

Eigenzitate sind im Folgenden stets fett gedruckt.

2. Einleitung

2.1. ATP-abhängige Proteolyse in Pro- und Eukaryonten

Die Fähigkeit von Zellen oder Zellverbänden sich an verändernde Umweltbedingungen anzupassen, ist für ihr Überleben essentiell. Einen zentraler Mechanismus, der wesentlich zur Adaptation an Stressbedingungen beiträgt, stellt die regulierte, energieabhängige Proteolyse dar. ATP-abhängige Proteolyse spielt eine Schlüsselrolle in der Zellphysiologie aller Organismen, indem die Verfügbarkeit kurzlebiger Regulatorproteine bestimmt, die Akkumulation geschädigter Proteine verhindert und damit die Proteinhomöostase gewährleistet wird. In allen drei Domänen des Lebens, in Archaeobakterien, Bakterien und Eukaryonten hat man proteolytische Systeme gefunden, die kontrolliert und energieabhängig endogene Proteine abbauen. Während in Archaeobakterien und Eukaryonten vorwiegend Proteasomen für die kontrollierte, energieabhängige Proteolyse in der Zelle verantwortlich sind, haben sich in Eubakterien proteasomenähnliche Enzymkomplexe, die sogenannten caseinolytischen Proteasen (Clp-Proteasen) entwickelt (Wickner et al., 1999).

Zum Beispiel sind in *Escherichia coli* neben abnormalen und Fremdproteinen auch die Transkriptionsfaktoren, σ^S oder σ^{32} , Substrate der ATP-abhängigen Clp-Proteasen (Gottesman, 1996). Clp Proteasen in *Bacillus subtilis*, dem Modellorganismus für Gram-positive Bakterien, übernehmen wesentliche zellphysiologische Funktionen wie den Abbau von geschädigten Proteinen (**Krüger et al., 2000**) und damit auch die Vermittlung von Stresstoleranz (**Krüger et al., 1994; Gerth et al., 1998**). Außerdem sind sie für Vorgänge wie die Sporulation, die Beweglichkeit und die Zellteilung durch den spezifischen Abbau von Regulatorproteinen für die Zelle essentiell (**Krüger et al., 1994; Gerth et al., 1998**).

Über die physiologische Rolle von Proteasomen in Archaeobakterien ist fast nichts bekannt, obwohl sie biochemisch und strukturell sehr gut charakterisiert sind (Ward et al., 2002 zur Übersicht). Einzig in *Thermoplasma acidophilum* gibt es Untersuchungen, das das Proteasom unter Hitzeschockbedingungen essentiell zu sein scheint (Ruepp et al., 1998).

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) stellt das zentrale intrazelluläre Degradationssystem für die Gewährleistung von Proteinqualität und -homöostase in Eukaryoten dar. Bis zu 90% aller zellulären Proteine in Eukaryoten werden proteasomal hydrolysiert. Proteasomen kommen ubiquitär vor und können bis zu 1% der löslichen Zellproteine ausmachen (Tanaka et al., 1986). Sie sind im Nucleus und Cytoplasma lokalisiert oder liegen mit dem Endoplasmatischem Retikulum (ER) assoziiert vor (Woicik and DeMartino, 2003 zur Übersicht) .

Ein bedeutender Anteil der cytosolischen Proteinqualitätskontrolle findet am ER statt. Dort eliminiert das UPS über den ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD) missgefaltete oder fehlassemblierte Proteine aus dem ER, die dafür retrograd ins Cytosol zurücktransportiert werden müssen (Meusser et al., 2005 zur Übersicht). Außerdem wird die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Regulatorproteinen für nahezu jeden zellulären Kontrollmechanismus wie die Kontrolle der Genexpression, des Zellzyklus, der Apoptose, der Stressantwort oder von Entwicklung und Differenzierung über proteasomale Degradation reguliert. Darüber hinaus generiert das Proteasom antigene Peptide, die als Liganden von MHC Klasse I Komplexen an der Zelloberfläche zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) präsentiert werden. Damit ist das Proteasom ein direkter Bestandteil eines intakten Immunsystems (Kloetzel, 2001; Abb. 2).

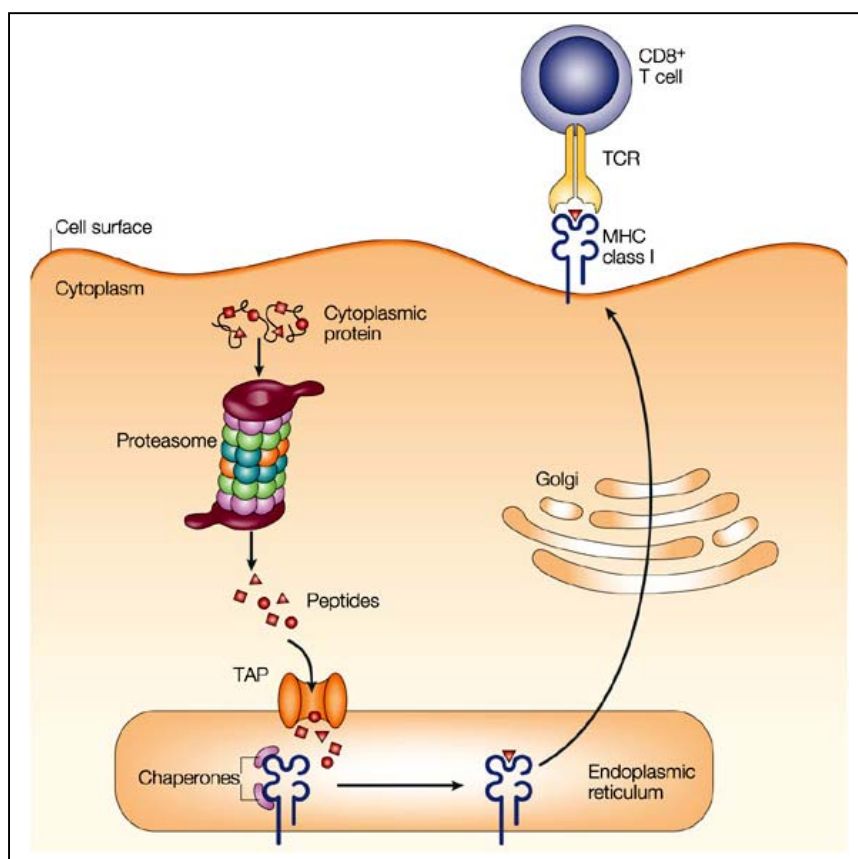


Abb. 2. MHC Klasse I - Antigenpräsentation. MHC I - Epitop-haltige Proteinsubstrate werden durch Polyubiquitylierung für die Degradation durch das 26S-Proteasom markiert. Die proteasomal generierten antigenen Peptide werden von TAP in das ER-Lumen transportiert. Im ER binden und stabilisieren die antigenen Peptide geeignete MHC I-Moleküle unter der Assistenz verschiedener Chaperone. Über den Golgi-Apparat werden Peptid-MHC I-Komplexe an die Zelloberfläche transportiert. Erfolgt dort eine spezifische Bindung zwischen dem T-Zell-Rezeptor-Komplex (TCR) eines CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) und dem komplementären MHC I-Antigen-Komplex, wird der CTL aktiviert [Abbildung nach (Kloetzel, 2004)].

Als proteasomale Substrate treten neben *per se* kurzlebigen (RDPs- *rapidly degraded proteins*) vor allem fehlerhafte bzw. missgefaltete Translationsprodukte in Form von DRiPs (*defective ribosomal products*) auf (Schubert et al., 2000; Reits et al., 2000; Quian et al., 2005, 2006). DRiPs und RDPs gelten als Hauptquelle für die Generierung von MHC Klasse I-Liganden, die somit eine schnelle CTL-Antwort gewährleisten können (Yewdell et al., 2003 zur Übersicht).

2.2. Die Substratspezifität energieabhängiger Proteolysesysteme

Die selektive Erkennung von Substraten stellt ein generelles Prinzip kontrollierter Proteolyse in Pro- und Eukaryonten dar. Die spezifische Markierung von Substraten durch kovalente Modifikationen mit Erkennungspeptiden spielen dabei eine wesentliche Rolle. Alternativ vermitteln Adapterproteine die Substraterkennung (Dougan et al., 2002 zur Übersicht).

In Eubakterien werden fehltranslatierte Polypeptide, aber auch einige Regulatorproteine, ko-translational mit einem 11-aminosäurelangen Peptid, dem SsrA-Tag, carboxyterminal für den Abbau durch Clp-Proteasen markiert (Gottesman et al., 1998).

Zu degradierende Substrate in Eukaryonten werden hingegen über die Ubiquitin-Enzym-Thioester-Enzymkaskade mit kovalent gebundenen Multi-Ubiquitin-Ketten post-translational für den Abbau durch das UPS markiert. Ubiquitin, ein kleines, stark konserviertes Polypeptid von 76AS, wird zunächst durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) ATP-abhängig aktiviert. Aktiviertes Ubiquitin geht im folgenden eine intermediäre Thioesterbindung mit einem der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2) ein. E2-Enzyme transferieren dann das Ubiquitin entweder auf eine der zahlreichen Ubiquitin-Protein-Isopeptid-Ligasen (E3) oder mit Hilfe der für die Substratspezifität verantwortlichen E3-Ligase direkt auf das Substrat (Ciechanover, 2005). Mehrere Durchläufe dieser Kaskade führen zu multiplen Ubiquitin-

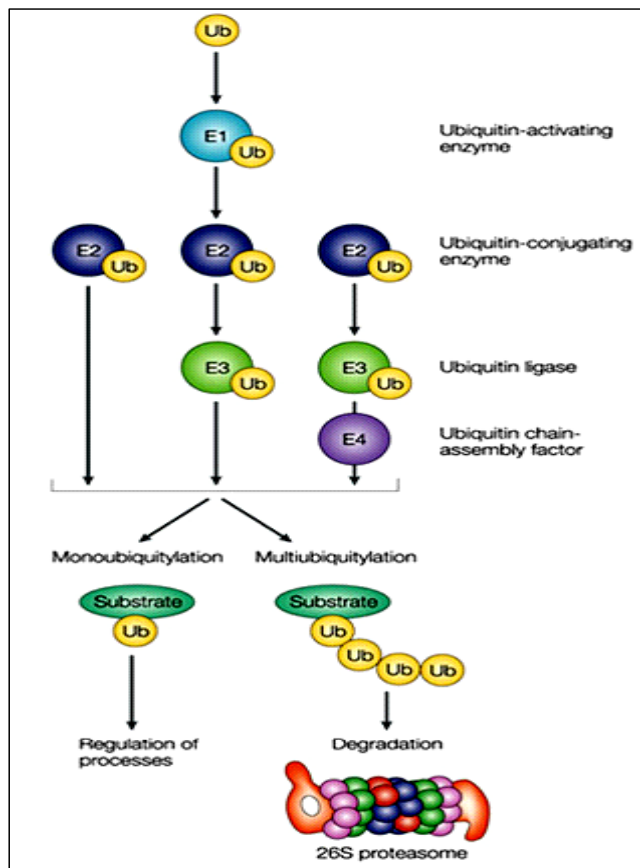


Abb. 3. Schematische Darstellung des Ubiquitylierungsweges in Eukaryonten. Freies Ubiquitin (Ub) wird ATP-abhängig durch Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert und gebunden. Es erfolgt ein Transfer des Ubiquitins auf Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2), die entweder direkt oder mit Hilfe von Ubiquitin-Ligasen (E3s) auf die Substrate übertragen. Im Regelfall führt das zu einer Multiubiquitinierung der Substrate mit Ubiquitinketten und damit zur Markierung der Substrate für den Abbau durch das 26S Proteasom. In einigen Fällen wird für die Multiubiquitinierung Ubiquitin-Ketten-Assemblierungsfaktor E4 benötigt. Monoubiquitylierung hat eher regulatorische Funktion bei Prozessen wie Endozytose, DNA-Reparatur oder Transkriptionskontrolle (aus Jesenberger und Jentsch, 2002)

Ketten. In einigen Fällen wird diese Poly-Ubiquitylierung sequentiell durch einen E4 Multi-Ubiquitin-Konjugationsfaktor oder Ubiquitin-Ketten-Assemblierungsfaktor assistiert. Mono-ubiquitylierung stellt eine zelluläre Strategie zur Regulation von endozytotischen Vorgängen dar (Jesenberger und Jentsch, 2002 zur Übersicht; Abb. 3).

Über eine physiologische Substratmarkierung für den proteasomalen Abbau in Archaeobakterien gibt es keinerlei Hinweise. In Genomstudien wurden bis heute keine Sequenz-Homologe zu Ubiquitin gefunden, jedoch zeigen jüngere Studien, dass es offensichtlich Strukturhomologe gibt (Maupin-Furlow et al., 2000; Bienkowska et al. 2003).

2.3. Generelle Architektur ATP-abhängiger Proteasen in Pro- und Eukaryonten

Als evolutionär stabiles Konzept des kontrollierten Proteinabbaus hat sich die Autokompartimentierung, eine geordnete Zusammenlagerung von verschiedenen Untereinheiten zu einem zylinderförmigen Proteasekomplex, herauskristallisiert. Die prinzipielle molekulare Architektur ATP-abhängiger Proteasekomplexe in Pro- und Eukaryonten besteht aus Ringstrukturen regulatorischer und proteolytisch aktiver Subkomplexe. Generell liegt dabei der proteolytisch aktive Kern in siebenzähliger Symmetrie vor und wird von den regulatorischen Komplexen mit sechszähliger Symmetrie flankiert. Den proteolytisch aktiven Untereinheiten von Pro- und Eukaryonten ist gemein, dass sie als inaktive Proformen synthetisiert werden und Zymogenaktivierung unterliegen (Maupin-Furlow, 2000 zur Übersicht). Regulatorische Komplexe enthalten ATPasen, die zur sogenannten AAA⁺-ATPase-Familie (*triple A: ATPases associated with diverse cellular activities*) gehören (Wickner et al., 1999; Ogura und Wilkinson, 2001 zur Übersicht; Abb. 4). In Prokaryonten sind eine Reihe verschiedener ATP-abhängiger, hochmolekularer Proteasekomplexe bekannt, die proteasomähnliche Strukturen aufweisen. Genannt seien hier exemplarisch die eubakteriellen Clp-Proteasen aus *E. coli* oder *B. subtilis* wie ClpAP, ClpCP, ClpXP oder ClpYQ (HslUV) (Gottesman et al., 1997; Wickner et al., 1999 zur Übersicht). In Archaeobakterien werden die AAA⁺-ATPasesysteme PAN und ARC im Zusammenhang mit regulierter Proteolyse durch 20S Proteasomen diskutiert (Maupin-Furlow et al., 2000 zur Übersicht). Den größten Anteil der nichtlysosomalen ATP-abhängigen Proteolyse in eukaryotischen Zellen katalysiert ein hochmolekularer, multikatalytischer Proteinasekomplex, das 26S Proteasom. In der Regel sind die Substrate dabei mit Ubiquitin markiert (Ciechanover, 2005, zur Übersicht).

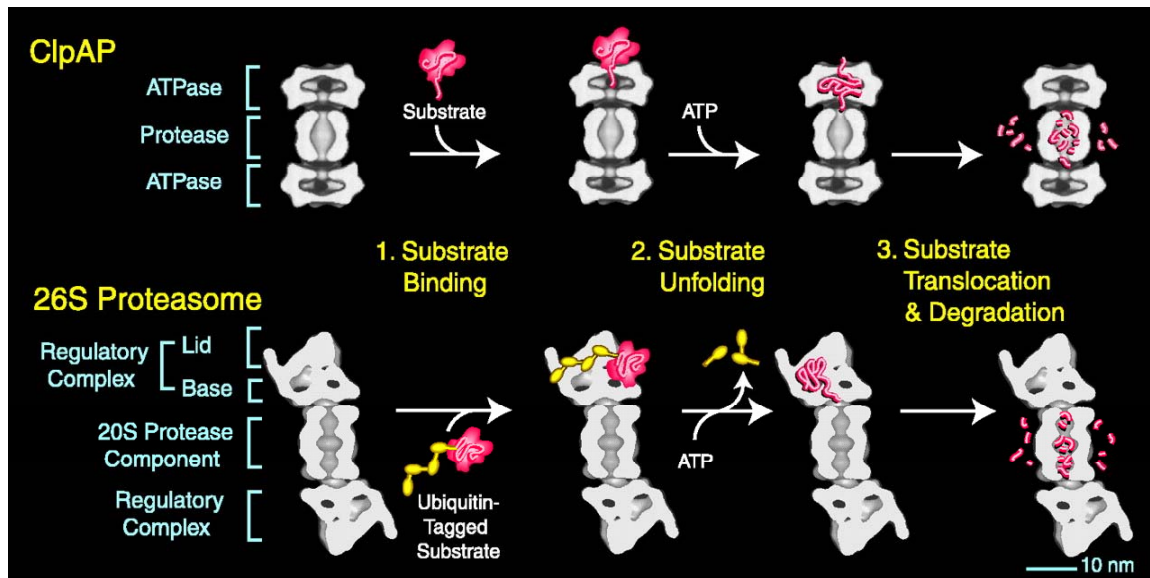


Abb. 4 ATP-abhängige Proteolyse in Pro- und Eukaryonten. Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Proteindegradation ATP-abhängiger Proteasen. Die Proteasen ClpAP aus *E. coli* und das eukaryotische 26S Proteasom sind als Schnitte von elektronenmikroskopischen Aufnahmen dargestellt und verdeutlichen die prinzipielle Architektur aus proteolytischen (innen) und regulatorischen Subkomplexen (außen). Substratbindung und die ATP-abhängige Entfaltung erfolgt durch die regulatorischen Subkomplexe, während die Peptidhydrolyse nach Translokation im Inneren der proteolytischen Komponenten stattfindet (Ubiquitin gelb; Substrate rot). aus Wickner et al. (1999)

ATP-abhängige Proteasekomplexe in Pro- und Eukaryonten entsprechen sich nicht nur in ihrer prinzipiellen molekularen Architektur. Der eukaryontische 19S Regulator und der prokaryontische Clp-ATPasekomplex bzw. der 20S Kernkomplex und ClpP-Komplex ähneln sich auch in der Funktionalität dieser Subkomplexe (Abb. 4). Den AAA^+ -ATPasen der Regulatorkomplexe wird die Erkennung und Bindung sowie die energieabhängige Entfaltung und Translokation von Substraten in die innere Kammer zu den katalytisch aktiven Zentren zugeschrieben, damit im Inneren der proteolytischen Kammer die Peptidhydrolyse stattfinden kann. Während prokaryontische Regulatorkomplexe ausschließlich aus AAA^+ -ATPasen bestehen, sind die 19S Regulatoren der eukaryontischen Proteasomen aus ATPasen und weiteren Komponenten des sogenannten Lid-Subkomplexes aufgebaut. Lid-Untereinheiten haben Funktionen in der Erkennung und Deubiquitinierung von Substraten (Gottesman et al., 1997; Wickner et al., 1999; Braun et al., 1999; Ciechanover, 2005 zur Übersicht; Abb. 4). Die ClpAP-Protease aus *E. coli* zum Beispiel setzt sich aus der regulatorischen Untereinheit, der ATPase ClpA und der proteolytischen Untereinheit ClpP zusammen (Katayama-Fujimura et al., 1987; Hwang et al., 1987). Strukturell besteht dieser Komplex aus einem Tetradekamer ClpP, das von zwei aufeinandergesetzten Ringen von jeweils sieben ClpP-Untereinheiten gebildet und an einem oder beiden Enden von einem ClpA-Hexamerring flankiert wird.

Eubakterielle ClpAP und ClpCP-Proteasen gehören zur Familie der Serin-Proteasen (Hwang et al., 1987), während bei der ClpYQ (HslUV) Protease sowohl Threonin- als auch Serinreste an der Peptidhydrolyse beteiligt sind (Bochtler et al., 2000; Kang et al., 2001; Yoo et al., 1997).

Kristallographische Untersuchungen zeigen, dass 20S-Proteasomen von Pro- und Eukaryoten eine konservierte Struktur aufweisen (Löwe et al., 1995; Groll et al., 1997). 20S Proteasomen sind aus vier übereinander gestapelten heptameren Ringen aus α und β Untereinheiten aufgebaut, sodass sich innerhalb des Proteasomenzylinders eine Verteilung der Ringe von $\alpha\beta\beta\alpha$ ergibt. Einfache archaebakterielle Proteasomen bestehen aus homoheptameren α - und β -Ringen. Durch Genduplikationen entstanden im Zuge der Evolution immer mehr homologe α - bzw. β -Untereinheiten ohne die molekulare Architektur zu verändern (Hughes, 1997). Eukaryotische 20S-Proteasomen sind somit wesentlich komplexer aus je sieben verschiedenen α - und sieben verschiedenen β -Untereinheiten aufgebaut, die jeweils doppelt im Komplex vorhanden und räumlich in heterooligomeren Ringen zu $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ angeordnet sind. Durch Lösung der Kristallstrukturen des 20S Proteasoms aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als auch später des bovinen 20S Proteasoms liegen detaillierte Daten zur Struktur als auch zu den Peptidhydrolysemechanismen eukaryontischer Proteasomen vor (Groll et al., 1997; Unno et al., 2002; Abb. 5). Die beiden äußeren α -Ringe formen eine zentrale Pore, die normalerweise durch die N-termini der α -Untereinheiten geschlossen ist und limitieren dadurch den Zugang zu den aktiven Zentren im Inneren der β -Ringe. Durch die Interaktion der α -Ringe mit proteasomalen Regulatorkomplexen wie den 19S-Kappen oder dem Proteasom-Aktivator-Komplex PA28 (11S Regulator) kann die verschlossene Pore reguliert geöffnet werden. Über diesen „gating“ Mechanismus wird somit Substrateinlass sowie Produktauslass kontrolliert (Groll et al., 1997; Groll et al., 2000; Whitby et al., 2000; Abb. 5).

Die zentrale Kammer, die im Inneren des Komplexes von den beiden β -Ringen gebildet wird, ist über die Vorkammern zwischen den α - und β -Ringen zugänglich und beherbergt die katalytisch aktiven Zentren des Proteasoms (Groll et al., 1997; Unno et al., 2002; Abb. 5).

Wegen ihres besonderen katalytischen Mechanismus, der Proteasomen von den vier klassischen Proteasemfamilien unterscheidet, gehören Proteasomen zur Enzymfamilie der Ntn-Hydrolasen (N-terminal nucleophile). Die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten enthalten ein N-terminales Threonin, dessen Hydroxylgruppe als Nucleophil dient, um die Peptidbindung anzugreifen (Brannigan et al., 1995; Löwe et al., 1995).

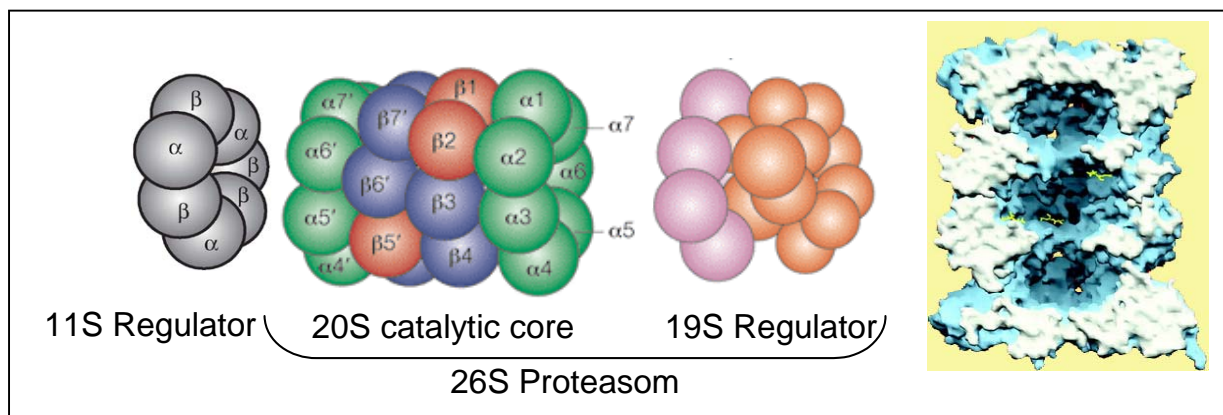


Abb. 5 Das 20S-Proteasom. Schematischer Aufbau des 20S-Partikels, die α -Untereinheiten sind grün, inaktive β -Untereinheiten blau und die aktiven β -Untereinheiten rot symbolisiert. Jeweils mit dem α -Ring können der 11S Regulator und/oder der 19S Regulator interagieren (aus Kloetzel, 2001). Querschnitt durch das Oberflächenmodell von *S. cerevisiae* 20S-Proteasomen (aus Bochtler et al., 1999). Die Schnittflächen sind weiss eingefärbt und die aktiven β -Untereinheiten durch ihre Komplexierung mit dem Calpain-Inhibitor I (gelb) indiziert.

Nur drei der sieben β -Untereinheiten in Eukaryonten besitzen peptidspaltende Aktivität ($\beta 1/\delta$, $\beta 2/Z$ und $\beta 5/Mb1$; Groll et al., 1997; Heinemeyer et al., 1997), die sich in ihren proteolytischen Aktivitäten unterscheiden. Deshalb wird das Proteasom auch als multikatalytische Protease bezeichnet (Wilk und Orłowski, 1983). $\beta 1$ zeigt caspase-ähnliche Aktivität, die eine Hydrolyse von Peptidbindungen bevorzugt nach sauren Resten vermittelt. $\beta 2$ ist durch trypsin-ähnliche Aktivität charakterisiert und katalysiert die Hydrolyse bevorzugt C-terminal von basischen Resten, während $\beta 5$ chymotryptische-Aktivität aufweist und damit bevorzugt nach hydrophoben oder aromatischen Resten hydrolysiert (Wilk und Orłowski, 1983; Dahlmann et al., 1986; Orłowski et al., 1993). Die Zuordnung der drei zentralen Spaltpräferenzen erfolgte anhand von Untersuchungen mit Peptidsubstraten. Die aktiven Zentren sind darauf jedoch nicht absolut festgelegt, die Spaltmuster in längeren Substraten hängen u.a. auch von der umgebenden Sequenz ab, so dass Proteasomen Peptidbindungen nach nahezu jeder beliebigen Aminosäure eines Proteins spalten können (Nussbaum et al., 1998; Kloetzel, 2001).

In Mammaliazellen können die drei aktiven β -Untereinheiten durch Interferon- γ (IFN γ) induzierbare homologe Untereinheiten ($\beta 1i/LMP2$, $\beta 2i/MECL1$ und $\beta 5i/LMP7$) ausgetauscht werden (Abb. 6). Durch den Einbau dieser Immununtereinheiten können Zellen die Spaltungsaktivität ihrer Proteasomenkomplexe hin zu einer verbesserten Generierung von MHC Klasse I Epitopen modulieren (Eleuteri et al., 1997; Chen et al., 2001; Toes et al., 2001; Kloetzel, 2001, zur Übersicht). Die Induktion von Immunoproteasomen stellt somit einen Adaptationsmechanismus dar, um das Proteasomensystem den immunologischen

Gegebenheiten anzupassen. Damit existieren in Vertebraten mindestens zwei Typen von 20S Proteasomen, die konstitutiven Proteasomen (c20S) und die Immunoproteasomen (i20S) (Aki et al., 1994).

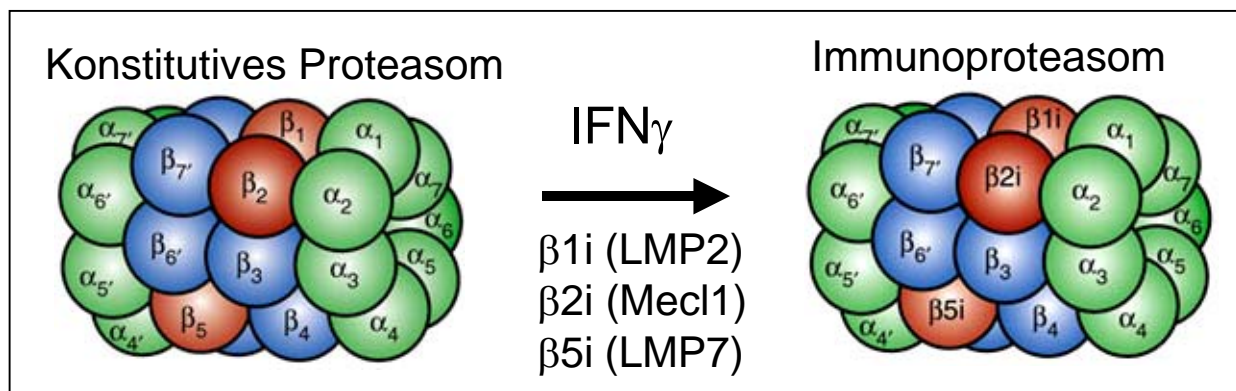


Abb. 6. Konstitutive Proteasomen und Immunoproteasomen. In Vertebraten existieren mindestens zwei Typen von 20S Proteasomen, die konstitutiven Proteasomen (c20S) und die Immunoproteasomen (i20S). Nach einem Zytokinstimulus wie Interferon- γ werden die aktiven Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 durch die homologen Immununtereinheiten β_{1i} , β_{2i} und β_{5i} ausgetauscht. Dieser Vorgang passiert ausschließlich über Neuassemblierung der Komplexe.

2.4. Regulation energieabhängiger Proteolysesysteme in Pro- und Eukaryonten

Die intrazelluläre Homöostase und Aktivität energieabhängiger Proteolysesysteme in Pro- und Eukaryonten kann auf verschiedene Weise reguliert werden. Generell gilt, je komplexer die Systeme desto komplexer die Regulation. Während eubakterielle Clp-Proteasen weitestgehend nur über differentielle Genexpression kontrolliert werden, werden die eukaryontischen 26S Proteasomen sowohl über Genexpression als auch über den Einbau und die Aktivierungskinetik ihrer aktiven β -Untereinheiten reguliert.

2.4.1. Regulation der Genexpression von Proteasekomplexen

In Bakterien ist die außerordentlich strenge Kontrolle der Genexpression ATP-abhängiger proteasomenähnlicher Proteolysesysteme intensiv untersucht. Die Genexpression ATP-abhängiger Proteolysesysteme in Bakterien unterliegen autoregulatorischen Mechanismen: σ^{32} in *E. coli* bzw. CtsR in grampositiven Bakterien regulieren die Genexpression von Clp-Proteasen (Missiakas et al., 1998; **Krüger und Hecker, 1998**; Derré et al., 1999).

Der alternative Sigmafaktor σ^{32} in *E. coli* vermittelt dem RNA-Polymeraseholoenzym die Spezifität, Hitzeschockgene zu transkribieren (Bukau, 1997; Rosen und Ron, 2000 zur Übersicht). Als Sensor für die Hitzeschockantwort in allen Organismen wird der Pool an inaktiven Proteinen, also eine Imbalance der Proteinhomöostase, diskutiert (Bukau, 1997; Morimoto, 1998 zur Übersicht). Zu den Komponenten des σ^{32} - Hitzeschockregulons zählen

zwei bedeutende Gruppen von Proteinen. Die klassischen Chaperone verhindern Missfaltung und Aggregation oder markieren missgefaltete Proteine, die dann von der zweiten Gruppe, den ATP-abhängigen Proteasen wie Clp oder Lon abgebaut werden (Bukau, 1997; Missiakas et al., 1998; Rosen und Ron, 2000 zur Übersicht). Die Induktion des σ^{32} -abhängigen Hitzeschockregulons wird über eine erhöhte Molekülzahl durch Stabilisierung des σ^{32} -Proteins ausgelöst (Bukau, 1997 zur Übersicht). Eine zentrale Rolle als negative Modulatoren in den Kontrollmechanismen für σ^{32} wird der DnaK-Chaperonmaschinerie zugeschrieben. Ein einfaches Titrationsmodell erklärt die homeostatische Kontrolle der Transkription von Hitzeschockgenen in *E. coli*. Unter Normalbedingungen vermittelt die Bindung der DnaK-Maschine an die σ^{32} -beladene RNA-Polymerase die ATP-abhängige Dissoziation des σ -Faktors und seine folgende Degradation durch die Proteasen FtsH und ClpYQ (Missiakas et al., 1998; Tomoyasu et al., 1995). Ist die Zelle einem Hitzestress ausgesetzt, wird die DnaK-Maschinerie durch entstehende missgefaltete Proteine abtitriert und das Gleichgewicht zugunsten der σ^{32} -beladenen RNA-Polymerase verschoben, die dann die verstärkte Transkription von Hitzeschockgenen einleitet (Bukau, 1997 zur Übersicht, Abb. 7).

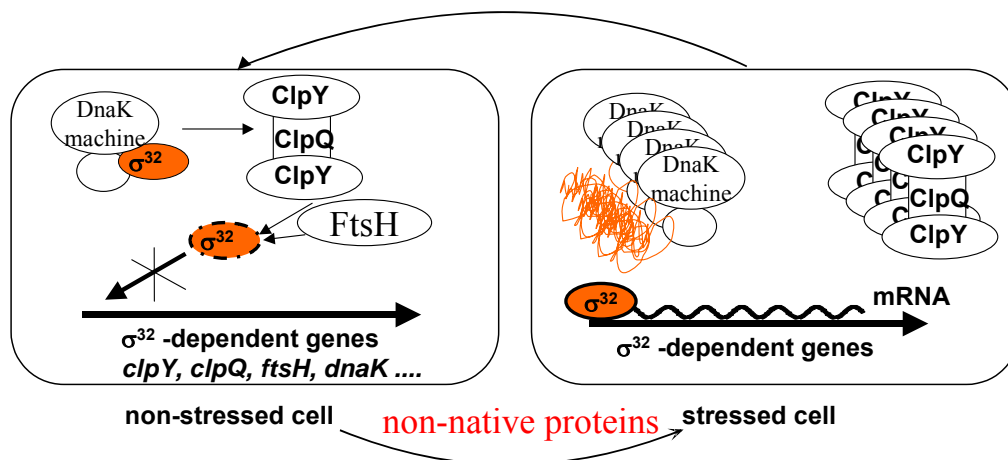


Abb. 6. Regulation der Hitzeschockantwort in *E. coli* über die DnaK Maschine. In normal wachsenden Zellen wird σ^{32} durch die DnaK Maschine den Proteasen ClpYQ und FtsH zum Abbau präsentiert. Hitzeschockgene werden bei niedrigem σ^{32} -Gehalt deshalb nur basal transkribiert. Nach einem Stress entstehen verstärkt nichtnative Proteine in der Zelle, die die DnaK Maschine von σ^{32} wegtitrieren, den zellulären σ^{32} -Gehalt dadurch erhöhen und eine verstärkte Transkription σ^{32} -abhängiger Gene induzieren. Bei genügend hoher Expression von Hitzeschockproteinen stellt sich das Gleichgewicht wieder ein und die Zellen kehren in ihren Ursprungzustand zurück.

Expressionsprofile von *clp*-Genen aus *B. subtilis* zeigen, dass die Transkription durch verschiedene Stressstimuli induziert wird (Krüger et al., 1994; Gerth et al., 1998). Die Induktion des hexacistronischen *clpC*-Operons und des *clpP*-Genes wird an zwei Promotoren auf Ebene der Transkriptionsinitiation realisiert. Während der eine Promotor abhängig vom Stresssigmafaktor σ^B transkribiert und induziert wird, weist der andere Eigenschaften von

vegetativen Promotoren auf und kann σ^B Defizienz kompensieren (Krüger et al., 1996; Gerth et al., 1998). Die Genexpression am vegetativen Promoter unterliegt unter Standardbedingungen der negativen Kontrolle durch den CtsR Repressor (Krüger et al., 1996; Krüger und Hecker, 1998; Derré et al., 1999).

In der Vergangenheit hielt man die proteasomale Genexpression in Eukaryonten bis auf die zytokininduzierbaren β -Untereinheiten für unreguliert. Erst in jüngerer Zeit ist die Kontrolle der proteasomalen Genexpression als Regulationsmechanismus für die Proteasomenmenge in der Zelle in Betracht gezogen worden. Einen ersten Hinweis auf eine koordinierte Kontrolle der proteasomalen Genexpression lieferte die genomische Sequenz der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Mannhaupt et al. (1999) fanden in den regulatorischen Regionen aller proteasomalen Gene von *S. cerevisiae* eine gemeinsame Sequenzstruktur, die sie PACE-Element („proteasome associated control element“) nannten. Durch ein modifiziertes Zwei-Hybrid-System identifizierten sie das Protein Rpn4 als Transkriptionsfaktor, der an die PACE-Elemente binden und dadurch die Transkription aller Gene, die für Proteasomenuntereinheiten kodieren, konzentriert aktivieren kann. Zwei Jahre später publizierten Xie und Varshavsky (2001), dass das 26S Proteasom den Transkriptionsfaktor Rpn4 degradiert. Sobald der Zelle wieder genügend Proteasom zur Verfügung steht, stellt sich das Gleichgewicht durch Entfernung des Transkriptionsaktivators erneut ein (Modell Abb. 8).

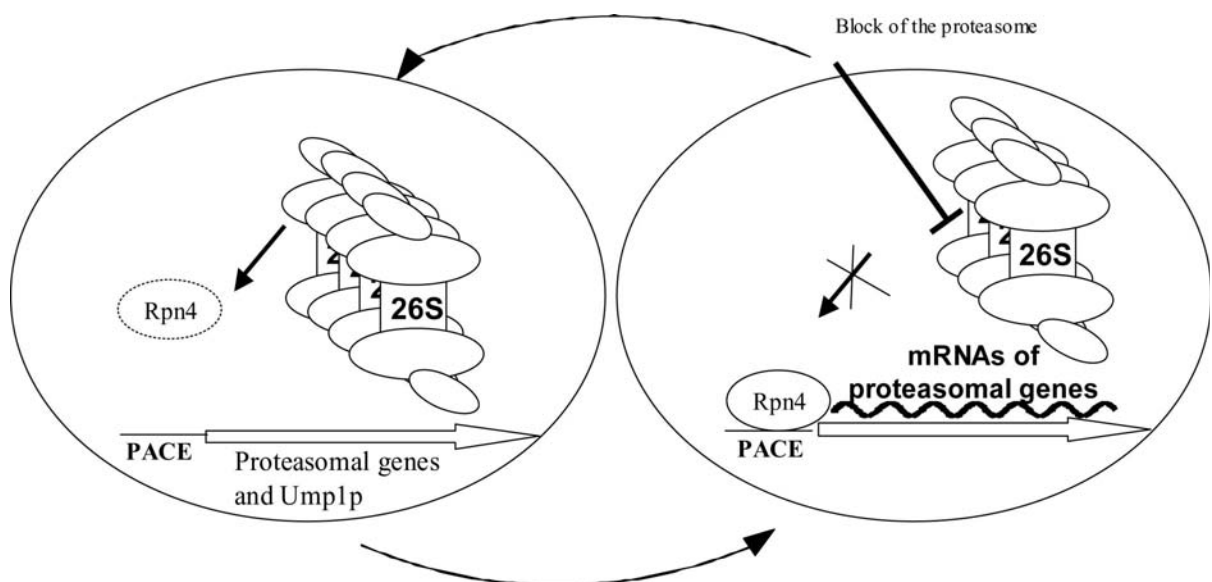


Abb. 8. Regulation der proteasomalen Genexpression in *S. cerevisiae* über Rpn4. In normal wachsenden Zellen wird der Transkriptionsfaktor Rpn4 durch das 26S Proteasom abgebaut und proteasomale Gene werden nur basal transkribiert. Bei Blockierung der proteasomalen Aktivität entsteht genügend Rpn4, um die proteasomale Genexpression zu induzieren. Bei einer genügend hohen Bildungsrate von 26S Proteasomen stellt sich das Gleichgewicht wieder ein und die Zellen kehren in ihren Ursprungszustand zurück.

Daraus ergibt sich ein auto-regulatorischer, positiver Rückkopplungsmechanismus ähnlich wie in bakteriellen Systemen. Der Rpn4-abhängige Regulationsmechanismus wurde weiterhin in einer globalen Analyse der Genexpression von *S. cerevisiae* nach Behandlung mit Proteasomeninhibitoren bestätigt (Fleming et al., 2002).

2.4.2. Biogenese des Proteasoms

Aktivitäten eukaryontischer Proteasomen in Zellen können sowohl über Genexpression als auch über den Einbau und die Aktivierungskinetik ihrer aktiven β -Untereinheiten reguliert werden. Die Bedeutung einer streng regulierten Proteasomenbiogenese in Eukaryontenzellen wird durch die Komplexität des Säugerproteasomen-Systems offensichtlich. Hier muss die Zelle sieben verschiedene α - und sieben verschiedene β -Untereinheiten, mit der Möglichkeit alternativ drei weitere aktive β -Immununtereinheiten einzubauen, an die richtige Stelle im 20S Komplex dirigieren.

Die Evolution hat dafür in Säugerzellen ein ausgeklügeltes und immer noch nicht vollständig verstandenes Biogeneseprogramm hervorgebracht, das zur Bildung c20S oder i20S führt. Da die β -Untereinheiten des Proteasoms als Proformen synthetisiert werden und Zymogenaktivierung unterliegen, müssen beide Proteasomentypen *de novo* gebildet werden. Die Vorgänge zur Biogenese des eukaryontischen 20S Proteasoms verlaufen in drei Hauptschritten, die letztendlich zur Formation aktiver 20S Proteasomen-Partikel führen. Der erste Schritt ist dabei die Biosynthese sieben verschiedener α und der Proformen sieben verschiedener β Untereinheiten. Alle α - sowie die Proproteine der β -Untereinheiten assemblieren in mehreren Stufen zu Precursorintermediärkomplexen, die schließlich die zur finalen Maturierung notwendige transkatalytische und autokatalytischen Prozessierung der β Untereinheiten vollziehen (Schmidt et al., 1997; **Krüger et al., 2001, 2003** zur Übersicht). Als Grundlage für die existierenden Modelle eukaryontischer Proteasomen dienen die Assemblierungswege einfacher archaebakterieller 20S Proteasomen, die oft nur aus zwei verschiedenen Untereinheiten bestehen (Maupin-Furlow et al., 2000 zur Übersicht). Die derzeitigen Vorstellungen und Modelle der einzelnen Assemblierungsstufen für eukaryontische Proteasomen werden hier kurz dargelegt. Zunächst scheint die Assemblierung durch die Bildung heteroheptamerer α Ringe bestimmt zu werden, die als Matrix für das Andocken der korrekten β Untereinheiten dienen. Alternative Modelle gehen davon aus, dass die Ausbildung von $\alpha\beta$ Dimeren notwendig ist (Gerads et al., 1997a, b; Mayr et al., 1998). Bei der Bildung der α -Ringe spielen die nicht-benachbarten Untereinheiten α_4 und α_7 und deren direkte Interaktion offenbar eine wichtige Rolle, sodass von der Ausbildung kleiner Oligomere aus verschiedenen α -Untereinheiten ausgegangen werden kann (Apcher et al., 2004; unsere unpublizierten Beobachtungen). Durch zwei distinkte Intermediate, dem 13S und dem 16S Precursorkomplex, konnte man die wahrscheinliche Reihenfolge der Assoziation der β -Untereinheiten nachvollziehen (Frentzel et al., 1994; Nandi et al., 1997;

Schmidtke et al., 1997). Als Bestandteil des frühen 13S Proteasomvorläuferkomplexes waren die β Untereinheiten $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ nachweisbar. Die vier anderen β -Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 7$ wurden offensichtlich später eingebaut und konnten nur im 16S (Schmidtke et al., 1997) Assemblierungsintermediat detektiert werden. Danach erfolgt eine Komplexierung zu einem großen kurzlebigen Vorläuferintermediat (Preholoproteasom), in dem dann die finale Reifung stattfindet (Schmidtke et al., 1996, 1997; Nandi et al., 1997). Bei diesem Schritt wurden in archaebakteriellen Modellen Konformationsänderungen in den β -Ringern postuliert (Groll et al., 2003).

Mit Ausnahme von $\beta 3$ und $\beta 4$ werden die proteasomalen β -Untereinheiten als inaktive Proproteine synthetisiert. Die autokatalytische Entfernung der Prosequenzen der zu aktivierenden $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ -Untereinheiten über limitierte Proteolyse spielt eine wichtige Rolle für den gesamten Biogeneseprozess und stellt einen Zweischnittmechanismus dar (Schmidtke et al., 1996; Chen und Hochstrasser, 1996). Der Einfluss verschiedener Prosequenz-Deletionen von sowohl aktiven als auch inaktiven β -Untereinheiten der Hefe *S. cerevisiae* ist intensiv untersucht worden. Die Deletion des Propeptids der $\beta 5$ -Untereinheit ist letal (Chen and Hochstrasser, 1996). Während Hefestämme mit einer $\beta 2$ -Prosequenz-Deletion temperatur-sensitiv waren und Defizite in der 20S-Assemblierung zeigten, hatte die Deletion der Propeptide von $\beta 1$ bzw. $\beta 7$ keinen deutlichen Einfluss auf die Maturierung des 20S-Proteasoms (Arendt and Hochstrasser, 1999; Jäger et al., 1999). Zusammenfassend wird den Prosequenzen der aktiven β -Untereinheiten in Hefe somit eine hierarchische Bedeutung beigemessen ($\beta 5 >> \beta 2 > \beta 1$). Auch die Prosequenz der inaktiven $\beta 6$ -Untereinheit in Hefe ist teilweise essentiell, da der C-terminale 'Überrest' dieser partiell prozessierten Prosequenz zur intakten Struktur des reifen 20S-Proteasoms beiträgt (Heinemeyer et al., 2004). Im Falle der inaktiven β -Untereinheiten mit Prosequenz wird die Prozessierung transkatalytisch durch die jeweilige benachbarte aktive Untereinheit durchgeführt (Chen and Hochstrasser 1996; Heinemeyer et al. 1997; Schmidtke et al. 1997; Jäger et al. 1999).

Die koordinierte und effiziente Assemblierung und Prozessierung komplexer, eukaryontischer Proteasomen bedarf der Assistenz von Helferproteinen. Diese Hypothese wurde schon 1994 erstmalig mit Daten unterlegt, ohne den Faktor identifizieren zu können. 1997 konnte die Vermutung mit der Identifizierung des Hsp70 Chaperons in 16S Vorläuferkomplexen von Säugerproteasomen betätigt werden (Frentzel et al., 1994; Schmidtke et al., 1997).

Ramos et al. ist es 1998 gelungen, das kurzlebige, akzessorische Protein Ump1 (*Ubiquitin-mediated proteolysis*) in der Hefe *S. cerevisiae* zu identifizieren, das für eine effiziente Reifung des Hefeproteasoms notwendig ist. Ump1 wird nur spezifisch in Vorläuferkomplexen gefunden und scheint mit der Prosequenz von $\beta 5$ zu interagieren (Ramos et al. 1998; Cagney

et al., 2001). Nach Dimerisierung von zwei Ump1-assoziierten Hemiproteasom-Assemblierungsintermediaten wird Ump1 in die zentrale Kammer des reifenden Proteasoms eingeschlossen und stellt nach der vollständig abgeschlossenen Maturierung das erste Substrat des Proteasoms dar. Damit bestimmt die Halbwertszeit von Ump1 die Kinetik der Proteasomenbildung und die Degradation von Ump1 kann als Signal für die vollständige Proteasomenreife angesehen werden. Interessanterweise ist eine Deletion von Ump1 im Hefesystem nicht letal, führt allerdings zu einer erheblichen Beeinträchtigung des Wachstums und zu einer hohen Sensitivität gegenüber verschiedenen Stressbedingungen (Ramos et al., 1998; Abb. 9).

Erst kürzlich wurde gefunden, dass die Bildung des α -Ringes durch die Assemblierungshelfer Pac1 (*proteasome assembly chaperone*) Pac2, und Pac3 unterstützt wird (Hirano et al., 2005; Hirano et al., 2006).

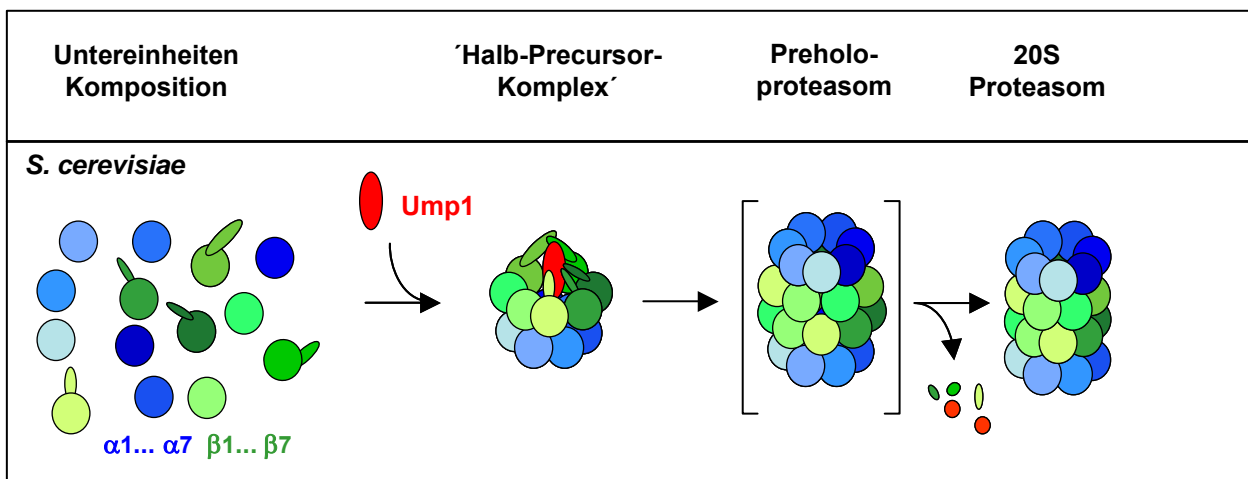


Abb. 9. Modell zur 20S Proteasomenbiogenese in der Hefe *S. cerevisiae*. Die koordinierte Assemblierung und Maturierung der sieben verschiedenen α - und der Proformen der sieben verschiedenen β -Untereinheiten in Eukaryoten bedarf der Assistenz des Helferproteins Ump1p. Dieses Protein existiert nur in Proteasomenvorläuferkomplexen, die den sogenannten Halb-Precursor-Komplex mit der Komposition $\alpha 1-7$, $\text{pro}\beta 1, 2, 5, 6, 7$ und $\beta 3-4$. Zwei dieser Komplexe dimerisieren UMP1p-vermittelt zu einem kurzlebigen Preholoproteasomintermediat, in dem die finale Reifung der β -Untereinheiten stattfindet. Im Zuge dieses Schrittes wird Ump1p das erste Substrat des neuformierten 20S Proteasoms.