifizierung von in Prokaryonten vorkommenden proteasomalen Untereinheiten abstammt (Zwickl et al., 1992). Die α -Untereinheiten bilden die beiden äusseren Ringe, die β -Untereinheiten die beiden inneren Ringe des 20S Proteasoms (Abb. 3). Das eukaryontische 20S Proteasom besteht somit aus zwei identischen Hälften, die durch Drehung um 180° ineinander überführt werden können (C2 Raumgruppe).

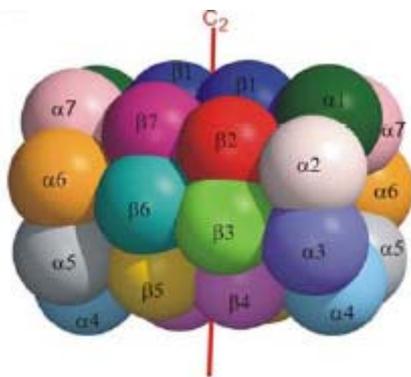


Abb. 3: Das 20S Proteasom im Kalottenmodell zeigt die Anordnung der Untereinheiten in der $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ Konfiguration (Abb. entnommen aus Groll et al. (1997) mit freundlicher Genehmigung von <http://www.nature.com>).

Die Klassen der α - und β -Untereinheiten sind in ihren Primärstrukturen wenig verwandt, bilden jedoch ähnliche Tertiärstrukturen. Unterschiede zwischen den α - und β -Untereinheiten finden sich in den N-terminalen Bereichen. Die α -Untereinheiten besitzen eine N-terminale Helix (H0), die die α -Ringe des 20S Proteasoms verschliessen und gefalteten Proteinen den Zugang in den katalytischen Innenraum erschweren (Groll et al., 2000). Dies begründet, dass 20S Proteasomen als latente Enzyme vorgefunden werden (Orlowski and Wilk, 2000).

Im Inneren des 20S Proteasoms verbergen sich 3 Hohlräume von ungefähr 5 nm Durchmesser. Der Hohlraum zwischen den beiden β -Ringen ist über die beiden Vorräume zwischen je einem α - und β -Ring zugänglich und beherbergt die katalytisch aktiven Aminosäureseitenketten (Groll et al., 1997).

2.3 Die Freisetzung der proteolytisch aktiven Zentren durch Zymogenaktivierung

Das 20S Proteasom wird der Familie der N-terminal nukleophilen Hydrolasen zugeordnet. N-terminal nukleophile Hydrolasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert und durch limitierte Proteolyse selbstaktiviert. Drei der sieben proteasomalen β -Untereinheiten, genannt $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$, liefern durch autolytische Abspaltung von Propeptiden Threonine als N-terminale Nukleophile für die Peptidhydrolyse. Bei der Autokatalyse der Propeptide und der Lyse eines Substratproteins erfolgt über die Hydroxylgruppe des Threonins ein nukleophiler Angriff auf die Carbonylgruppe der Peptidbindung, wobei der Amid-gebundene Stickstoff des Threonins als Protonenakzeptor fungiert. Der Einschub eines Wassermoleküls führt zur Spaltung der Peptidbindung (Ditzel et al., 1998).

Insgesamt werden fünf der sieben β -Untereinheiten als Vorläuferproteine synthetisiert, wobei die Prozessierung von $\beta 6$ und $\beta 7$ eine Ausweitung des Innenraums der Protease jedoch keine aktiven Zentren erbringt. Die Propeptide unterscheiden sich in ihren Primärsequenzen und, soweit dies aus Hefe bekannt ist, in ihrer Bedeutung bei der Reifung des 20S Proteasoms. Während die Deletion des $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 7$ Propeptids nur subtile Effekte auf die 20S Maturierung hat, ist das $\beta 5$ Propeptid unentbehrlich (Chen and Hochstrasser, 1996; Jager et al., 1999). Mit 75 Aminosäuren ist das $\beta 5$ Propeptid das längste unter den Propeptiden. Es wird in zwei Schritten prozessiert. Zuerst erfolgt ein Schnitt in trans innerhalb des Propeptids, der zu einem Intermediat führt und wahrscheinlich durch die bereits aktive $\beta 2$ -Untereinheit durchgeführt wird (Heinemeyer et al., 1997). Der zweite Schnitt in cis generiert das proteolytisch aktive Threonin als N-terminale Aminosäure der reifen $\beta 5$ Untereinheit (Ditzel et al., 1998; Schmidtke et al., 1996).

2.4 Die bevorzugten Spaltstellen des 20S Proteasoms

Seit bald 3 Jahrzehnten ist die enzymatische Funktion des Proteasoms bekannt (Wolf, 2000). Schon frühe biochemische Untersuchungen ließen erkennen, dass es sich beim Proteasom um eine multikatalytische Protease mit verschiedenen Spezifitäten und unabhängigen katalytischen Zentren handelt. Mithilfe von artifiziellen chromogenen Peptidsubstraten konnten Schnittpreferenzen an der Carbonylgruppe von hydrophoben, sauren und basischen Aminosäuren festgestellt werden, die einer chymotrypsin-ähnlichen, post-glutamyl-spaltenden und trypsin-ähnlichen Aktivität zugewiesen wurden (Orlowski and Wilk, 2000). Durch Zufallsmutagenese in Hefe wurden proteasomale β Untereinheiten getroffen, die zu verminderten proteolytischen Aktivitäten des 20S Proteasoms führten. In *pre1* und *pre2* ($\beta4$ und $\beta5$) Mutanten war die chymotryptische Aktivität betroffen, in *pre3* und *pre4* ($\beta1$ und $\beta7$) Mutanten die post-glutamyl-spaltende Aktivität beeinträchtigt (Heinemeyer et al., 1993; Heinemeyer et al., 1991; Hilt et al., 1993)*(Gueckel et al., 1998)*(Lehmann et al., 2002)*. Die Beteiligung der nicht-aktiven $\beta7$ -Untereinheit bei der Proteolyse erklärte sich dadurch, dass eine C-terminale Verkürzung von $\beta7$, wie durch die *pre4-1* Mutation hervorgerufen, die post-glutamyl-spaltende Aktivität und die Prozessierung benachbarter β -Untereinheiten inhibiert (Groll et al., 1999; Ramos et al., 2004).

Durch gerichtete Mutagenese in Hefe konnte ferner gezeigt werden, dass es eine Hierarchie in der Bedeutung der katalytisch aktiven β -Untereinheiten gibt. Ein Alaninaustausch des N-terminalen Threonins von $\beta1$ und $\beta2$ beeinträchtigte das Zellwachstum nur wenig, während der Austausch des $\beta5$ Threonins gegen Alanin lethal ist (Groll et al., 1999; Jager et al., 1999), sofern das $\beta5$ -Propeptid nicht in trans exprimiert wird (Chen and Hochstrasser, 1996). Sogesehen nimmt die $\beta5$ Untereinheit im 20S Proteasom eine hegemonale Stellung in der Autolyse und Proteolyse ein.

Die Kristallstruktur des 20S Proteasoms in Hefe gewährte Einblick in den Reaktionsraum der Protease (Abb. 4). Die chemischen Umgebungen, wie sie durch die Aminosäureseitenketten um die aktiven Threonine vorgegeben sind, erklären die

Spaltpräferenzen von $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$. So bevorzugt der apolare Charakter der Substratbindungstasche um das $\beta 5$ Threonin hydrophobe Strukturen, was erklärt, dass $\beta 5$ die chymotrypsin-ähnliche Aktivität beinhaltet. Die chymotryptische Aktivität reagiert besonders empfindlich auf natürlich vorkommende Inhibitoren, zu denen Lactacystin und Epoxomycin zählen. Sie werden bevorzugt von der $\beta 5$ Substratbindungstasche aufgenommen und binden irreversibel an die Hydroxylgruppe des $\beta 5$ Threonins. Peptidaldehyde wie Carbobenzoxy-Leucyl-Leucyl-Leucinal (MG132) wurden synthetisiert, um reversibel an nukleophile Gruppen wie die der katalytisch aktiven Threonine zu binden und proteasomale Aktivitäten zu inhibieren (siehe Übersichtsartikel von (Groll et al., 2005)).

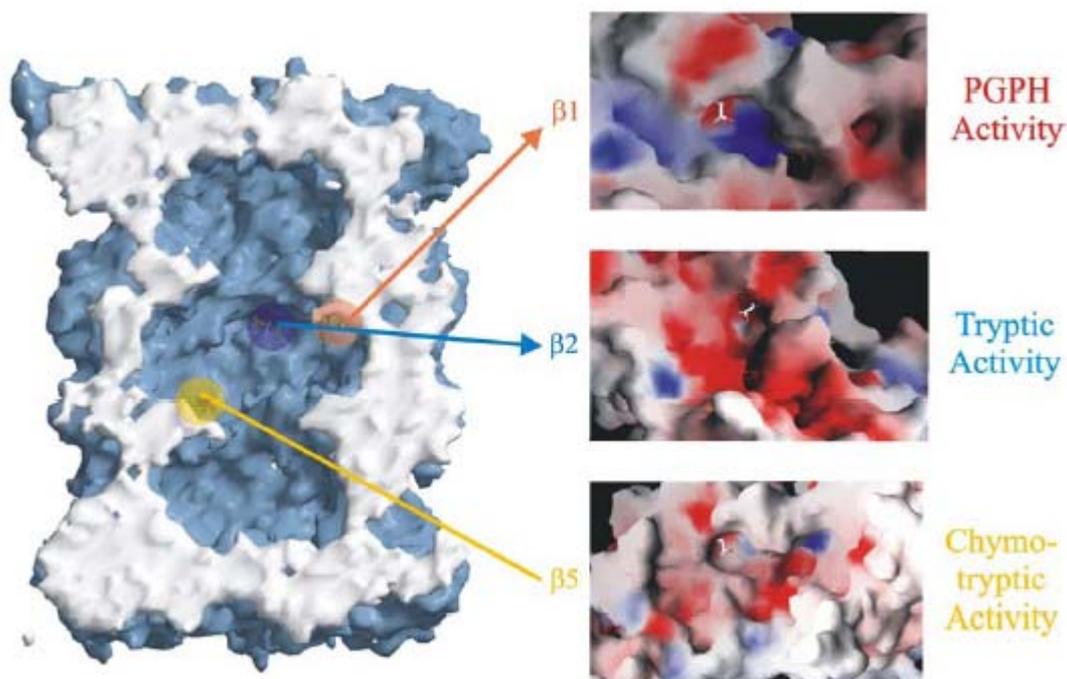


Abb. 4: Die katalytisch aktiven Threonine der $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ Untereinheiten. Schnitt entlang der pseudo-sieben-fachen Symmetrieachse des zylindrischen Partikels gewährt Einblick in die drei Hohlräume des 20S Proteasoms. In der inneren Kavität liegen die aktiven Zentren, in denen die N-terminalen Threonine als ball-and-sticks hervorgehoben sind. Im Oberflächenmodell sind die basischen Aminosäureseitenketten blau, die sauren rot und die hydrophoben weiß gezeichnet (entnommen aus (Groll et al., 2005) mit freundlicher Genehmigung von ChemBioChem).

2.5 Edukte und Produkte

Proteasomale in vivo Substrate sind kurzlebige Proteine, die intrazelluläre Vorgänge regulieren. Falsch gefaltete und beschädigte Proteine, die möglicherweise schon bei der Proteinsynthese anfallen, werden als Proteinmüll angesehen und über das UPS entsorgt (Turner and Varshavsky, 2000). Unter den proteasomalen Substraten befinden sich z.B. auch sekretorische Proteine, die im endoplasmatischen Retikulum (ER) nicht korrekt falten und retrograd aus dem ER zurück ins Zytosol geschleust werden, um dort von Proteasomen verdaut zu werden (Sommer and Wolf, 1997). Im Gegensatz zum Abbau polyubiquitylierter Substrate kann proteasomale Proteolyse auch auf bestimmte Domänen eines Proteins beschränkt sein, wie beispielsweise bei Transkriptionsfaktoren, deren Aktivierung aus inaktiven Vorläuferproteinen über limitierte proteasomale Proteolyse erfolgt (Rape and Jentsch, 2002).

Die Masse der proteasomalen Substrate ist vermutlich polyubiquityliert. Ihr Abbau benötigt das 26S Proteasom, da der regulatorische 19S Komplex die Erkennung der Polyubiquitinketten leistet. Nicht-ubiquitylierte Proteine können vom 20S Proteasom degradiert werden, sofern Domänen mit Faltungsdefekten vorliegen (Liu et al., 2003). In der Regel entstehen bei der proteasomalen Proteolyse Oligopeptide mit einer Länge von bis zu 25 Aminosäuren. Die Zusammensetzung der proteasomalen Produkte wurde in Datenbanken erfasst und durch statistische Berechnungen interpretiert, um Verdäumuster eines beliebigen Proteins vorhersagen zu können (Holzhutter et al., 1999).

2.6 Der regulatorische 19S „cap“ Komplex

Für die Erkennung der polyubiquitylierten Substrate, deren Entfaltung und Einschleussung in das Innere des 20S Proteasoms ist der regulatorische 19S Komplex verantwortlich. Er besteht aus mindestens achtzehn verschiedenen Untereinheiten, die zwei Subkomplexen, dem base (Basis) und lid (Deckel) Komplex, zugeordnet werden ((Glickman et al., 1998) Abb. 5).

Der Basis-Komplex besteht aus zwei hochmolekularen Proteinen, genannt Rpn1 und Rpn2, und einem Ring aus sechs ATPasen, numeriert von Rpt1 bis Rpt6, die zur

Familie der Tripel A-ATPasen gehören (Schmidt et al., 1999). In der 26S Konfiguration lagert sich der ATPase Ring an den α Ring des 20S Proteasoms an (Glickman et al., 1998). Den ATPasen ist zuzuschreiben, dass proteasomale Proteolyse Energie in Form von ATP verbraucht und 26S Proteasomen nur in Gegenwart von ATP als stabile Einheiten vorliegen (Hendil et al., 2002). Als Chaperonkomplex im Proteasom integriert, entfalten die ATPasen Substrate, um sie durch den benachbarten α Ring in das Innere des 20S Proteasoms zu befördern (Braun et al., 1999). Eine Schlüsselfunktion bei der Öffnung des Substratkanals wurde der ATPase Untereinheit Rpt2 zugeschrieben (Kohler et al., 2001).

Eine weitere ATPase, Rpt5, zeigte spezifische Interaktionen mit der Polyubiquitinkette von Substraten, wobei die Erkennung des Ubiquitinsignals selbst ATP-abhängig sei (Lam et al., 2002). Eine Vielzahl polyubiquitin-bindender Proteine assistieren dem regulatorischen 19S Komplex, um polyubiquitylierte Substrate der proteasomalen Degradation auszuliefern (als Übersichtsartikel siehe (Hartmann-Petersen and Gordon, 2004)

Da 20S Proteasomen keine ubiquitylierten Proteine abbauen, wurde im regulatorischen 19S Komplex nach einer Ubiquitin-Isopeptidase gesucht, die Ubiquitin aus den Substraten recycelt. Sie ist in der Rpn11 Untereinheit des Deckel-Komplexes verborgen (Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002).

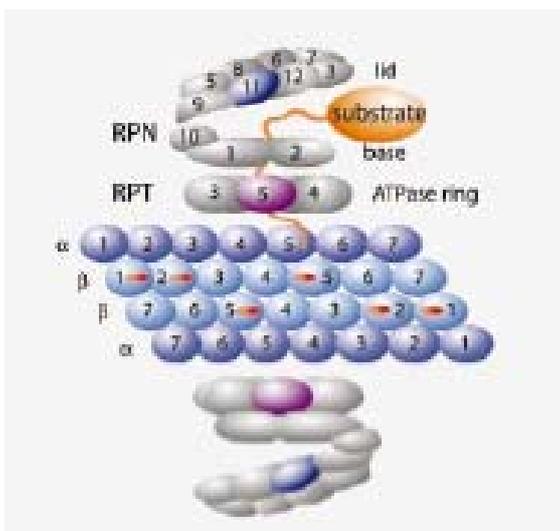


Abb. 5: Das 26S Proteasom bestehend aus 20S Kernkomplex und regulatorischen 19S Komplexen. Der base Subkomplex enthält die Untereinheiten Rpt1 bis Rpt6, Rpn1, Rpn2 und Rpn10 und lagert sich über den ATPase Ring an den α Ring des 20S Proteasoms an. Rpt5 ist als Ubiquitin-erkennende ATPase hervorgehoben. Der Deckel Subkomplex enthält 11 Rpn Untereinheiten, wobei die Ubiquitin-Isopeptidase Aktivität von Rpn11 hervorgehoben ist. Reprinted by permission from EMBO J. (Kostova and Wolf, 2003).

2.7 Die Biogenese des 20S Proteasoms

Die Frage, wie 2 mal 14 verschiedene Untereinheiten im eukaryontischen 20S Proteasom platziert werden, wurde vor 10 Jahren angegangen (Frentzel et al., 1994). Erste Modelle waren postuliert worden, die die Assemblierung prokaryotischer 20S Proteasomen beschrieben. Da sich diese aus je einer oder zwei verschiedenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzen, konnten die Untereinheiten rekombinant exprimiert und in vitro assembliert werden. Dimere aus α - und pro- β Untereinheiten wurden als frühe Assemblierungsintermediate bezeichnet. Ringe von α -Untereinheiten, an die sich pro- β Untereinheiten anlagerten, wurden als Vorstufen eines halb-assemblierten 20S Proteasoms angesehen (Baumeister et al., 1998). Obwohl Halbproteasomen genannt, dürften sich diese Vorläuferkomplexe strukturell stark von einem formal in die Hälfte geschnittenem 20S Proteasom unterscheiden, da mit der Zymogenaktivierung Konformationsänderungen einhergehen (Mullapudi et al., 2004).

In eukaryontischen Zellen wird der Vorgang der Assemblierung von einem 17 kDa Protein, in Hefe genannt Ump1, unterstützt (Krüger et al., 2001)*. Der Name Ump1 stammt von einem genetischen Komplementationstest mit *ump1* Mutanten ab, in denen die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse defekt ist. Bezeichnend für diesen für proteasomale Mutanten typischen Phänotyp ist eine erhöhte Sensitivität gegen Temperaturstress und Umweltgifte, die eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine induzieren. Im Gegensatz zu den meisten proteasomalen Untereinheiten, die von essentiellen Genen kodiert werden, ist die Deletion von Ump1 nicht lethal. Die Deletion von Ump1 bewirkt, dass die β -Propeptide während der 20S Proteasomenreifung verlangsamt prozessiert werden, was in Wildtypzellen ungefähr in 30 Minuten, einem Drittel des Zellzyklus, abgeschlossen ist. Das Fehlen von Ump1 und die damit verbundene Beeinträchtigung proteasomaler Funktionen wird jedoch durch erhöhte Expression der proteasomalen Gene durch den proteasomalen Transkriptionsfaktor Rpn4 kompensiert (London et al., 2004). Dies beruht auf einer Störung des negativen Rückkopplungsmechanismus, der durch den proteasomalen „Turnover“ des proteasomalen Transkriptionsfaktors Rpn4 gewährleistet wird (Xie and Varshavsky, 2001). Bei ineffizienter Proteasomenreifung kann die Degradation

von Rpn4 nicht ordnungsgemäß erfolgen (Ju et al., 2004), so dass die Expression proteasomaler Gene entsprechend induziert wird (London et al., 2004).

Bislang ist unbekannt, bei welchem Schritt Ump1 in den Vorläuferkomplex eingebaut wird. Die gängige Vorstellung ist, dass, sobald alle 14 Untereinheiten und Ump1 in einem noch inaktiven Vorläuferkomplex zusammengefunden haben, eine spontane Dimerisierung zweier Vorläuferkomplexe stattfindet. Genetische Studien in Hefe deuten darauf hin, dass Ump1 wie ein Führungsglied die Orientierung der beiden sich annähernden β Ringe erleichtert (Heinemeyer et al., 2004). Bei der Dimerisierung entsteht ein sehr kurzlebiges Intermediat, das so genannte Preholoproteasom (Baumeister et al., 1998). In diesem Übergangszustand wird die Abspaltung der Propeptide ausgelöst, wodurch die aktiven Threonine freigesetzt und der katalytische Innenraum ausgeweitet wird. Hierbei wird Ump1 in der inneren Kavität eingeschlossen und zum ersten Substrat des reifen 20S Proteasoms (Ramos et al., 1998).

Bei der Maturierung sind nicht nur die Propeptide im N-terminalen Bereich der β Untereinheiten strukturellen Veränderungen unterworfen. So muss sich zum Beispiel auch der C-terminale Bereich von $\beta 7$ derart positionieren, dass er in eine Spalte zwischen der $\beta 1$ und $\beta 2$ Untereinheit im gegenüberliegenden β Ring eindringen und wie eine Klammer die beiden Hälften des reifen 20S Proteasoms umfassen kann (Ramos et al., 2004).

Alle zur Proteasomenbiogenese erfolgten Studien standen im Einklang mit dem ursprünglich von Hochstrasser formulierten Modell (Abb. 6), das bereits 1996 das Prinzip der Assemblierung des C2-symmetrischen Partikels aus zwei identischen Vorläuferkomplexen erfasste (Chen and Hochstrasser, 1996). Hochstrassers Modell für die Proteasomenassemblierung in Hefe wurde nachträglich durch Ump1 modifiziert (Ramos et al., 1998) und lässt sich auf die Biogenese von 20S Proteasomen höherer Eukaryonten anwenden (Kloetzel, 2004).

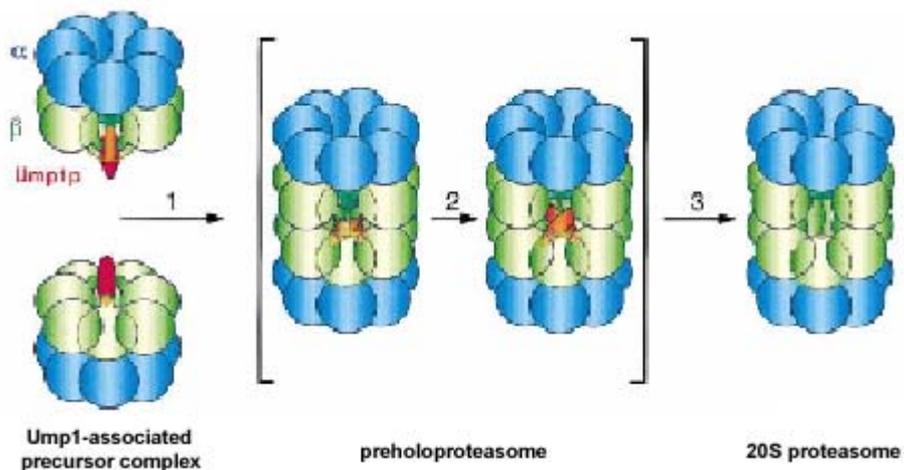


Abb. 6: Das Modell der Biogenese des 20S Proteasoms in Hefe wurde ursprünglich von Chen und Hochstrasser (1996) postuliert und mit der Entdeckung des Maturierungsfaktors Ump1 von Ramos et al. (1998) erweitert. 20S Proteasomhälften symbolisieren Ump1 (rot)-assoziierte Vorläuferkomplexe, die den α Ring (blau) und β -Untereinheiten in ihrer Proform (grün) enthalten. Die Dimerisierung zweier Vorläuferkomplexe führt zu einem kurzlebigen Intermediat, dem so genannten Preholoproteasom, in dem die autokatalytische Propeptidprozessierung und Degradation von Ump1 ausgelöst werden (entnommen aus Ramos et al. (1998) mit freundlicher Genehmigung von Cell Elsevier).

Einzelheiten zu Struktur und Biogenese von Proteasomen in Hefe habe ich in einem Lehrbuchartikel über „Ubiquitin and the Proteasome in Neurodegeneration“ zusammengefasst. Der Artikel wird beim Kluwer Verlag (Eds. J. Keller und L. Stefanis) im Herbst 2005 erscheinen.

2.8 Der Kerntransport

Ein wesentliches Merkmal der Eukarontenzelle ist ihre Kompartimentierung in Kern- und Zytoplasma. Beide Funktionsräume werden durch eine Doppelmembran, die äussere und innere Kernhülle, getrennt. Der Materialaustausch zwischen dem Kern- und Zytoplasma erfolgt über Kernporen, die die Kernhüllendoppelmembranen durchspannen. In Hefe sind Kernporen Proteinassoziate von ca. 60 Mda, bestehend aus ca. 30 verschiedenen Proteinen, genannt Nukleoporinen. Die zylindrische Struktur mit oktagonaler Symmetrie der Kernpore erinnert an ein Rad mit acht Speichen. Sein Außendurchmesser beträgt ca. 97 nm und sein Innendurchmesser ca. 44 nm. Wie eine Radkappe befindet sich in der Mitte ein Pfropf von ungefähr 35 nm Durchmesser, dessen Zusammensetzung noch umstritten ist, und von dem aus ca. 30-

40 nm lange periphere Filamente in das Nukleo- und Zytoplasma ragen. Während die nukleoplasmatischen Filamente distal in einer Basketballkorb-ähnlichen Struktur zusammenlaufen, weisen die zytoplasmatischen Filamente wie Tentakeln auseinander (Rout et al., 2000).

Diese Strukturen erlauben den passiven Transport von Ionen, kleinen Molekülen und Proteinen von weniger als 20 kDa und beschränken die Passage von Makromolekülen auf solche, die ein Signalpeptid tragen. Ein Kernlokalisierungssignal weist ein Protein in den Kern und ein Kernexportsignal ein Protein in das Zytoplasma. Das als erstes gefundene und am besten charakterisierte Kernlokalisierungssignal (NLS) ist das klassische NLS. Als einteiliges NLS besteht es aus einem kurzen Abschnitt von basischen Aminosäuren, die sich von einem Prototyp im SV40 T Antigen (**PKKKRKV**) ableiten. Der Prototyp des zweiteiligen NLS ist in Nukleoplasmin zu finden (**VKRPAATKKAGQAKKKKLD**). Er ist durch zwei kurze Sequenzen von basischen Aminosäuren gekennzeichnet, zwischen die sich ein Abschnitt von ca. 10-12 variablen Aminosäuren einschleibt (als Übersichtsartikel siehe (Gorlich and Kutay, 1999)).

Während meiner Postdoczeit zu dieser Arbeit habe ich den entsprechenden Rezeptor identifiziert, der Proteine mit NLS erkennt und deren Import in den Kern vermittelt. Der NLS Rezeptor fungiert als Heterodimer, genannt Karyopherin / Importin $\alpha\beta$ (Adam and Adam, 1994; Enenkel et al., 1995; Gorlich et al., 1995a; Moroianu et al., 1995)*. Karyopherin α übernimmt die spezifische Erkennung des NLS Peptids, während Karyopherin β die Bindung an bestimmte repetitive Sequenzmotive der Nukleopore vermittelt (Rexach and Blobel, 1995).

Verschiedene Modelle sind in den letzten Jahren postuliert worden, die die Translokation eines mit Proteinfracht beladenen Karyopherins durch die Kernpore beschreiben. Ihnen ist gemeinsam, dass hydrophobe Wechselwirkungen die Affinität zwischen Karyopherin β und Nukleoporinen bestimmen und die gerichteten Prozesse durch die Kernpore erlauben. Die treibende Kraft für die Translokation ist der zwischen Zyto- und Nukleoplasma bestehende Gradient von GDP- bzw. GTP-gebundener Ran GTPase. Ein Ran-GTPase aktivierendes Protein bewirkt, dass Ran im Zytoplasma in GDP-gebundener Form vorliegt. Ein Ran Guaninnukleotid-

Austauschfaktor sorgt im Kern für die GTP-Beladung der Ran GTPase. In Gegenwart von Ran-GDP liegt Karyopherin $\alpha\beta$ als Heterodimer vor, was seine Beladung mit Frachtproteinen im Cytoplasma erlaubt (Abb. 7).

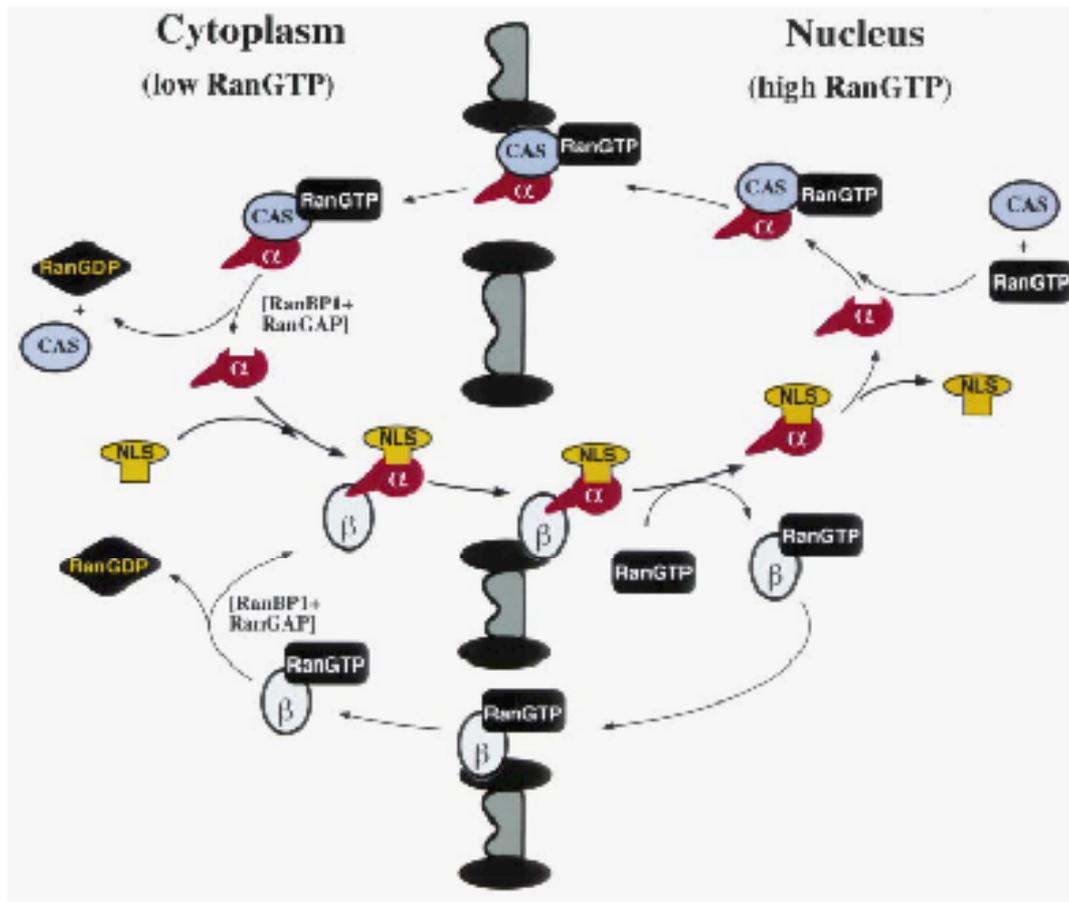


Abb. 7: Der klassische NLS-abhängige Importweg über Importin / Karyopherin $\alpha\beta$. Im Cytoplasma erkennt Karyopherin $\alpha\beta$ (rot / weiss) NLS-tragende Frachtproteine (gelb) und transportiert sie zur Kernpore. Auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore wird der ternäre Importkomplex durch Ran-GTP dissoziiert. Ran-GTP bindet an Karyopherin β und ermöglicht dessen Export ins Cytoplasma. Das Frachtprotein wird von Karyopherin α entlassen. Karyopherin α wird über ein spezifisches Ran-GTP gebundenes Exportin, genannt CAS im Säuger bzw. Cse1 in Hefe, ins Cytoplasma zurückgeführt (entnommen aus Kutay und Görlich (1999) Reprinted, with permission, from the *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, Volume 15 ©1999 by Annual Reviews www.annualreviews.org).

Angekommen an der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore wird der ternäre Komplex aus Frachtprotein und Karyopherin $\alpha\beta$ dissoziiert und das Frachtprotein in

den Kern entlassen. Hierbei löst Ran in seiner GTP-gebundenen Form Karyopherin α von Karyopherin β ab, um deren Rücktransport ins Zytoplasma zu eröffnen (siehe Übersichtsartikel von (Fried and Kutay, 2003)).

Im Hefegenom befinden sich neben Karyopherin $\alpha\beta$ 13 verschiedenen Karyopherine, deren Substratspektrum nur rudimentär erfasst ist (Wozniak et al., 1998). Sie bilden die Karyopherin β Familie, haben eine ähnliche molekulare Masse (90 – 150 kDa) und enthalten ca. 19 so genannte sich wiederholende HEAT Motife, die zu den 10 Armadillo Motifen in Karyopherin α verwandt sind (Andrade et al., 2001). Eine hohe Konserviertheit der β Karyopherine ist im N-terminalen Bereich zu finden, in dem die Interaktionsdomäne für Ran-GTP vermutet wurde (Gorlich et al., 1997).

Inzwischen sind Kristallstrukturen von Bindungsdomänen zwischen Karyopherin α und Karyopherin β , Karyopherin α mit NLS Peptiden, sowie Karyopherin β Fragmenten mit arretiertem Ran-GTP und repetitiver Nukleoporinsequenzen gelöst. Ihre Analyse erlaubte den molekularen Mechanismus des Kernimportes, im Besonderen der Substraterkennung, der Substratfreisetzung durch die Ran-GTPase und die Interaktionen mit der Kernpore zu verstehen (als Übersichtsartikel siehe (Chook and Blobel, 2001)).

Neuere Ansätze richteten sich auf kinetische Studien, um die Raten von Transportprozessen zu erfassen (Ribbeck and Gorlich, 2001). Um eine Vorstellung zu vermitteln, mit welchen Raten makromolekulare Frachtproteine und deren Komponenten durch die Kernpore transportiert werden, berechnete Warner die Transportkapazität einer Kernpore für ribosomale Untereinheiten. Bei der Ribosomenneusynthese müssen ca. 80 verschiedene Proteine in den Kern importiert werden, um sie im Nukleolus mit der ribosomalen RNA in ribosomale pre-40S und pre-60S Untereinheiten zu integrieren. Da die Translation im Zytoplasma stattfindet, müssen die preribosomalen Partikel aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert werden. In Hefe werden bei einer Generationszeit von 100 Minuten ca. 200,000 Ribosomen neu gebildet. Das bedeutet, dass bei ungefähr 150 Kernporen pro Hefezelle minütlich durch eine Kernpore gleichzeitig ca. 1,000 ribosomale Proteine importiert und ca. 25 preribosomale Untereinheiten exportiert werden (Warner, 1999).

2.9 Hypothesen zum Kernimport von Proteasomen zu Beginn der Arbeit

Nicht so komplex wie der Kerntransport des ribosomalen Systems erschien der Kernimport des Proteasoms. Bereits 1990 hatte Tanaka eine Hypothese zum Kernimport des 20S Proteasoms aufgestellt. 20S Proteasomen würden dem klassischen NLS Importweg folgen, da potentielle, klassische NLS Motife in α -Untereinheiten vorhanden sind. Diese Sequenzmotife seien möglicherweise durch Interkonversion induzierte Konformationsänderungen zugänglich oder maskierbar, wodurch der Kernimport von Proteasomen reguliert werden könnte (Tanaka et al., 1990). Synthetische Peptide mit proteasomalen NLS Sequenzen wurden an fluoreszente Trägermoleküle gekoppelt, um deren Funktionalität als NLS in vitro zu überprüfen. Hierzu wurden etablierte Rekonstitutionstests des Kernimports verwendet. Kerne digitonin-permeabilisierter Säugetierzellen nahmen die proteasomalen NLS-Reporterproteine bereitwillig auf (Knuehl et al., 1996; Nederlof et al., 1995). Selbst aus Prokaryonten isolierte 20S Proteasomen konnten NLS-abhängig in den Kern des Säugetierzellsystems importiert werden (Wang et al., 1997). Jedoch gelang es nicht, als der entsprechende NLS Rezeptor entdeckt war, durch dessen Zugabe den Import des 20S Proteasoms zu stimulieren (Mayr et al., 1999).

1997 belebten in vivo Studien an Säugetierzellen die kontroverse Diskussion über den Kernimport von 20S Proteasomen. 20S Proteasomen wurden mit dem Grünen Fluoreszenzprotein (GFP) markiert und gleichmässig über Kern- und Zytoplasma in einer Fibroblastenzelllinie verteilt vorgefunden. Mittels konfokaler Laser-scanningfluoreszenzmikroskopie wurden 20S Proteasomen im Kern gebleicht, um den nukleären Import der im Zytoplasma befindlichen fluoreszenten 20S Proteasomen zu beobachten. Solange die Kernhülle intakt war, wurde kaum ein Import von 20S Proteasomen in den Kern verzeichnet. Eine effiziente Aufnahme von 20S Proteasomen in den Kern erfolgte lediglich während der Mitose, die mit der Auflösung der Kernmembran einhergeht (Reits et al., 1997). In Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, einem Organismus mit geschlossener Mitose, können Proteasomen nur über Kernporen zwischen Zyto- und Nukleoplasma ausgetauscht werden. Deshalb entschieden wir uns für diesen Organismus, um die Signale und den Rezeptor des nukleären Imports von Proteasomen zu studieren.