

Aus dem Charité Centrum für Grundlagenmedizin CC2

Institut für Biochemie Campus Mitte

Direktor: Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel

Habilitationsschrift

Regulation der intrazellulären Homöostase von energieabhängigen Proteasesystemen

zur Erlangung der *venia legendi*

für das Fach

Biochemie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité Universitätsmedizin Berlin

von Frau Dr. rer. nat. Elke Krüger

Eingereicht: im April 2007

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

1.Gutachter Prof. Dieter Wolf

2.Gutachter Prof. Jörg Höfeld

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrags: 21. April 2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung
2.	Einleitung
2.1	ATP-abhängige Proteolyse in Pro- und Eukaryonten.....
2.2	Die Substratspezifität energieabhängiger Proteolysesysteme.....
2.3	Generelle Architektur ATP-abhängiger Proteasen in Pro- und Eukaryonten.....
2.4	Regulation energieabhängiger Proteolysesysteme in Pro- und Eukaryonten.....
2.4.1	Regulation der Genexpression von Proteasekomplexen.....
2.4.2	Biogenese des Proteasoms.....
3.	Ergebnisse und Diskussion
3.1	Regulation der Genexpression energieabhängiger Proteolysesysteme in Gram-positiven Bakterien und in Säugerzellen.....
3.2	Molekulare Mechanismen der Proteasomenbiogenese in Säugerzellen.....
3.2.1	Identifizierung und Charakterisierung des Ump1-homologen Proteasomenassemblierungshelfers POMP in Säugerzellen.....
3.2.2	Konformationsänderungen von β -Untereinheiten in Proteasomenvorläuferkomplexen sind notwendig für die finalen Assemblierungs- und Maturierungsschritte.....
3.2.3.	Die Immunadaptation des Proteasomensystems ist eine schnelle und transiente Antwort.....
3.3	Modulation der MHC Klasse I Antigenpräsentation an proteasomalen Untereinheiten durch Viren oder in Tumorzellen.....
3.3.1	Das HIV-Tat-Protein interagiert mit verschiedenen proteasomalen α - und β -Untereinheiten.....
3.3.2	Tumorzelllinien exprimieren die nichtfunktionelle Proteasomenuntereinheit LMP7_E1 und sind dadurch defizient für Immunoproteasomen.....
3.4	Übergreifende Diskussion und Ausblick.....
4.	Literaturverzeichnis
5.	Eidesstattliche Versicherung
6.	Danksagung

1. Zusammenfassung

Energieabhängige Proteolyse spielt eine Schlüsselrolle in der Zellphysiologie aller Organismen und dient der Gewährleistung der Proteinhomöostase der Zelle. 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 (Clp-) Proteasen entwickelt. Für die intrazelluläre Homöostase und Aktivität energieabhängiger Proteolysesysteme in Pro- und Eukaryonten ist eine strenge Kontrolle essentiell. 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.

In allen untersuchten Organismen wurden bisher autoregulatorische feedback-Mechanismen für die Genexpressionskontrolle ATP-abhängiger Proteolysesysteme gefunden. Im Gegensatz zur positiven Transkriptionskontrolle wie in *Escherichia coli* oder *Saccharomyces cerevisiae* wird die Regulation energieabhängiger Proteolysesysteme in Gram-positiven Bakterien der „low G+C branch“ negativ durch die differentielle Stabilität des CtsR Repressors reguliert. Durch eine Destabilisierung von CtsR unter Stressbedingungen ergibt sich ein negativer autoregulatorischer feedback-Mechanismus der ClpCP-vermittelten Proteolyse.

Ein komplexes und immer noch nicht vollständig verstandenes Biogeneseprogramm führt zur Bildung von konstitutiven (c20S) oder Immunoproteasomen (i20S). Die Vorgänge zur Biogenese des eukaryontischen 20S Proteasoms verlaufen in drei Hauptschritten, die die Biosynthese aller Untereinheiten, deren Assemblierung und Maturierung umfassen. Der erste Schritt ist die konzertierte Expression aller 7 verschiedenen α - und der Proformen 7 verschiedener β -Untereinheiten sowie von Helferproteinen. Säugerzellen sind in der Lage, ein Absenken der proteasomalen Enzymaktivität durch die Neuformation von Proteasomen in einem positiven autoregulatorischen feed-back Mechanismus zu kompensieren.

An der koordinierten Assemblierung und Prozessierung von Säugerproteasomen sind Helferproteine beteiligt. Die Assemblierung wird durch die Bildung eines heptameren α -Ringes mit Hilfe der nicht-essentiellen Assemblierungshelfer PAC1, Pac2 und Pac3 initiiert. Der α -Ring dient als Matrix für die sequentielle Bindung der Proformen der β -Untereinheiten, was in distinkten Assemblierungsintermediaten resultiert. Das Proteasom-Maturierungsprotein POMP ist essentiell für die koordinierte Rekrutierung und Prozessierung

der β -Untereinheiten, die über cis- und trans-Autokatalyse abgeschlossen wird. Zwei Hemiproteasom-Intermediate dimerisieren unter Konformationsänderungen zum Preholoproteasom-Intermediat, wo die finale Reifung unter Freisetzung der aktiven Zentren und die Degradation von POMP stattfindet (Abb. 1). Interferon- γ induziert POMP und die Immununtereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$, die nach einem prinzipiell gleichen Schema zu i20S assemblieren. Die Dynamik des Prozesses wird durch die schnelle Aktivierung von $\beta 5i$ /LMP7 und die sofortige $\beta 5i$ /LMP7-abhängige Degradation von POMP bestimmt. Infolge dieser molekularen Interaktionen ist die Biogenese von i20S etwa vierfach schneller als die

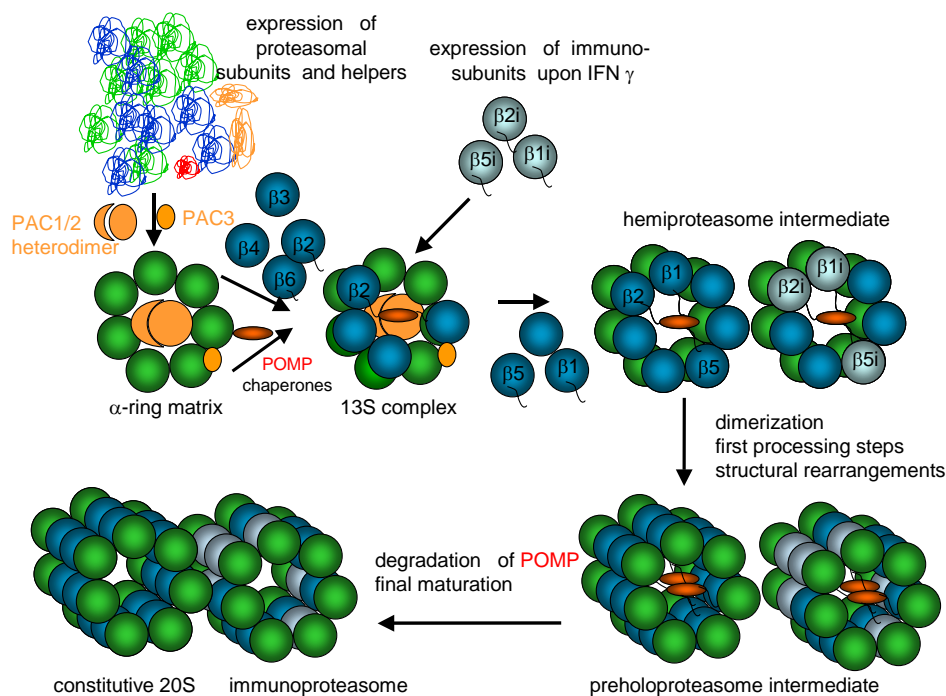


Abb. 1. Modell der Biogenese von c20S und i20S. Details siehe Text.

von c20S. i20S besitzen allerdings auch im Vergleich zu c20S eine wesentlich kürzere Halbwertszeit, so dass es sich bei der i20S Biogenese um eine transiente Antwort handelt. Diese schnelle Immunantwort erlaubt dem Immunsystem zum ursprünglichen Zustand zurückzukehren, sobald die Infektion vorüber ist.

Viren und maligne entartete Zellen haben Strategien entwickelt, um einer effizienten Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Dabei spielt die Manipulation der Antigengenerierung durch das Proteasomensystem eine wesentliche Rolle. So trägt die Blockierung der Proteasomenaktivität von HIV-Tat *in vivo* durch direkte Interaktion mit α - und β -Untereinheiten direkt zum *immune escape* des HI-Virus bei. Ein neuer Mechanismus, der zum Prozess der Onkogenese beiträgt, wurde für humane Tumorzelllinien beschrieben. Die preferentielle Expression der nichtfunktionellen $\beta 5i$ -Isoform LMP7_E1 in humanen Tumorzellen resultiert in $\beta 5i$ /LMP7-Mangel und daraus folgend in i20S-Defizienz. Beide Strategien interferieren damit mit der Assemblierung von i20S.

5. Eidstattliche Versicherung

ERKLÄRUNG

gemäß § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift

6. Danksagung

In erster Linie möchte ich meinen Lehrern danken, die mein Interesse für die Wissenschaft geweckt haben, ohne deren Diskussionsbereitschaft und Anregungen meine Karriere nie bis hierhin gekommen und die vorgelegte Habilitation nie entstanden wäre. Als ersten möchte ich dabei Prof. Dr. Friedrich Mach nennen, der mir die spannende Vielfalt der Mikroorganismenwelt eröffnet und mein Interesse an der Elektronenmikroskopie geprägt hat.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Hecker verdanke ich die mehr globale Sicht auf die Dinge. Er förderte mein Interesse an Molekularbiologie und an molekularen Details und lehrte mich dabei die Augen nicht vor der Funktionalität molekularer Mechanismen für die gesamte Zelle oder den Organismus in seiner Umwelt zu verschließen.

Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel, mein Mentor, ermöglichte mir zunächst einen kompletten Systemwechsel, indem er mich als Mikrobiologin in der medizinischen Biochemie in einem Projekt zur Proteasomenassemblierung in Säugerzellen beschäftigte. Ich bedanke mich herzlich für seinen Mut und dieses Vertrauen, für die hervorragende Ausstattung eines eigenen Projektlabors zum Teil inklusive Mitarbeitern und für die Freiheit Dinge zu untersuchen, die sich nicht immer unmittelbar mit seinen eigenen Projektinteressen deckten. Seine ständige Diskussionsbereitschaft hat sehr motiviert und die Projekte vorangebracht.

Ohne die Unterstützung und das Engagement meiner technischen Assistentin Daniela Ludwig wären die Projekte nie dort angekommen, wo sie jetzt sind. Für ihre exakte Arbeitsweise, ihre vorbildlich geführten Protokollbücher und Methodenkarteien, ihre Ideen und ihre unermüdliche Fehlersuche bei der Optimierung von Experimenten ein großes Dankeschön. Ebenfalls sei den beiden Assistentinnen Carola Beier und Elke Bürger für ihre hervorragende Arbeit gedankt, die sie während der Elternpausen von Daniela geleistet haben.

Meinen Doktoranden Elke Witt, Sylvia Heink, Dirk Heyken, Benjamin Fricke, Tobias Schwarz und Janos Steffen danke ich herzlich für ihr Engagement, zum Erfolg der Projekte beizutragen. Besonders hervorheben möchte ich dabei Sylvia Heink, die Ergebnisse zu 4 Publikationen beigesteuert und ihren Optimismus auf alle im Labor übertragen hat.

Den Projektgruppenleitern Ulrike Seifert, Ulrike Kuckelkorn, Michael Seeger, Burkhardt Dahmann, Katharina Janek, Cordula Enenkel und Peter Henklein sei gedankt für die unkonventionelle Bereitstellung von Materialien, Know-how und Analysen aller Art, unverzichtbare Tipps und Tricks, ihre Diskussions- und ihre Kooperationsbereitschaft sowie für Seminartausch oder -vertretung. Ein besonders lieber Dank geht an Ulrike Kuckelkorn und Evi Schwarzer, von deren Lehrerfahrung ich unheimlich profitieren konnte. Ich habe wahnsinnig viel gelernt von Euch.

Allen Mitarbeitern der AG Kloetzel danke ich etwas pauschal dafür aber umso herzlicher für die nette Arbeitsatmosphäre, viele fruchtbare Diskussionen, Anregungen und die unermüdliche Hilfsbereitschaft.

Zuletzt danke ich denen, die bei all dem Engagement für Forschung und Lehre immer wieder zu kurz gekommen sind und mir trotzdem den Rücken freigehalten und Verständnis für meinen Job aufgebracht haben, meiner Familie. Steffen danke ich für die Liebe und die Bereitschaft und Unterstützung, trotz des eigenen harten Jobs Beruf und Familie unter einen Hut zu bringen. Bei Vincent bedanke ich mich für die schönen Momente des Lebens und den emotionalen Ausgleich. Meine Eltern sind mir Vorbild gewesen und haben mich immer motiviert das zu tun, was ich für richtig halte. Ihnen und meinen Schwiegereltern einen lieben Dank für die immerwährende Bereitschaft auszuhelfen, wenn es irgendwo brennt.