

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Identifizierung des klassischen Importrezeptors Karyopherin / Importin $\alpha\beta$ in Hefe

Als ich meine Postdoc-Arbeit im Labor von Günter Blobel am Kernimport begann, wurde der NLS-abhängige Kernimport im Säugetiersystem intensiv beforscht (Adam and Adam, 1994). Importin / Karyopherin  $\alpha$  wurde als essentielle Komponente des klassischen NLS Rezeptors entdeckt (Gorlich et al., 1994; Weis et al., 1995). Meine Arbeit trug den klassischen NLS Rezeptor aus Hefe bei und zeigte, dass Karyopherin  $\alpha\beta$  nur als Heterodimer seine Rolle als NLS-Rezeptor erfüllen kann (Enekel1995)\*. Eine detaillierte Analyse erbrachte, dass Karyopherin  $\alpha$  das NLS Substrat adaptiert und Karyopherin  $\beta$  den Transport durch die Kernpore vermittelt (Gorlich et al., 1995a; Moroianu et al., 1995; Rexach and Blobel, 1995).

Um den molekularen Mechanismus der Interaktion von Karyopherin  $\alpha$  mit Karyopherin  $\beta$  und der Dissoziation von Karyopherin  $\alpha\beta$  durch Ran-GTP besser zu verstehen, kartierte ich die entsprechenden Bindungsdomänen. Der N-terminale Bereich von Karyopherin  $\alpha$  erkannte mit einer NLS-ähnlichen Domäne Karyopherin  $\beta$  (Enekel et al., 1996)\*. Diese Karyopherin  $\beta$ -bindende Domäne in Karyopherin  $\alpha$  ist hoch konserviert und für die Funktion von Karyopherin  $\alpha$  nicht nur in Hefe sondern auch in Vertebraten unentbehrlich (Gorlich et al., 1996). HEAT Motife 7-10 von Karyopherin  $\beta$ , die einen Loop von konservierten sauren Aminosäuren beinhalten, vermittelten die Bindung an Karyopherin  $\alpha$  und Ran-GTP (Enekel et al., 1996). Dieses Ergebnis stand im Einklang mit dem Befund, dass Ran-GTP Karyopherin  $\alpha$  von Karyopherin  $\beta$  verdrängen kann (Gorlich et al., 1995b; Moroianu et al., 1996). Durch Überexpression der entsprechenden Bindungsdomänen in Hefe konnten Karyopherin  $\alpha$  und  $\beta$  austitriert werden, was letztendlich zum Zelltod führte (Enekel et al., 1996)\*. Görlich und Mitarbeiter beschrieben hingegen, dass Karyopherin  $\alpha$  und Ran-GTP an zwei unterschiedliche Bereiche von Karyopherin  $\beta$  binden, so dass sie zu dem Schluss kamen, dass es sich bei der Ran-GTP vermittelten Ablösung von Karyopherin  $\alpha$  an Karyopherin  $\beta$  nicht um eine einfache Kompetition handeln dürfte (Kutay et al., 1997). Unsere Studien beruhten auf rekombinant

exprimierten Proteinen, die vom N- bzw. C-terminalen Ende sukzessiv verkürzt wurden, so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass verbleibende Domänen sich falsch falten.

1999 konnte mit der Auflösung der Kristallstruktur von Karyopherin  $\beta$  gebunden an die Interaktionsdomäne von Karyopherin  $\alpha$  gezeigt werden, dass der ausgestreckte Teil der Karyopherin  $\beta$ -bindenden Domäne von Karyopherin  $\alpha$  an die HEAT Motife 7 –11 einschliesslich des sauren Loops von Karyopherin  $\beta$  binden, während der  $\alpha$ -helikal strukturierte Teil der Interaktionsdomäne an HEAT Motife 12-19 bindet (Cingolani et al., 1999). Ran-GTP bindet an Karyopherin  $\beta$  HEAT Motife 1 und 2 sowie 6-8 und den in allen  $\beta$  Karyopherinen konservierten Loop von sauren Aminosäuren (Chook and Blobel, 1999; Vetter et al., 1999). Somit gab es in den Karyopherin  $\beta$  HEAT Motifen 7 und 8, die den konservierten sauren Loop enthalten, überlappende Bindungsstellen für Ran-GTP und Karyopherin  $\alpha$ , wobei weitere Ran-GTP-bindende Bereiche in den N-terminalen HEAT Motifen und Karyopherin  $\alpha$ -bindende Bereiche in den C-terminalen HEAT Motifen liegen. Gerade im mittleren Bereich von Karyopherin  $\beta$  wurde eine hohe konformative Flexibilität und strukturelle Plastizität vermutet. Diese sollten eine Anzahl von Konformationen ermöglichen, die sich aus der Umlagerung der HEAT Motife ergeben. Karyopherin  $\alpha$  besitzt neben der Karyopherin- $\beta$  bindenden Domäne im N-terminalen Bereich eine repetitive Struktur von zehn Armadillo Motifen, in denen die Bindungsstellen für die prototypischen klassischen NLS liegen (Conti et al., 1998; Fontes et al., 2003). Es wird vermutet, dass die HEAT beziehungsweise Armadillo Motife der Karyopherine ein Schaltwerk von Bausätzen darstellen, die letztendlich eine Vielzahl verschiedener Frachtproteine transient binden und durch die Kernpore eskortieren (Chook and Blobel, 2001).

### **3.2 Die subzelluläre Lokalisation des 26S Proteasoms in Hefe**

Bevor wir uns dem Kerntransport des 26S Proteasoms widmen konnten, mussten wir in Erfahrung bringen, wie sich in Hefezellen 26S Proteasomen zwischen Kern und Zytoplasma verteilen. Aufgrund der Zugänglichkeit der Hefe zu genetischen und

molekularbiologischen Methoden bot es sich an, proteasomale Untereinheiten auf chromosomaler Ebene gegen Epitop-markierte Untereinheiten auszutauschen. Homologe Rekombinationstechniken am chromosomalen Locus erlaubten, dass die proteasomale Untereinheit vom endogenen Promoter abgelesen und mit einem C-terminalen Epitop versehen wird, das sich passend zum Leserahmen an die letzte Aminosäure anschliesst. Werden proteasomale Untereinheiten, die von essentiellen Genen kodiert werden, zur Epitopmarkierung ausgewählt, werden nur dann lebensfähige Zellen erhalten, wenn die Fusionsproteine funktionell sind. Sind die Epitop-markierten Untereinheiten vollständig im Komplex eingebaut, können makromolekulare Komplexe wie Proteasomen über eine getaggte Untereinheit lokalisiert werden.

Da die Wahl der Fixierungsbedingungen bei der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie nicht unproblematisch ist, nutzten wir als ergänzende Methode die Markierung mit dem Grünen Fluoreszenzprotein (GFP), um Proteasomen mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Hefezellen zu lokalisieren.

Pre6, die  $\alpha$ 4-Untereinheit des 20S Proteasoms, und Rpt1(Cim5), eine ATPase Untereinheit des regulatorischen 19S Komplexes, liessen sich funktionell mit GFP (27 kDa) und einem Tandem-Hemagglutinin-Epitop (2 kDa) markieren. Die Hefezellen, die markierte Untereinheiten anstatt der endogenen Untereinheiten exprimierten, verhielten sich in ihrem Wachstum wie parentale Wildtypzellen. Biochemische Methoden bestätigten, dass die markierten Untereinheiten vollständig in den 20S bzw. 19S Komplex eingebaut sind.

Im Gegensatz zu GFP-markierten Proteasomen im Säugetiersystem (Reits et al., 1997), verteilten sich GFP-markierte Proteasomen in Hefe nicht gleichmässig über Kern- und Zytoplasma, sondern lokalisierten vornehmlich in der Peripherie des Kerns. Dieses Bild ergab sich auch bei der indirekten Fluoreszenzmikroskopie der Epitop-markierten Proteasomen in Hefe. Besonders auffällig schienen sich die Proteasomen um die Kernhüllendoppelmembran zu drängen. Um die Lokalisation der Proteasomen näher zu charakterisieren, wurden Doppelimmunfluoreszenzen durchgeführt, bei denen Antikörper gegen ein Nukleoporin und gegen Kar2 / Bip verwendet wurden. Kar2 / Bip ist ein Markerprotein des ER Lumens und der äusseren Kernhülle, die das ER

Lumen auf der zytoplasmatischen Seite begrenzt. Konfokale Laserscanning-fluoreszenzmikroskopie liess erkennen, dass Proteasomen mit einem Markerprotein der äusseren Kernmembran / des ER kolokalisieren, obwohl die für das ER typischen Membranausläufer von der äusseren Kernhülle zur Plasmamembran nicht von Proteasomen besetzt waren (Enekel et al., 1998; Enekel et al., 1999)\*. Während wir die mikroskopischen Aufnahmen tätigten, wurde von Wolf und Mitarbeitern im Hefesystem die Funktion der Proteasomen bei der Degradation falsch gefalteter sekretorischer Proteine entschlüsselt. Ein retrograder Transport führte die ER-assoziierten Substrate den zytoplasmatischen Proteasomen zu (Plemper et al., 1997). Da wir in Hefezellen in situ proteasomale Aktivität dort detektierten, wo wir hauptsächlich GFP-markierte Proteasomen vorfanden, nahmen wir an, dass sich proteasomale Proteolyse vorwiegend an der Kernhüllendoppelmembran abspielt. Mit Blick auf die zytoplasmatische Seite der Kernmembran liess eine wachsende Zahl von Veröffentlichungen vermuten, dass in einem schnell proliferierendem Organismus wie Hefe nicht nur eine vermehrte proteasomale Degradation fehlgefalteter sekretorischer Proteine, sondern generell eine Kompetition zwischen der Faltung de novo synthetisierter Proteine und deren proteasomalem Abbau stattfinden könnte (Turner and Varshavsky, 2000). Hinsichtlich des gehäuften Auftretens von Proteasomen an der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran unterstützten unsere Daten McDonalds und Byers Interpretation, dass ein beachtlicher Teil der proteasomalen Substrate aus dem Kern stammen dürfte. McDonald und Byers fanden GFP-markiertes Rpt4 / Pcs1, eine ATPase des Basis-Komplexes, vorrangig im Kern und funktionell mit der Duplikation von Spindelpolkkörperchen assoziiert (McDonald and Byers, 1997).

Punktförmige Anhäufungen von Proteasomen an der Kernmembran waren zu beobachten, die mit Bestandteilen der Kernporen kolokalisierten. Dies wurde zeitgleich von Gordon und Mitarbeitern in Spaltheefe beobachtet (Wilkinson et al., 1998). Als Erklärung für dieses Phänomen wurde erwogen, dass eine im Kerntransport arretierte Population von Proteasomen zu verstärkten Fluoreszenzsignalen führen könnte. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, untersuchten wir die subzelluläre Lokalisation von Proteasomen in Hefemutanten, in denen Kernporen ungleichmässig entlang der Kernmembran verteilt sind (Rout et al., 2000). Eine Kolokalisation von Proteasomen mit Kernporenclustern wurde nicht beobachtet, so dass es

unwahrscheinlich ist, dass Proteasomen an Kernporenstrukturen haften.

Im Laufe der Arbeit hatten wir über verschiedene genetische Techniken ein Dutzend proteasomaler Untereinheiten mit diversen „Tags“ versehen, die identisch lokalisierten. Andere Forschungsgruppen berichteten ähnliche Beobachtungen für Hefeproteasomen, wobei die Kerne gefärbt waren (McDonald and Byers, 1997; Russell et al., 1999). Polyklonale Antikörper, die inzwischen gegen  $\alpha 4$  und Rpt1 zur Verfügung standen, detektierten Proteasomen an der Kernmembran und im Kern.

Lichtmikroskopisch war nicht zu klären, ob Proteasomen bevorzugt an einer der beiden Seiten der Kernhüllendoppelmembran vorkommen. Die äussere und innere Kernmembran sind durch ein ca. 40 nm breites Lumen voneinander getrennt und nur elektronenmikroskopisch getrennt sichtbar. Kooperationspartner wurden gewonnen, um Proteasomen in Bäckerhefe über verschiedene zytologische Methoden mit Goldpartikeln zu markieren. Wir konnten jedoch weder eine Anhäufung von Proteasomen an der zyto- noch an der nukleoplasmatischen Seite der Kernhüllendoppelmembran feststellen.

Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen von MacIntosh, die in Zusammenarbeit mit Gordon und Mitarbeitern in Hefe *Saccharomyces pombe* entstanden, zeigten hingegen gold-markierte Proteasomen in einer gleichmässigen Besetzung entlang der nukleoplasmatischen Seite der inneren Kernhülle. Die äussere Kernhülle, das ER, wurde nicht mit Proteasomen dekoriert vorgefunden (Wilkinson et al., 1998).

Globale Lokalisationsstudien mittels GFP-Markierung berichten, dass nicht nur proteasomale Komponenten sondern auch Proteine, die in der Hierarchie des UPS dem Proteasom übergeordnet sind, vorwiegend im Kern vorkommen (Huh et al., 2003). Den Daten zufolge scheint GFP-markiertes Uba1 hauptsächlich nukleär zu sein. Uba1 ist das einzige in Hefe vorkommende ubiquitin-aktivierende Protein und für den ubiquitin-abhängigen Proteinabbau unentbehrlich (<http://www.yeastgenome.org>).

Alle Gruppen, die sich mit der subzellulären Verteilung des Proteasoms in Hefe beschäftigten, versuchten eine Antwort auf die Frage zu finden, warum das UPS in Hefe hauptsächlich im Kern, elektronenmikroskopischen Studien zufolge sogar bevorzugt an der inneren Kernmembran benötigt werde. Gordon und MacIntosh

vermuteten, dass proteasomale Degradation hauptsächlich in der Kernperipherie stattfindet, um die Güte von Frachtproteinen, die minütlich in großer Menge durch die Kernpore transportiert werden, kontrollieren zu können (Wilkinson et al., 1998). Johnston und Mitarbeiter stellten zur Diskussion, dass sich das Proteasom in Hefe doch offensichtlich anders als das Proteasom im Säugetiersystem verhält. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Systemen zu verstehen sei wichtig, um die Lehrstücke aus Hefe auf das komplexere proteasomale Systems in Säugetierzellen angemessen anwenden zu können (Russell et al., 1999).

### 3.3 Der nukleäre Import des 20S Proteasoms in Vorläuferkomplexen

Basierend auf der Beobachtung, dass ein Grossteil der Proteasomen im Kern der Hefezellen vorkommt, stellte sich die Frage, auf welchem Weg sie in den Kern gelangen. Die Dimensionen der Kernporenkanäle würden ausreichen, um ein 20S Proteasom als assembliertes Partikel zu transportieren. Aufgrund der geschlossenen Mitose in Hefe muss der Kernimport von Makromolekülen durch Kernporen einem Mechanismus folgen, der in der Regel Signal- und Rezeptor-vermittelt abläuft. Konservierte klassische NLS sind in  $\alpha$  Untereinheiten des 20S Proteasoms vorhanden (Tanaka et al., 1990). Ob sie in vivo von dem entsprechenden NLS Rezeptor Kayopherin  $\alpha\beta$  erkannt werden, war umstritten.

Bereits bei den Lokalisationsstudien begleitenden biochemischen Fraktionierungsexperimenten fiel uns auf, dass sich die Vorläuferproteine der  $\beta 5$  (Pre2) Untereinheit nicht in der löslichen, sondern in der ER / Kern Fraktion befinden. Da Vorläuferkomplexe in Wildtypzellen nicht stabil sind, setzten wir einen Aldehydinhibitor ein, um die Prozessierung zu verlangsamen. Durch Affinitätsmarkierung der  $\alpha 4$  (Pre6) Untereinheit mit IgG-bindenden Domänen von ProteinA aus *Staphylococcus aureus*, einer Methode, die inzwischen als Tandemaffinitätsapurifizierung (TAP) zur Identifizierung von Proteinkomplexen in der Proteomik global angewendet wird (Gavin et al., 2002), konnten die proteasomalen Komplexe in einem Schritt über IgG Sepharose isoliert und analysiert werden. Der ER / Kernextrakt enthielt proteasomale Komplexe mit reifem und unreifem  $\beta 5$  sowie

Ump1, die lösliche Fraktion lediglich gereifte 20S Proteasomen. In Übereinstimmung mit diesem Befund lokalisierten wir mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie GFP-markiertes Ump1, das offensichtlich vollständig in Vorläuferkomplexe eingebaut wurde, vorwiegend im Kern der Hefezellen.

Mindestens 12 der 14 proteasomalen Untereinheiten konnten mit GFP- oder ProteinA-markiertem Ump1 assoziiert identifiziert werden. Die Ump1-assoziierten Prekursorkomplexe enthielten alle  $\alpha$  Untereinheiten,  $\beta$ 3 und  $\beta$ 4 sowie  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 als Vorläuferproteine (Lehmann et al., 2002)\*. Die Assoziation von pro- $\beta$ 6 und pro- $\beta$ 7 Untereinheiten mit Ump1 konnte nur immunologisch nachgewiesen werden. Sie werden offensichtlich als letzte in den Prekursorkomplex eingebaut, worauf spontan die Dimerisierung zweier Prekursorkomplexe erfolgen und die Propeptidprozessierung eröffnet werden dürften (Ulf Düring, Diplomarbeit).

Als Antwort auf die Frage, wie 20S Proteasomen in den Kern gelangen, lag nahe, dass 20S Proteasomen nicht als aktive Partikel, sondern als inaktive Vorläuferkomplexe importiert werden. Aufgrund der Präsenz von potentiellen klassischen NLS in  $\alpha$  Untereinheiten wurde die Lokalisation der Vorläuferkomplexe in Hefemutanten untersucht, in denen der NLS-abhängige Importweg gestört ist. Unser besonderes Interesse galt den *srp1* Mutanten, die Karyopherin  $\alpha$  betreffen und einen Phänotyp erzeugen, der auch für proteasomale Mutanten beobachtet wird. Hierzu gehört ein Arrest in der Mitose, verbunden mit der Akkumulation von proteasomalen Substraten wie z.B. Cyclinen (Loeb et al., 1995; Tabb et al., 2000). Verglichen mit Wildtypzellen wurde eine drastische Mislokalisierung proteasomaler Komponenten ins Zytoplasma von *srp1-49* Zellen beobachtet, die mit einem Arrest in der Mitose einherging. Ump1-assoziierte Vorläuferkomplexe wurden ebenso vermehrt im Zytoplasma vorgefunden und konnten mit defektem Karyopherin  $\alpha\beta$  ko-präzipitiert werden, während keine Interaktion von Karyopherin  $\alpha\beta$  mit reifem 20S Proteasom gefunden wurde (Lehmann et al., 2002)\*.

Unter den üblichen Frachtsubstraten für Karyopherin  $\alpha$  befanden sich bislang monomere Proteine mit klassischem NLS. Komplexere Proteine dürften über diverse Signalsequenzen von mehreren Karyopherin  $\alpha$  Rezeptoren erkannt werden (Ribbeck and Gorlich, 2001). Unsere Analyse der NLS Motife zweier proteasomaler  $\alpha$

Untereinheiten bestätigte, dass proteasomale NLS-Motife nicht-nukleäre Proteine in den Kern leiten. Die N-terminalen Bereiche der  $\alpha$ -Untereinheiten, in denen die NLS mutiert oder deletiert wurden, waren für den Einbau der entsprechenden Untereinheit ins Proteasom entbehrlich. Bei chromosomaler Expression waren NLS-mutierte  $\alpha$ -Untereinheiten Bestandteil des 20S Proteasoms, bei Überexpression in „Inclusion bodies“ im Zytosol vorzufinden. Die Deletion einer einzelnen NLS in einer  $\alpha$ -Untereinheit hatte weder einen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation noch auf den Reifungsprozess des 20S Proteasoms. Dies bedeutet, dass die NLS der  $\alpha$ -Untereinheiten in den Vorläuferkomplexen funktionell redundant sein dürften (Lehmann et al., 2002)\*. Möglicherweise könnte die Importrate durch das Vorhandensein mehrerer NLS gefördert werden.

Mit Hilfe etablierter Kernimportassays, in denen digitonin-permeabilisierte Säugetierzellen verwendet werden, versuchte ich, den Import von GFP-markierten proteasomalen Komplexen aus Hefe durch Zugabe von rekombinantem Karyopherin  $\alpha\beta$  zu rekonstruieren. Hierzu wurden Ump1-assoziierte Vorläuferkomplexe und reife 20S Proteasomen als GFP-markierte Komplexe unter nativen Bedingungen aus Hefe affinitätsgereinigt und als Importsubstrate angeboten. Vorläuferkomplexe nicht jedoch reife 20S Proteasomen wurden, durch Karyopherin  $\alpha\beta$  vermittelt, an die Kernmembran angedockt. Die GFP-markierten Vorläuferkomplexe umsäumten den Kern, waren jedoch nicht an der Kernmembran begrenzt vorzufinden (Lehmann et al., 2002)\*. Möglicherweise gibt es in Säugetierzellen Strukturen in der Kernperipherie, die Vorläuferkomplexe binden und deren Import in den Kern erschweren. Prinzipiell lässt sich mit diesem Ansatz im Säugetiersystem nur der Adressierungsschritt an den Kern, nicht jedoch der Translokationsschritt eines Frachtproteins durch die Kernpore mit Hilfe der Karyopherine aus Hefe bewerkstelligen (Enekel et al., 1995)\*.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Ump1-assoziierte Vorläuferkomplexe Strukturen besitzen, die von Karyopherin  $\alpha\beta$  spezifisch erkannt werden. Da  $\beta$ -Untereinheiten über kein NLS verfügen, ist es plausibel, dass sie im Vorläuferkomplex gebunden transportiert werden. Die NLS der  $\alpha$ -Untereinheiten liegen im N-terminalen Bereich. In einem prokaryontischen Modellsystem (*A. fulgidus*) konnte ein  $\alpha_7$ -Ringvorläufer kristallisiert und dessen Struktur analysiert werden. Im Vergleich zu



einem im reifen 20S Proteasom eingebetteten  $\alpha$ -Ring zeigt der  $\alpha$ -Ringvorläufer eine identische Konformation mit Ausnahme des N-terminalen Bereichs (Groll et al., 2003). Besonders in den N-terminalen Bereichen, in denen sich NLS befinden, könnten Konformationsänderungen während der Reifung des 20S Proteasoms stattfinden, die aus einer für Karyopherin  $\alpha\beta$  zugänglichen Konformation im Vorläuferkomplex eine für Karyopherin  $\alpha\beta$  unzugängliche Konformation im reifen 20S Proteasom hervorbringen (Lehmann et al., 2002)\*.

Ein Punkt, der bei diesen Studien kritisch zu betrachten war, beinhaltet die Verwendung von GFP (27 kDa), um Ump1, ein kurzlebige Protein von 17 kDa, und dessen in Vorläuferkomplexen assoziierten Proteine zu lokalisieren. Obwohl bei der Degradation von GFP-markiertem Ump1 kein GFP als unverdaulicher Rest hervorging, überprüften wir, ob die GFP Markierung Ump1-assoziierte Vorläuferkomplexe stabilisiert. Es wäre denkbar gewesen, dass die GFP Markierung die Verweilzeit Ump1-assoziiierter Vorläuferkomplexe im Kern verlängert. Vorläuferkomplexe könnten direkt an der Kernpore assemblieren und als reife 20S Proteasomen ins Nukleoplasma einströmen. Im Vergleich zum parentalen Wildtyp zeigten jedoch Zellen, die GFP-markiertes Ump1 anstatt endogenem Ump1 exprimieren, keine Stabilisierung von Vorläuferkomplexen, so dass die GFP Markierung von Ump1 nicht drastisch in die Zellphysiologie eingreifen kann. Ump1-GFP exprimierende Zellen sind weder temperatur-sensitiv, noch zeigen sie einen für proteasomale Mutanten typischen Phänotyp.

Um unser Modell der nukleären 20S Proteasomenbiogenese zu erhärten, untersuchten wir die Verteilung von Vorläuferkomplexen in *ump1 $\Delta$*  Zellen. In *ump1 $\Delta$*  Zellen liegen ca. 50% der 20S Proteasomen als reife Partikel und ca. 50% als Vorläuferkomplexe vor (Ramos et al., 1998). Die Einbuße an proteolytisch aktiven Proteasomen wird kompensiert durch eine Hochregulation der proteasomalen Genexpression (Ju et al., 2004; London et al., 2004), so dass sich *ump1 $\Delta$*  Zellen in ihrem Wachstum bei permissiven Bedingungen nicht von Wildtypzellen unterscheiden. Während GFP-markierte  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S Proteasoms bei Deletion von Ump1 nicht funktionell exprimiert werden, konnten  $\beta$ 5,  $\beta$ 6 und  $\beta$ 7 als GFP-markierte Untereinheiten in *ump1 $\Delta$*  Zellen exprimiert werden. Es wurde eine Anreicherung von

Vorläuferkomplexen in *ump1Δ* Zellen bestätigt, die wiederum vorrangig im Kern lokalisierten. Würde sich ein beachtlicher Teil der 20S Proteasomenmaturierung im Zytoplasma ereignen, so hätten wir in *ump1Δ* Zellen eine Akkumulation von Vorläuferkomplexen im Zytoplasma erwartet.

Als grundsätzliches Problem bei allen Lokalisationsexperimenten ist zu bedenken, dass struktur-gebundene Proteine intensiver fluoreszieren als frei diffundierende Proteine, da erstere sich über längere Zeit an einem Ort aufhalten. Fraktionierungsexperimente unterstützten jedoch eindeutig die Interpretation unserer Lokalisationsstudien. Bei Deletion von *Ump1* verbleiben Vorläuferkomplexe hauptsächlich in der Kern / ER Fraktion (in Zusammenarbeit mit Ulf Düring, Diplomarbeit).

### 3.4 Der Kernimport von Subkomplexen des regulatorischen 19S Komplexes

Nachdem der Kernimport des 20S Proteasoms entschlüsselt war, widmeten wir uns dem Import der Komponenten des regulatorischen 19S Komplexes (Wendler et al., 2004)\*. Um deren Kernimport in vivo zu verfolgen, wurden *Rpn1*, eine nicht-ATPase Untereinheit des Basis-Komplexes, und *Rpn11*, eine Untereinheit des Deckel-Komplexes, chromosomal durch Fusionproteine mit GFP, CFP und ProteinA ausgetauscht. Die Fusionsproteine wurden vollständig in ihre Subkomplexe eingebaut und erlaubten, die mit ihnen interagierenden Untereinheiten des Basis- bzw. Deckel-Komplexes in einem Schritt über Affinitätsträger zu reinigen. Als CFP-markierte Proteine lokalisierten sie vorwiegend an den Kernmembranen. Die Kollokalisationsstudien von CFP-markierten Proteasomen und GFP-markierten Markerproteinen der Kernpore und des ER ergaben eine Übereinstimmung mit unseren früheren Ergebnissen.

Um die Stöchiometrie der proteasomalen Komponenten im Kern zu gewährleisten, erschien es plausibel, dass sie über Karyopherin  $\alpha\beta$  in den Kern importiert werden. Deckel- und Basis-Komponenten wurden in der *spr1-49* Mutante ins Zytoplasma delokalisiert vorgefunden. Eine Quantifizierung ergab eine Verdopplung der Signalintensität im Zytoplasma in der *spr1-49* Mutante im Vergleich zum Wildtyp. In der *spr1-49* Mutante wurden dissoziierte Basis- und Deckel-Komplexe beobachtet,

während sie im Wildtyp als 19S Komplex assoziiert vorlagen. Um zu überprüfen, ob Deckel- und Basis-Komplexe von Karyopherin  $\alpha\beta$  erkannt werden, wurden ihre Untereinheiten nach potentiellen NLS untersucht. Im Basis-Komplex wurden wir fündig im N-terminalen Bereich von Rpt2 und im C-terminalen Bereich von Rpn2. Über Lokalisations- und Bindungsstudien konnten wir zeigen, dass die hier befindlichen zweiteiligen NLS funktionell sind. Die Deletion der NLS von Rpn2 und Rpt2 erzeugte lebensfähige Mutanten, genannt *rpn2 $\Delta$ NLS* und *rpt2 $\Delta$ NLS*. Die um die NLS verkürzten Untereinheiten waren vollständig im Basis-Komplex eingebaut und zeigten eine korrekte Lokalisation im Kern, so dass sich beide NLS funktionell ergänzen dürften. Bindungsstudien mit gereinigten Basis-Komplexen aus Wildtyp- und Mutantenzellen bestätigten eine spezifische Erkennung von Rpn2 und Rpt2 durch Karyopherin  $\alpha$ .

Die gleichzeitige Deletion der NLS von Rpt2 und Rpn2 war lethal. Die Mutante *rpn2 $\Delta$ NLS* zeigte im Gegensatz zu *rpt2 $\Delta$ NLS* eine Hypersensitivität gegenüber Stress. In dieser Mutante war die Aktivität der 26S Proteasomen um ca. 50% erniedrigt, was auf einen Kernimport-defekten Basis-Komplex zurückzuführen war. Denn die Aktivität des 20S Proteasoms war nicht beeinträchtigt. Während der *rpn2 $\Delta$ NLS* Mutanten Basis-Komplex bei permissiven Bedingungen im Kern lokalisierte, konnte der Mutanten Basis-Komplex bei restriktiven Bedingungen nicht effizient in den Kern transportiert werden und akkumulierte im Zytoplasma, was letztendlich zum Zelltod führte. Da das NLS von Rpn2 für den Kernimport des Basis-Komplexes nur unter Stressbedingungen essentiell ist, gehen wir von Konformationsänderungen aus, die das in Rpt2 noch vorhandene NLS für Karyopherin  $\alpha$  unzugänglich machen. Zudem beobachteten wir, dass der Mutanten Basis-Komplex unter Stressbedingungen teilweise in „Inclusion Bodies“ im Zytosol anfiel, was auf Faltungs- und Assemblierungsdefekte hindeutete.

Unsere Lokalisationsstudien von proteasomalen Komplexen in einem Set verschiedener Kerntransportmutanten legten nahe, dass der Kernimport der proteasomalen Subkomplexe hauptsächlich durch Karyopherin  $\alpha\beta$  erfolgt. Es leuchtete ein, dass Vorläuferkomplexe und regulatorische Subkomplexe des 26S Proteasoms über einen gemeinsamen Rezeptor importiert werden, um in entsprechender

Stöchiometrie zur Assemblierung im Kern vorzuliegen. Eine Ursache für den pleiotropen Phänotyp der *srp1-49* Mutante (Yano et al., 1994) könnte deshalb auf der gestörten 26S Proteasomenbiogenese beruhen. Ein weiterer wichtiger Faktor im UPS, dessen Kernimport in der *srp1-49* Mutante betroffen sein dürfte, ist der proteasomale Transkriptionsfaktor Rpn4, der sog. PACE Elemente in den Promotorbereichen proteasomaler Gene bindet, um deren Expression abzustimmen (Mannhaupt et al., 1999). Die zytoplasmatische Akkumulation proteasomaler Komponenten in der *srp1-49* Mutante kann jedoch nicht allein auf eine gesteigerte Proteasomenproduktion zurückgeführt werden. Denn neu gebildete proteasomale Komplexe sollten nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Kern akkumulieren, falls ihr Import in den Kern unabhängig von Karyopherin  $\alpha\beta$  stattfinden würde.

Unsere Methoden konnten keine Interaktionen von Untereinheiten des Deckel-Komplexes mit Karyopherin  $\alpha$  aufweisen (Wendler et al., 2004)\*, so dass unsere Daten die von Nomura und Mitarbeitern erhaltenen Ergebnisse einer Yeast-Two-Hybrid Analyse unterstützten (Tabb et al., 2000). Trotzdem scheint der Deckel-Komplex über Karyopherin  $\alpha\beta$  in den Kern importiert zu werden. Studien in Sprosshefe könnten hierfür eine Erklärung liefern. Ein nicht proteasomales Protein, genannt Sts1 / Cut8, wurde gefunden, dessen Funktion für die Kernlokalisierung des Deckel-Komplexes essentiell ist (Tatebe et al., 2001). Basierend auf Yeast-Two-Hybrid Daten bindet Sts1 / Cut8 an Rpn11 und Karyopherin  $\alpha$  (Tabb et al., 2000). Eine Interpretationsmöglichkeit dieser Daten wäre, dass Sts1 / Cut8 zum Deckel-Komplex hinzugezogen wird, um ihm ein klassisches NLS zu verleihen.

Chang und Mitarbeiter fanden ein weiteres Protein, genannt Yin6, das am Kernimport von Deckel-Komplexen beteiligt sein könnte. Die Deletion von Yin6 bewirkte die Delokalisierung von Deckel-Komplexen ins Zytoplasma, die mit einer Inaktivierung von 26S Proteasomen korrelierte. Da Yin6 ein zweiteiliges NLS enthält, könnte auch Yin6 Deckel-Komponenten in den Kern begleiten (Yen et al., 2003b). In vivo Lokalisationsstudien mit Mutanten zeigten zudem, dass die Adressierung von Deckel-Komplexen in den Kern unabhängig von der Präsenz intakter Basis-Komplexe ist. Die Integration der Deckel-Komplexe ins 26S Proteasom erforderte jedoch funktionelle Basis-Komplexe an der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran, wo in

Sprosshefen die Mehrheit der 26S Proteasomen zu finden ist (Yen et al., 2003a).

### **3.5 Blm3 ist an einem späten Schritt der nukleären 20S Proteasomenmaturierung beteiligt**

Auf der Suche nach weiteren Komponenten, die die 20S Proteasomenmaturierung beeinflussen könnten, stiessen wir auf Blm3, ein Protein mit einer molekularen Masse von 240 kDa, das mit Ump1-assoziierten Vorläuferkomplexen gereinigt und wie alle proteasomalen Komponenten überwiegend im Kern lokalisiert wurde. Es besitzt eine potentielle klassische zweiteilige Kernlokalisationssequenz im N-terminalen Bereich (Fehlker et al., 2003)\*. Wie Ump1 ist Blm3 nicht essentiell, so dass wir Deletionsmutanten herstellen konnten, in denen die Auswirkungen des Fehlens dieser bei der Maturierung beteiligten Proteine untersucht werden konnten. Im Vergleich zu Wildtypstämmen ist die Prozessierung von  $\beta 5$  Vorläuferproteinen zu reifem  $\beta 5$  in *ump1 $\Delta$*  Stämmen verlangsamt (Ramos et al., 1998). In *blm3 $\Delta$*  Stämmen läuft sie mit erhöhter Rate ab. Die Degradation von Ump1 ist in *blm3 $\Delta$*  beschleunigt, so dass wir annehmen, dass Blm3 die 20S Proteasomenreifung verzögert. Blm3 scheint jedoch kein Antagonist zu Ump1 zu sein, denn eine *blm3 $\Delta$  ump1 $\Delta$*  Doppelmutante zeigte den Phänotyp der *ump1 $\Delta$*  Mutante, der sich in der Stabilisierung von Vorläuferkomplexen manifestiert. Affinitätsreinigungen unter nativen Bedingungen erlaubten Ump1-assoziierte Vorläuferkomplexe aus Hefe zu isolieren und mittels Nativgelelektrophorese zu separieren. Dank GFP-Markierungen konnten über Phosphorfluorimaging diverse Populationen von Vorläuferkomplexen entdeckt werden, wie sie schon früher in der Arbeitsgruppe von Kloetzel im Säugetiersystem beobachtet wurden (Frentzel et al., 1994). Eine eindeutige Zuordnung der Vorläuferkomplexe in Hefe konnten wir im Vergleich zu Vorläuferkomplexen höherer Eukaryonten nicht treffen, weil sie in verschiedenen Organismen in unterschiedlicher Weise mit weiteren Proteinen wie Chaperonen assoziiert zu sein scheinen, die möglicherweise ihr biochemisches Verhalten verändern (Schmidtke et al., 1997). Um die Vorläuferkomplexe der Hefe zu charakterisieren, untersuchten wir die Zusammensetzung ihrer Untereinheiten besonders mit Blick auf die  $\beta 5$  Untereinheit, da sie das entscheidende Merkmal ist, um die 20S Proteasomenreifung zu verfolgen.

Spätere Untersuchungen an  $\beta 7$  erhärteten unsere mit  $\beta 5$  erhaltenen Befunde.

Eine breite Fraktion enthielt unreife Vorläuferproteine, die frühen Assemblierungsintermediaten zugeordnet wurden, welche den erstmals von Chen und Hochstrasser formulierten Halbproteasomen (h-CP) entsprechen könnten (Chen and Hochstrasser, 1996). Die wesentlich kleineren Fraktionen, die sich wie 20S Proteasomen verhielten, beinhalteten Vorläuferproteine und reife Untereinheiten, so dass wir diese Fraktionen späten Assemblierungsintermediaten oder naszierenden 20S Proteasomen (n-CP) zuordneten. In Lichtstreuexperimenten und Kristallstrukturanalysen zeigte ein in der Maturierung arretiertes spätes Assemblierungsintermediat, das in einem prokaryontischen System gewonnen wurde, eine nur unwesentlich verlängerte Molekülform im Vergleich zum reifen Partikel, so dass es berechtigt ist, dieses späte Assemblierungsintermediat einem nahezu abgeschlossenen Reifungszustand des 20S Proteasoms gleichzusetzen (Groll et al., 2003). Blm3 wurde nur in Assoziation mit späten Assemblierungsintermediaten gefunden. Vorläuferkomplexe verblieben im Kern auch in Abwesenheit von Blm3, so dass Blm3 nicht für die Lokalisation von Vorläuferkomplexen oder deren Stabilisierung im Kern verantwortlich sein kann. Deshalb nehmen wir an, dass Blm3 erst in einem späten Schritt der Proteasomenassemblierung hinzukommt und wie ein Checkpoint fungiert, um die Aktivierung nukleärer Proteasomen zu verzögern, die auf eine spezifische Proteasomenpopulation beschränkt sein könnte.

Unter Stressbedingungen könnte diese Funktion von Blm3 im Zusammenhang mit proteasomaler Proteolyse bei DNA Reparaturmechanismen benötigt werden, da Blm3 ursprünglich von Moore und Mitarbeitern als ein Protein identifiziert wurde, das Zellen vor DNA Schäden schützt (Febres et al., 2001). Zu Blm3 homologe Proteine existieren im Tier- und Pflanzenreich (Yeastgenome Database). PA200 (Proteasomaler Aktivator, 200 kDa) ist mit nur 17% Identität vermutlich das humane Homologe zu Blm3. Rechsteiner und Mitarbeiter konnten zeigen, dass PA200 nukleär ist und die Hydrolyse chromogener Peptidsubstrate durch das 20S Proteasom stimuliert, während die Degradation proteasomaler Proteinsubstrate durch PA200 nicht aktiviert wurde. Nach Einwirkung ionisierender Strahlung auf HeLa Zellen bildete PA200 diskrete intranukleäre Ansammlungen, wie sie für zahlreiche an der DNA Reparatur beteiligte

Proteine beschrieben wurden (Ustrell et al., 2002). Wenn auch die Proteomik in Hefetliche Hinweise für eine Beteiligung von Blm3 bei DNA Reparaturmechanismen liefert (Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002), konnten Testsysteme, die die Integrität von DNA Reparaturmechanismen überprüfen, und Silencing Assays Blm3 keine Funktion in diesem Zusammenhang zuweisen (M. Fehlker und H.M. Leddy, unpubliziert). Der ursprünglich als Bleomycin-sensitiv beschriebene Phänotyp der *blm3Δ* Deletionsmutante wurde nicht bestätigt (Aouida et al., 2004). Hingegen reagierten proteasomale *rpt* Mutanten auf Radiomimetika wie von Johnston und Mitarbeitern beschrieben, die eine Beteiligung regulatorischer 19S Komplexe beim „Nucleotide Excision Repair“ beobachteten (Lommel et al., 2002). Allerdings sei beim „Nucleotide Excision Repair“ keine enzymatische Aktivität des 20S Proteasoms erforderlich (Gillette et al., 2001). In unseren Testreihen zeigten jedoch *pre1-1pre2-2* Mutanten, in denen die chymotryptische Aktivität des 20S Proteasoms unterdrückt ist (Heinemeyer et al., 1993), eine Hypersensitivität gegen DNA zerstörende Agenzien. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit unterschiedlichen Screens, die Ump1 und das Proteasom mit DNA Reparaturmechanismen in Verbindung brachten (Jelinsky et al., 2000; Podlaska et al., 2003). Generell dürfte das UPS bei DNA Reparaturwegen mitwirken, da hierbei beteiligte Proteine durch proteasomale Proteolyse inaktiviert werden (Ulrich, 2002). Einige Beobachtungen lassen sich jedoch nur durch eine antagonistische Beziehung zwischen DNA Reparatur und UPS verstehen (Ortolan et al., 2004). Diesen Berichten zufolge könnte DNA Schädigung eine Ablösung regulatorischer 19S Komplexe von 20S Komplexen fordern, weshalb Rechsteiner und Mitarbeiter das zu Blm3 homologe PA200 als einen alternativen Regulator zum 19S Komplex beschrieben, der die proteasomale Proteolyse bei DNA Schädigung antagonisieren könnte (Ustrell et al., 2002).

In Hefe konnten wir inzwischen zeigen, dass Blm3 auch mit reifen 20S Proteasomen assoziiert ist. Vorläufige Cycloheximid-Chase Experimente zeigen keine Kurzlebigkeit von Blm3, so dass es unwahrscheinlich ist, dass Blm3 wie Ump1 zur Vervollständigung der Maturierung verdaut wird. Ein Überschuss an Blm3 wirkte auf die 20S Proteasomenaktivität inhibierend in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Überexpression von Blm3 zum Zelltod führt (Fehlker et al., 2003)\*.

Jüngst wurde gezeigt, dass Blm3 alternativ zum regulatorischen 19S Komplex das 20S Proteasom besetzen kann (Schmidt et al., 2005). Diese Daten stützen unsere Aussage, dass die Funktion von Blm3 nicht auf die Regulation eines späten Schrittes in der Koordination der 20S Proteasomenreifung beschränkt ist (Fehlker et al., 2003)\*. 20S Proteasomen gebunden an PA200 bzw. Blm3 werden derzeit über Einzelmolekül-Kryoelektronenmikroskopie untersucht. PA200 scheint die Pore im  $\alpha$  Ring des 20S Proteasoms zu öffnen. Es wird diskutiert, dass PA200 den Eintritt von Substraten oder die Freisetzung von Degradationsprodukten erleichtert (Ortega et al., 2005).

### 3.6 Die Funktion von Blm3 und Ecm29 bei der proteasomalen Proteolyse

Zur Zeit widmen wir uns der Frage, wie die Assemblierung des 26S Proteasoms aus 20S Kernkomplexen und regulatorischen 19S Komplexen reguliert ist (Enekel, 2003)\*. Die Dissoziation von 26S Proteasomen sowie deren Down-Regulation steht in Korrelation mit der Überlebensfähigkeit von Hefezellen in der stationären Phase, die der G<sub>0</sub> Phase in Säugetierzellen entsprechen dürfte (Bajorek et al., 2003).

Wir untersuchen eine mögliche Funktion von Blm3 und Ecm29 bei der Assemblierung und Aktivierung von 26S Proteasomen. Beide Proteine haben eine hohe molekulare Masse von über 200 kDa, lokalisieren wie Proteasomen vorwiegend im Kern (Huh et al., 2003) und scheinen Strukturhomologe in Tier- und Pflanzenwelt zu haben (Gorbea et al., 2004; Ustrell et al., 2002). Blm3 und Ecm29 werden der Proteinfamilie der „HEAT-Repeat like Proteins“ zugezählt, zu denen auch die Karyopherine gehören (Kajava et al., 2004). Die Deletion von Blm3 bzw. Ecm29 ist nicht lethal. Während der logarithmischen Wachstumsphase verbleiben proteasomale Komplexe im Kern, wenn Blm3 und Ecm29 deletiert sind, so dass Blm3 und Ecm29 unter diesen Bedingungen nicht zum Kerntransport proteasomaler Subkomplexe beitragen. In der Promoterregion von *ECM29* befindet sich das für proteasomale Gene typische PACE Element zur Bindung des proteasomalen Transkriptionsfaktors Rpn4 (Mannhaupt et al., 1999). Bei Blm3 befindet sich ein PACE Element innerhalb des offenen Leserahmens (Jelinsky et al., 2000; Robben et al., 2002). In *ump1Δ* Zellen, in denen der negative Rückkopplungsmechanismus durch Rpn4 gestört ist, scheint Blm3 verstärkt exprimiert zu werden, so dass auch die Expression von *BLM3* durch Rpn4 reguliert sein könnte.



Vorläufige Ergebnisse deuten an, dass Blm3 nicht nur mit reifen 20S Proteasomen sondern auch mit 26S Proteasomen assoziiert ist, deren Zusammensetzung in Bezug auf Blm3 und regulatorische Komponenten zu charakterisieren ist. Ecm29 ist hingegen mit regulatorischen 19S Komplexen assoziiert (Petra Wendler, Doktorarbeit). Laut Finley und Mitarbeitern soll Ecm29 das 20S Proteasom mit regulatorischen 19S Komplexen verbinden (Leggett et al., 2002). Unsere Ergebnisse widersprechen jedoch deren Daten, da in *ecm29Δ* Zellen vorrangig 26S Proteasomen vorliegen und unter bestimmten Bedingungen kein freies 20S Proteasom zu finden ist, so dass Ecm29 eher der Assemblierung von 26S Proteasomen entgegenwirken dürfte. Unsere laufenden Experimente beinhalten die Charakterisierung der Blm3- und Ecm29-assoziierten proteasomalen Komplexe. Die Auswirkungen der Deletion von Blm3 und Ecm29 auf die Bildung von 26S Proteasomen und auf die proteasomale Proteolyse werden untersucht. Die Phänotypen der Deletionsstämme sollen Einblick in die physiologische Funktion dieser Proteine geben.

### 3.7 Übergreifende Diskussion und Ausblick

Mit Blick auf proteasomale Funktionen an der inneren Kernmembran in Hefe (Enekel et al., 1998)\* gibt es eine wachsende Zahl von Publikationen, die eine von Johnston und Mitarbeitern verteidigte Hypothese erhärten. Diese Hypothese besagt, dass Proteasomen oder deren Komponenten bei der Transkriptionsaktivierung involviert seien, beruhend auf der Beobachtung, dass Proteasomen direkt bei der Aktivierung Galaktose-regulierter Gene mitwirken (Gonzalez et al., 2002). Interessanterweise wurde in einer Genom-umfassenden Lokalisation der Kerntransportmaschinerie eine Verknüpfung des transkriptionellen Zustandes mit der Organisation der Gene im Kern gefunden, was im Grunde schon 1985 von Blobel in seiner „gene-gating“ Hypothese angedacht worden war (Blobel, 1985). Es wurde beobachtet, dass reprimierte *GAL* Gene durch Galaktose-Induktion aktiviert und aus ihrer intranukleären Position zur Kernpore bzw. inneren Kernmembran rekrutiert werden, um vermutlich den Schritt der Prozessierung ihrer Vorläufer RNA und den Export der reifen RNA ins Zytoplasma zu erleichtern. Generell wurde eine Assoziation von transkriptions-aktiven Genen mit der Kernpore gefunden (Casolari et al., 2004). Da die Aktivator-domänen vieler

Transkriptionsfaktoren mit Signalen überlappen, die deren proteasomale Degradation auslösen, wurde angenommen, dass die proteasomale Degradation der Aktivator-domänen ein zwingender Schritt im Mechanismus der Transkriptionsaktivierung sein könnte (Lipford and Deshaies, 2003; Muratani and Tansey, 2003). Dies ist aus heutiger Sicht meine Erklärung dafür, dass das UPS in Hefe besonders an der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran benötigt wird.

Unsere Studien erlaubten ein Modell für den nukleären Import und die Biogenese von Proteasomen in Hefe zu formulieren (Abb. 1). Demnach werden 20S Proteasomen über Vorläuferkomplexe in Abhängigkeit von Karyopherin  $\alpha\beta$  in den Kern importiert, wo letztendlich die Maturierung nukleärer 20S Proteasomen ablaufen dürfte (Lehmann et al., 2002).<sup>\*</sup> Karyopherin  $\alpha\beta$  importiert nicht nur die Vorläuferkomplexe des 20S Proteasoms, sondern ist auch für den Kernimport der Subkomplexe des regulatorischen 19S Komplexes verantwortlich (Wendler et al., 2004)<sup>\*</sup>. Alle unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass 26S Proteasomen im Kern in einem kooperativen Prozess aus ihren Subkomplexen assembliert werden. Daten aus Sprosshefen zufolge dürfte dieser Prozess nahe den Kernporen stattfinden (Yen et al., 2003a). Karyopherin  $\alpha\beta$  wird nicht nur für den Import proteasomaler Komponenten und sondern auch für den Import von Transkriptionsfaktoren verwendet, wie z. B. Rpn4, welches die Expression von ca. 350 Genen einschließlich der proteasomalen Gene reguliert (Jelinsky et al., 2000). Die Zusammenführung dieser in einem funktionellen Verbund wirkenden Proteine, hauptsächlich durch ein und denselben Importrezeptor, der zudem essentiell ist, dürfte die Homöostase zwischen proteasomaler Proteolyse und der durch Rpn4 regulierten Genexpression gewährleisten.

Ein Vorteil der Kompartimentierung der 26S Proteasomenassemblierung in den Kern wäre darin zu sehen, dass die Biogenese dieser makromolekularen Maschine auf die Anforderungen des nukleären UPS direkt vor Ort abgestimmt werden könnte. Ich möchte keineswegs behaupten, dass alle Proteasomen zur Reifung den Kern durchlaufen, obwohl wir aus der Literatur von komplexen Biogenesewege makromolekularer Maschinen erfahren, deren Verlauf wir erst zu verstehen beginnen. So assemblieren beispielsweise im Nukleolus ca. 80 verschiedene ribosomale Proteine und 4 rRNA in ribosomale Vorläuferpartikel, die erst mit dem Export ins Zytoplasma

für die Translation als 40S und 60S Untereinheiten aktiviert werden (Warner, 1999). Proteinuntereinheiten und snRNA der Spleißosomen werden teilweise im Zytoplasma assembliert, während das Spleißen selbst im Kern stattfindet (Yong et al., 2004). Ribosomen und Spleißosomen sind jedoch RNA-enthaltende Proteinkomplexe, deren Aufbau die Prozessierung von Proteinen und RNA erfordert und sich prinzipiell von dem der Proteasomen unterscheidet, es sei denn, Proteasomen würden von RNA-enthaltende Partikeln abstammen. Bislang wurde jedoch nur ein Bruchteil von Proteasomen mit bestimmten RNA-Molekülen assoziiert vorgefunden, deren physiologische Bedeutung weitgehend unverstanden ist (Scherrer, 1990).

Um Proteasomen im Zytoplasma reifen zu lassen, müssten wir einen Mechanismus fordern, der zwischen Vorläuferkomplexen sortiert, die zur weiteren Reifung entweder im Zytoplasma verbleiben oder in den Kern entlassen werden. Hierbei könnten posttranslationale Modifikationen und transient interagierende Proteine eine entscheidende Rolle spielen. Nach erfolgter Reifung im Zytoplasma würden die NLS im reifen 20S Proteasom durch assoziierte regulatorische Komplexe zudem verdeckt und für Karyopherin  $\alpha\beta$  unzugänglich werden.

Als weitere Komponenten, die die Assemblierung und Aktivität nukleärer 26S Proteasomen regulieren dürften, sind zur Zeit zwei hochmolekulare Proteine, genannt Blm3 und Ecm29, Gegenstand unsrer Forschung. Sie zählen zur Familie der „HEAT-repeat like Proteine“, deren Struktur von Hefe bis Mensch konserviert zu sein scheint. Blm3 reguliert einen späten Schritt der nukleären 20S Proteasomenreifung und wurde von uns mit de novo synthetisierten 20S Proteasomen assoziiert vorgefunden (Fehlker et al., 2003)\*. Unsere künftigen Studien werden darauf ausgerichtet sein, zu untersuchen, ob die in Hefe gefundenen Funktionen dieser Proteine auch für die strukturverwandten Proteine in höheren Eukaryontenzellen zutreffen.

Inwiefern das von uns in Hefe postulierte Modell (Abb.1) für den nukleären Import und die Biogenese von 26S Proteasomen auf das Säugetiersystem übertragbar ist, bleibt abschließend zu beantworten. Proteasomale Subkomplexe stellen die ersten komplexeren Frachtproteine von Karyopherin  $\alpha\beta$  dar, die bislang in der Literatur beschrieben sind. In Säugetierzelllinien wurden proteasomale Vorläuferkomplexe

vorrangig im Zytosol gefunden, so dass die Annahme berechtigt ist, dass 20S Proteasomen im Zytoplasma assemblieren (Frentzel et al., 1994; Yang et al., 1995). Abhängig von der Zelllinie würden 3 bis 4-mal soviel reife 20S Proteasomen im Verhältnis zu Vorläuferkomplexen gefunden, während Vorläuferkomplexe aus Geweben schwieriger nachzuweisen seien (Nandi et al., 1997). Mit Prozessierungsraten von Stunden der aus Zelllinien gewonnenen Vorläuferkomplexen ist die Lebensdauer dieser Vorstufen des 20S Proteasoms wesentlich höher als die der Vorläuferkomplexe in Hefe (Frentzel et al., 1994; Nandi et al., 1997), deren Prozessierung in Minuten erfolgt (Chen and Hochstrasser, 1996; Ramos et al., 1998). Eine höhere Syntheseleistung an Vorläuferkomplexen in Säugetierzellen im Vergleich zur Hefe kann kaum vorliegen, da die Anzahl an Proteasomen und Ribosomen proportional zum Zellvolumen ist (Kalkulationen in Säugetierzellen, (Princiotta et al., 2003); in Hefe, (Ghaemmaghami et al., 2003)). Warum Proteasomenbiogenese in Säugetierzellen ein ineffizienter Prozess sein soll, ist nicht verstanden. Monaco und Mitarbeiter vermuteten, dass die Mehrheit der Vorläuferkomplexe nicht in langlebige 20S Proteasomen überführt werden müsse (Nandi et al., 1997) und erst auf Bedarf rekrutiert werden könnte.

Studien an GFP-markierten 20S Proteasomen einer Fibroblastenzelllinie zeigten, dass Proteasomen Kernporen nur extrem langsam passieren. Die hierbei markierte  $\beta$ -Untereinheit war in reife 20S Proteasomen eingebaut. Eine Aufnahme von zytoplasmatischen Proteasomen in den Kern wurde vornehmlich mit der Auflösung der Kernmembran während der Mitose beobachtet (Reits et al., 1997). Dieser Mechanismus kann jedoch nicht für in Gewebe eingebundene Zellen zutreffen, da deren Zellzyklus in der  $G_0$  Phase arretiert ist. Ein wesentlich komplexeres Bild ergibt zudem die subzelluläre Verteilung von Proteasomen über Nukleo- und Zytoplasma in Säugetierzellen, die im Gegensatz zu Hefe je nach verwendeter Zelllinie variieren kann. So lokalisieren GFP-markierte Proteasomen hauptsächlich im Kern von HeLa Zellen (Holmberg et al., 2004), obwohl biochemische Fraktionierungen dieser Verteilung widersprechen (Knecht and Rivett, 2000). In HeLa Zellen wird Karyopherin  $\alpha$  in sechs Isoformen vorgefunden, deren Substratspezifität noch unbekannt ist (Kohler et al., 1999). Das Abschalten bestimmter Karyopherin  $\alpha$  Isoformen führt zu Proliferationsstörungen (Quensel et al., 2004). Ein Ansatz, unser

Modell in HeLa-Zellen zu überprüfen, wäre über RNA Interferenz die Expression bestimmter Karyopherin  $\alpha$  Isomere zu unterdrücken, um möglicherweise eine Störung in der Proteasomenassemblierung, verbunden mit einer Umverteilung proteasomaler Komplexe, ins Zytoplasma hervorzurufen.