

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Regulation der Genexpression energieabhängiger Proteolysesysteme in Gram-positiven Bakterien und in Säugerzellen

Im Gegensatz zur positiven Regulation der Genexpression durch σ^{32} in *E. coli* wird die Genexpression der ClpCP-Proteasekomponenten aus *B. subtilis* negativ durch den CtsR Repressor reguliert, d.h. CtsR verhindert eine starke Expression unter Kontrollbedingungen. Um eine verstärkte Transkription des *clpC*-Operons sowie der Gene *clpE* und *clpP* unter induzierenden Bedingungen wie Hitzeschock, Puromycinbehandlung, Ethanol- oder oxidativem Stress einzuleiten, muss CtsR inaktiviert werden (**Krüger et al., 1996; Krüger und Hecker, 1998; Derré et al., 1999**). Durch eine Destabilisierung unter Stressbedingungen wird CtsR Substrat der ClpCP Protease, was ebenfalls einen autoregulatorischen Mechanismus der ClpCP-vermittelten Proteolyse ergibt. Die differentielle Stabilität des Repressors ist neben der Protease ClpCP von zwei weiteren Proteinen, dem Zinkfingerprotein McsA und der potentiellen Kinase McsB, abhängig (**Krüger et al., 2001**). Diese Proteine agieren als Modulatoren der CtsR-Repression und werden wie CtsR selbst ebenfalls im *clpC* Operon codiert. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird CtsR von McsA geschützt und der Repressor bleibt stabil. Nach Stresseinfluss phosphoryliert McsB CtsR, der von seiner DNA-Bindungsstelle abgelöst und der Proteolyse durch ClpCP zugänglich wird. Die ClpCP Protease, die unter diesen Bedingungen die Akkumulation von stressinduziertem CtsR kontrolliert, wird für die Degradation fehlgefalteter Proteine benötigt, steht für die Degradation von CtsR nicht genügend zur Verfügung und das System kann wieder durch CtsR reprimiert werden (**Krüger et al., 2001**). Weiterführende Arbeiten haben diese Modelle bestätigt und erweitert sowie die direkte Interaktion der einzelnen Komponenten und die Bedeutung struktureller Domänen untersucht. Unter Kontrollbedingungen ist die Tyrosinkinase McsB durch das Zinkfingerprotein McsA gebunden, was die Inaktivierung von CtsR verhindert. McsB kann sich unter Stressbedingungen zunächst autophosphorylieren um dann McsA und CtsR zu phosphorylieren, was zur Ablösung des CtsR Repressors von seiner DNA-Bindungsstelle und letztendlich zur Degradation durch die ClpCP Protease führt. McsA und die Chaperonaktivität von ClpC werden für die Kinaseaktivität von McsB benötigt. Nach einem Hitzeschock wird ClpC durch entstehende denaturierte Proteine wegtitriert, sodass CtsR phosphoryliert und inaktiviert werden kann (Kirstein et al., 2005).

Aus den publizierten Daten zur Regulation der proteasomalen Genexpression in der Hefe *S. cerevisiae* ergab sich die Fragestellung, ob auch in Mammaliazellen die proteasomale Genexpression durch Proteasomeninhibition induzierbar ist. Die Auswirkung von Proteasomeninhibition wurde zwar hinsichtlich der Auslösung von Apoptose oder Hitzeschockantwort eingehend untersucht (Bush et al. 1997; Morimoto 1998), aber über die Konsequenzen auf die Proteasomenhomöostase in Säugerzellen war bis dahin nichts bekannt. Die verstärkte Expression einzelner proteasomaler Untereinheiten wie sie für verschiedene Krankheiten beschrieben wurde, hat keine Auswirkungen auf die intrazelluläre Proteolyse der Zellen. Dafür wäre eine konzertierte Regulation aller proteasomalen Untereinheiten und eine Neuf ormation aktiver Proteasomenkomplexe unbedingte Voraussetzung.

Deshalb untersuchten wir, ob sich eine Induktion proteasomaler Genexpression als zelluläre Antwort auf Proteasomeninhibition sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene nachweisen lässt. Dazu wurden primäre glatte Muskelzellen aus der Rattenkarotis und andere Säugerzellen mit nicht-toxischen Dosen der Proteasomeninhibitoren c-Lactacystin und MG132 sowie mit dem calpainspezifischen Inhibitor ALLM oder DMSO als Kontrollen behandelt. Primäre Säugerzellen beantworteten eine Inhibition der Proteasomenaktivität *in vivo* mit der verstärkten Expression von proteasomalen Untereinheiten und Biogenesefaktoren in einem konzertierten autoregulatorischen feed-back Mechanismus. In „real-time RT-PCR“ Experimenten konnten wir eine klare Zeit- und Konzentrationskinetik für die Expression proteasomaler Gene festlegen, die eindeutig transienten Charakter hat. Die Induktion der proteasomalen Genexpression verhielt sich proportional zum Grad der Inhibition der Enzymaktivität: je stärker die Inhibition des Enzyms desto höher die Stimulation der Genexpression. Die Möglichkeit der Regulation über Stabilisierung der mRNA konnten wir unter Benutzung von α -Amanitin als potenten Inhibitor der RNA-Polymerase II ausschließen. Damit deutet sich ein Regulationsmechanismus auf Ebene der Transkriptionsinitiation an, der einer Aktivierung der RNA-Polymerase II abhängigen Transkription unterliegt.

Die verstärkte Expression der Untereinheiten und der damals bekannten Helferproteine resultiert dann in einer gesteigerten Biogenese von Proteasomen. Damit sind die Zellen letztendlich in der Lage, ein Absenken der proteasomalen Enzymaktivität durch die Neuf ormation von Proteasomenkomplexen zu kompensieren. Interessanterweise war die Expression von Immununtereinheiten und PA28 nicht betroffen. Diese Ergebnisse stellen das völlig neue Gesamtbild einer geordneten Induktion der proteasomalen Genexpression aller 26S Untereinheiten in Mammaliazellen dar, die sich auf Komponenten des Standardproteasoms beschränkt (**Meiners et al., 2003**).

Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor

Elke Krüger,¹ Daniela Zühlke,² Elke Witt, Holger Ludwig,³ and Michael Hecker²

Institut für Biochemie, Humboldt Universität, Universitätsklinikum Charité, Monbijoustrasse 2, D-10117 Berlin, ²Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Jahnstrasse 15, D-17487 Greifswald and ³Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Erlangen, Staudtstrasse 5, D-91058 Erlangen, Germany ¹Corresponding author e-mail: elke.krueger@charite.de

Received August 22, 2000; Revised December 19, 2000; Accepted December 22, 2000.

Abstract

The heat shock proteins ClpC and ClpP are subunits of an ATP-dependent protease of *Bacillus subtilis*. Under non-stressed conditions, transcription of the *clpC* and *clpP* genes is negatively regulated by CtsR, the global repressor of *clp* gene expression. Here, CtsR was proven to be a specific substrate of the ClpCP protease under stress conditions. Two proteins of former unknown function, McsA and McsB, which are also encoded by the *clpC* operon, act as modulators of CtsR repression. McsA containing zinc finger motifs stabilizes CtsR under non-stressed conditions. McsB, a putative kinase, can inactivate CtsR by modification to remove the repressor from the DNA and to target CtsR for degradation by the ClpCP protease during stress. Thus, *clp* gene expression in Gram-positive bacteria is autoregulated by a novel mechanism of controlled proteolysis, a circuit of down-regulation by stabilization and protection of a transcription repressor, and induction by presenting the repressor to the protease. Thereby, the ClpC ATPase, a member of the Hsp100 family, was identified as a positive regulator of the heat shock response.

Keywords: *Bacillus subtilis*/ClpCP protease/heat shock/Hsp100/proteolysis

Originally published In Press as [doi:10.1074/jbc.M301032200](https://doi.org/10.1074/jbc.M301032200) on April 3, 2003

J. Biol. Chem., Vol. 278, Issue 24, 21517-21525, June 13, 2003

Inhibition of Proteasome Activity Induces Concerted Expression of Proteasome Genes and *de Novo* Formation of Mammalian Proteasomes*

Silke Meiners[†], Dirk Heyken[§], Andrea Weller[†], Antje Ludwig[†], Karl Stangl[†], Peter-M. Kloetzel[§] and Elke Krüger^{§¶}

From the [§]Humboldt Universität zu Berlin, Universitätsklinikum Charité, Institut für Biochemie, 10117 Berlin, Germany, [†]Medizinische Klinik und Poliklinik, Kardiologie, Angiologie, Pneumologie, 10117 Berlin, Germany

Received for publication, January 30, 2003, and in revised form, March 24, 2003.

ABSTRACT

The 26 S proteasome is a high molecular mass proteinase complex that is built by at least 32 different protein subunits. Such protease complexes in bacteria and yeast are systems that undergo a highly sophisticated network of gene expression regulation. However, regulation of mammalian proteasome gene expression has been neglected so far as a possible control mechanism for the amount of proteasomes in the cell. Here, we show that treatment of cells with proteasome inhibitors and the concomitant impairment of proteasomal enzyme activity induce a transient and concerted up-regulation of all mammalian 26 S proteasome subunit mRNAs. Proteasome inhibition in combination with inhibition of transcription revealed that the observed up-regulation is mediated by coordinated transcriptional activation of the proteasome genes and not by post-transcriptional events. Our experiments also demonstrate that inhibitor-induced proteasome gene activation results in enhanced *de novo* protein synthesis of all subunits and in increased *de novo* formation of proteasomes. This phenomenon is accompanied by enhanced expression of the proteasome maturation factor POMP. Thus, our experiments present the first evidence that the amount of proteasomes in mammalia is regulated at the transcriptional level and that there exists an autoregulatory feedback mechanism that allows the compensation of reduced proteasome activity.

3.2 Molekulare Mechanismen der Proteasomenbiogenese in Säugerzellen

3.2.1 Identifizierung und Charakterisierung des Ump1-homologen Proteasomenassemblierungshelfers POMP in Säugerzellen

Die intrazelluläre Homöostase von eukaryontischen 26S Proteasomen kann sowohl über Genexpression als auch über den Einbau und die Aktivierungskinetik ihrer aktiven β -Untereinheiten reguliert werden. Eine effiziente Proteasomenbiogenese in Eukaryonten erfordert jedoch Helferproteine wie Ump1. Die Identifizierung von Ump1 als wichtigen Faktor für die 20S Proteasomenbildung in Hefe legte nahe, dass ähnliche Helferproteine für die noch komplexeren 20S Proteasomensysteme in Säugern existieren müssen. Tatsächlich fand man schon viel früher bei der Charakterisierung von Proteasomprecursor-Komplexen aus Säugerzellen ein kleines, etwa 16kDa großes akzessorisches Protein, das mit den damaligen Möglichkeiten nicht identifiziert werden konnte (Frentzel et al., 1994; Nandi et al., 1997). Weiterhin wurden cytosolische Chaperone der Hsp70-Familie mit Precursor-Komplexen assoziiert gefunden, die die korrekte Faltung der Assemblierungsintermediate vermitteln und die Prozessierung der β -Proformen gewährleisten sollen (Schmidtke et al., 1997).

Zeitgleich sind dann auch Ump1-homologe Maturierungshelfer von verschiedenen Gruppen für Mammalia beschrieben worden und unter den Bezeichnungen POMP („proteasome maturation protein“: **Witt et al., 2000**), Proteasassemblin (Griffin et al., 2000) sowie h/mUMP (human/mouse UMP: Burri et al., 2000) in die Literatur eingegangen.

Durch eine 2D-Gelanalyse von 16S Proteasomvorläuferkomplexen konnte das humane Maturierungsprotein POMP identifiziert und charakterisiert werden. Datenbankvergleiche ergaben, dass diese Faktoren durch alle eukaryontischen Organismenreiche hinweg konserviert vorliegen. Während Maturierungsfaktoren von Säugern mit ca. 90% Identität stark konserviert sind, ähnelt das Hefe-Homolog UMP1 den Mammalia Proteinen mit max. 30% nur schwach (Burri et al., 2000; Griffin et al., 2000; **Witt et al., 2000**). Infolge der schwachen Homologie von Hefe Ump1p und POMP sind die beiden Faktoren nicht funktionell austauschbar (Burri et al., 2000). Analog zu seinem Hefehomolog ist POMP ausschließlich Bestandteil von Assemblierungsintermediaten mit β -Proteinen und kann nicht in reifen 20S-Proteasomen detektiert werden. POMP-Faktoren sind kurzlebig und werden durch die Inaktivierung von $\beta 5i/LMP7$ stabilisiert. Es wird auch für höhere Eukaryoten angenommen, dass POMP-ähnliche Faktoren an die Prosequenzen der Immununtereinheiten binden könnten. Da die Prosequenzen von konstitutiven und Immununtereinheiten jedoch nicht so stark konserviert sind, wie die Sequenzen der reifen Untereinheiten, könnte sich daraus ein

Erklärung ableiten, warum die POMP-Homologe in Hefe und Vertebraten so unterschiedlich sind. Allerdings stand der Beweis, dass POMP wirklich an die Prosequenzen von konstitutiven bzw. Immununtereinheiten bindet, für Säugerproteasomen noch aus. Im humanen System scheint zumindest die Prosequenz von $\beta 5i$ (LMP7) entbehrlich für die Interaktion von POMP mit proteasomalen Precursorkomplexen zu sein (**Witt et al., 2000**).

POMP wird in allen untersuchten Geweben in wenigstens zwei verschiedenen mRNA Spezies in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert (Griffin et al., 2000; Heyken und Krüger, unveröffentlicht). Interessanterweise unterliegt POMP einer differentiellen Genexpression und zeigt erhöhte mRNA Mengen nach IFN- γ Behandlung. Dieser Befund unterstützte die Idee, dass POMP eine entscheidende Rolle bei der Neuformation von i20S spielt (Burri et al., 2000; **Witt et al., 2000; Krüger et al., 2001; Krüger et al., 2003** zur Übersicht).

3.2.2. Konformationsänderungen von β -Untereinheiten in Proteasomenvorläuferkomplexen sind notwendig für die finalen Assemblierungs- und Maturierungsschritte

Aus biochemischen Analysen zur Proteasomenassemblierung in verschiedenen Spezies war bekannt, dass die Assemblierung über distinkte Vorläuferkomplexe sequentiell verläuft. Zu Beginn der Arbeiten waren der α -Ring, der 13S und der 16S Precursorkomplex sowie das Preholoproteasom relativ gut biochemisch charakterisiert (Frentzel et al., 1994; Mayr et al., 1998; **Krüger et al., 2003**; Heinemeyer et al., 2004 zur Übersicht). Strukturelle Analysen zu kurzlebigen Proteasomenvorläuferkomplexen waren und sind jedoch limitiert und bisher nur von archaebakteriellen Systemen verfügbar. Erstmals wurde 2003 eine genauere Charakterisierung von Proteasomenvorläuferkomplexen durch Röntgenstrukturanalysen für den α -Ring sowie für das sogenannte Preholoproteasom - das letzte Intermediat vor der finalen Reifung – publiziert. Anhand dieser archaebakteriellen Modelle konnten für die finale Reifung Konformationsänderungen in den β -Ringen postuliert werden, da die Grenzflächen zwischen beiden β -Ringen im Assemblierungsintermediat deutlich aufgelockerter und unstrukturiert erscheinen (Groll et al., 2003).

Für die strukturelle Analyse eines früheren Vorläuferintermediates von 20S Proteasomen aus *Archaeoglobus fulgidus* konnten wir den Assemblierungsprozess durch eine Fusion der Prosequenz der humanen $\beta 5$ Untereinheit mit der archaebakteriellen β Untereinheit im 16S Stadium arretieren. Diese chimäre β -Untereinheit ist unabhängig von der Länge ihrer Prosequenz nicht mehr in der Lage die für Aktivierung notwendige Autokatalyse durchzuführen. Die strukturelle Charakterisierung dieses 16S Komplexes mit Elektronenmikroskopie und Einzelpartikelanalyse ergab einen Dopperring-Komplex aus sieben α -Untereinheiten und sieben β -Untereinheiten in ihrer Proform. Die Konformation des β -Rings im 16S Precursor unterscheidet sich jedoch im Vergleich zur Struktur eines halben

20S Komplex. Eine Rotation der einzelnen β -Untereinheiten an ihren Interringkontaktpunkten um 28° bringt die Struktur des 16S Precursor-Komplexes mit der des halben 20S Proteasoms zur Deckung. Im 16S Stadium ist dabei eine Domäne der Helix 2 mehr zu den α -Ringen hin gerichtet, die im reifen 20S Proteasom mehr zur inneren Kammer exponiert ist. Da sich diese Domäne in unmittelbarer Nähe zum aktiven Threonin befindet bedeutet das, dass bei der Bildung des 20S Komplexes das aktive Threonin der β -Untereinheiten von einer geschützten Position an der inneren Wand während der autokatalytischen Aktivierung der „active sites“ zu einer mehr exponierten Position nach oben rotieren muss (Mullapudi et al., 2004). Diese Befunde leisten erstmalig einen strukturellen Beitrag zum molekularen Verständnis der Prozesse, die während der autokatalytischen Aktivierung proteasomaler β -Untereinheiten stattfinden. Mittlerweile wurden unsere Ergebnisse unabhängig durch die Kristallstruktur eines Hemiproteasomvorläuferkomplexes aus *Rhodococcus erythropolis* bestätigt (Witt et al., 2006).

Aus unseren und den von anderen Gruppen publizierten Daten ließ sich das folgende Assemblierungsmodell für 20S Proteasomen in Säugerzellen ableiten.

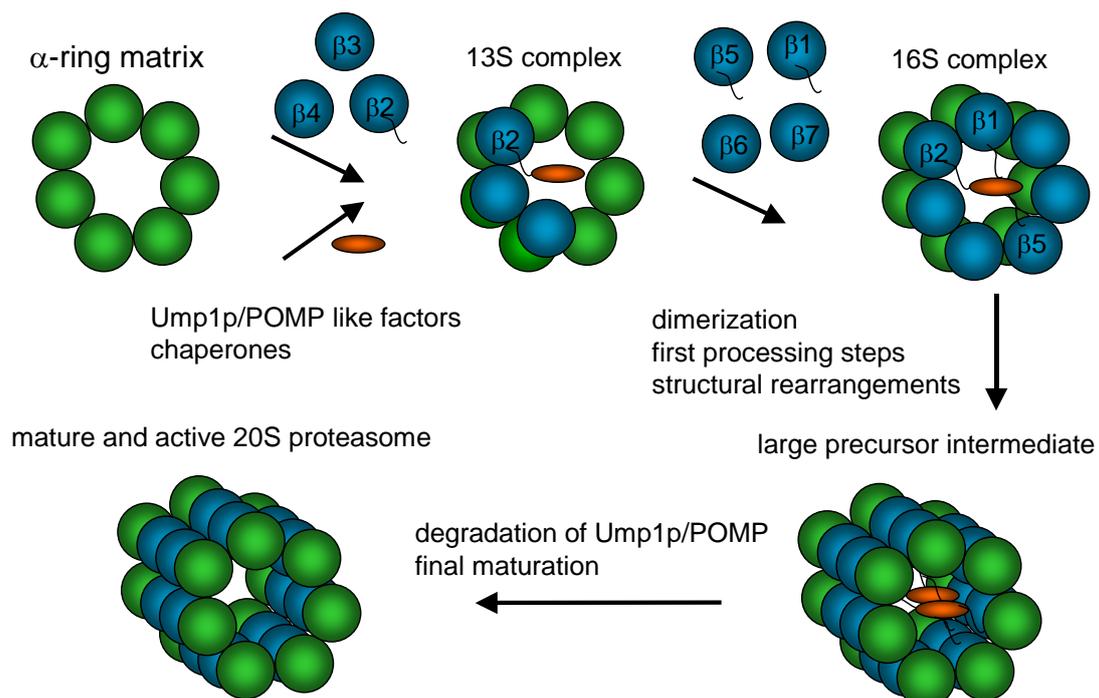


Abb. 10. Modell der Biogenese von 20S Proteasomen in Säugerzellen. Der α -Ring dient als Matrix für die sequentielle Anlagerung der β -Untereinheiten. Zunächst bildet das sogenannte 13S Intermediat unter der Assistenz von POMP mit α 1-7, β 3, β 4 und pro β 2. Dann resultiert der Einbau der Proformen von β 1, β 5, β 6 und β 7 im 16S Komplex, wo erste Prozessierungsschritte und Konformationsänderungen stattfinden. Nach Dimerisierung von zwei 16S Intermediaten wird in einem großen Vorläuferintermediat die finale Prozessierung und der Abbau von POMP abgeschlossen, was letztendlich zu reifen und aktiven 20S Proteasomen führt.

doi:10.1006/jmbi.2000.3959

Copyright © 2000 Academic Press. All rights reserved.

Journal of Molecular Biology, Volume 301, Issue 1, 4 August 2000, Pages 1-9
Communication

Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(β 5i) incorporation into 20 S proteasomes¹

Elke Witt¹, Daniela Zantopf¹, Marion Schmidt¹, Regine Kraft², Peter-M. Kloetzel¹ and Elke Krüger¹

¹ Institut für Biochemie Charité-Humboldt University Medical School, Monbijoustr.2 10117, Berlin, Germany

² Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Proteinchemie, Robert-Rössle-Str. 10, 13092, Berlin, Germany

Received 6 April 2000; revised 9 June 2000; accepted 9 June 2000. ; Available online 18 April 2002.

Abstract

Biogenesis of mammalian 20 S proteasomes occurs *via* precursor complexes containing α and unprocessed β subunits. A human homologue of the yeast proteasome maturation factor Ump1 was identified in 2D gels of 16 S precursor preparations and designated as POMP (proteasome maturation protein). We show that POMP is detected only in precursor fractions and not in fractions containing mature 20 S proteasome. Northern blot experiments revealed that expression of POMP is induced after treatment with interferon γ . To analyse the role of the β 5 propeptide for proper maturation and incorporation of the β 5 subunit into the complex, human T2 cells, which highly express derivatives of the β 5i subunit (LMP7), were studied. In contrast to yeast, the presence of the β 5 propeptide is not essential for incorporation of LMP7 into the proteasome complex. Mutated LMP7 subunits either carrying the prosequence of β 2i (LMP2) or containing a mutation in the active threonine site are incorporated like wild-type LMP7, while a LMP7 derivative lacking the prosequence completely is incorporated to a lesser extent. Although the absence of the prosequence does not affect incorporation of LMP7, its deletion leads to delayed proteasome maturation and thereby to an accumulation of precursor complexes. As a result of the precursor accumulation, an increased amount of the POMP protein can be detected in these cells.

Rearrangement of the 16S Precursor Subunits Is Essential for the Formation of the Active 20S Proteasome

Srinivas Mullanpudi,^{*} Lee Pullan,^{*} Ozlem T. Bishop,^{*} Hassan Khalil,^{*} James K. Stoops,[†] Roland Beckmann,[‡] Peter M. Klotzel,[‡] Elke Krüger,[‡] and Pawel A. Penczek^{*}

^{*}Department of Biochemistry and Molecular Biology, and [†]Department of Pathology, The University of Texas-Houston Medical School, Houston, Texas 77030 USA; and [‡]Institut für Biochemie, Charité Universitätsmedizin, 10117 Berlin, Germany

Address reprint requests to P. A. Penczek, E-mail: pawel.a.penczek@uth.tmc.edu

Received August 5, 2004; Accepted August 27, 2004.

Abstract

Proteasome-dependent proteolysis is essential for a number of key cellular processes and requires a sophisticated biogenesis pathway to function. Here, we have arrested the assembly process in its dynamic progression at the short-lived 16S state. Structural analysis of the 16S proteasome precursor intermediates by electron microscopy, and single particle analysis reveals major conformational changes in the structure of the β -ring in comparison with one-half of the 20S proteasome. The individual β -subunits in the 16S precursor complex rotate with respect to their positions in the x-ray crystallographic structure of the fully assembled 20S. This rearrangement results in a movement of the catalytic residue threonine-1 from the protected location in 16S precursor complexes to a more exposed position in the 20S structure. Thereby, our findings provide a molecular explanation for the structural rearrangements necessary for the dimerization of two 16S precursor complexes and the subsequent final maturation to active 20S proteasomes.

3.2.3. Die Immunadaptation des Proteasomensystems ist eine schnelle und transiente Antwort

Die Verfügbarkeit proteasomal generierter Peptide ist geschwindigkeitsbestimmend für die MHC Klasse I Antigenpräsentation. Eine effiziente Prozessierung von MHC I-präsentierten Antigenen und damit eine effektive Immunabwehr gegen infizierte oder maligne entartete Zellen durch cytotoxische T-Zellen wird durch i20S unterstützt. Deshalb trägt eine schnelle und effiziente Neuformation von i20S wesentlich zu einer schnellen Anpassung des Immunsystems bei Virusinfektionen bei. Unsere Arbeiten zeigen erstmalig, dass sich die Biogenese von konstitutiven bzw. Immunproteasomen hinsichtlich der Maturierungskinetik unterscheidet. Das molekulare Zusammenspiel von POMP mit der Immununtereinheit $\beta 5i$ /LMP7 nimmt eine Schlüsselposition während dieser Immunadaptation ein. Eine IFN- γ -induzierte Neusynthese von POMP und LMP7 führt zur bevorzugten Rekrutierung von LMP7 (gegenüber der konstitutiven $\beta 5$ Untereinheit) durch POMP in den nasszierenden Komplex über eine direkte, physikalische Interaktion beider Partner. Die Dynamik des Prozesses wird durch die schnelle Aktivierung von LMP7 und die sofortige LMP7-abhängige Degradation von POMP bestimmt. Infolge dieser molekularen Interaktionen ist die Biogenese von i20S etwa vierfach schneller als die der c20S. i20S besitzen allerdings auch im Vergleich zu c20S eine wesentlich kürzere Halbwertszeit, so dass es sich bei der i20S Biogenese nicht nur um eine schnelle, sondern auch um eine transiente Antwort handelt. Dieser Regelkreis erlaubt es dem Immunsystem zum ursprünglichen Zustand zurückzukehren, sobald die Infektion vorüber ist (**Heink et al., 2005**; Abb. 11).

POMP kann über eine spezifische Interaktion sowohl mit den Propeptiden als auch mit den maturierten Proteinabschnitten beide $\beta 5$ -Untereinheiten ($\beta 5$ und $\beta 5i$) in nasszierende Proteasomenkomplexe rekrutieren. Über siRNA-Experimente konnten wir zeigen, dass eine Depletion von POMP aus dem System zu einer verminderten Bildung von sowohl c20S als auch i20S und damit verbunden zu Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten, zur verminderten MHC I Expression auf der Zelloberfläche und letztendlich zum Zelltod führt. Daraus folgt, dass - im Gegensatz zu Hefe Ump1p - POMP in Säugerzellen ein essentielles Protein ist (**Heink et al., 2005**).

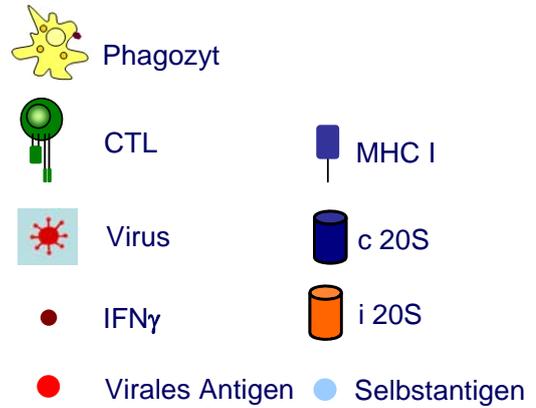
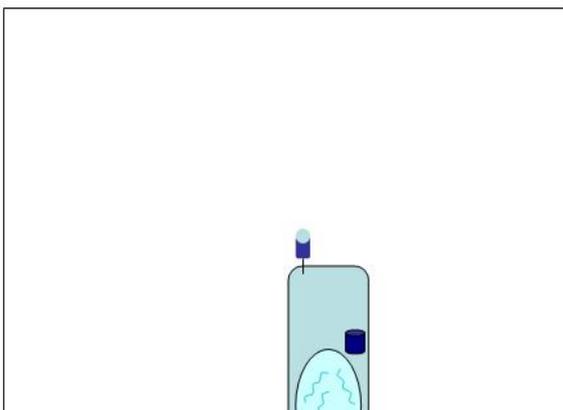
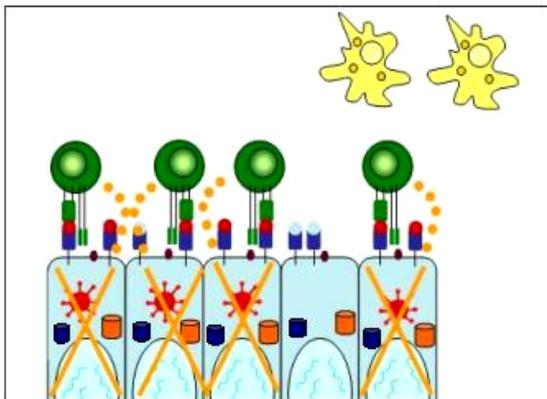
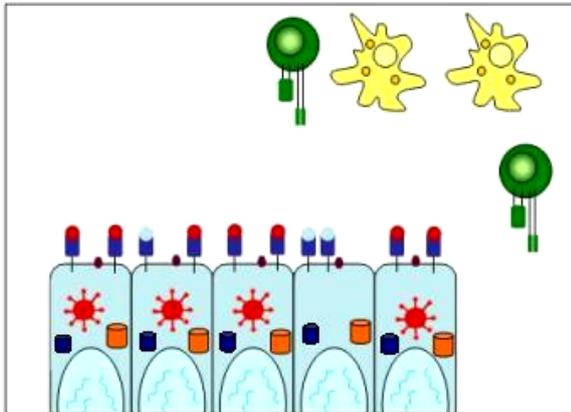
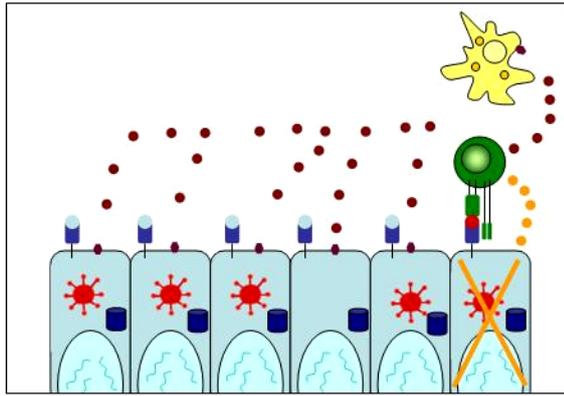


Abb. 11. Ablauf einer Virusinfektion und die Rolle von i20S.

Eine virusinfizierte Zelle wird durch einen CTL erkannt und eliminiert. Gleichzeitig produziert der CTL IFN- γ , das stimulatorisch auf benachbarte Zielzellen aber auch Phagozyten wirkt. IFN- γ induziert die schnelle Bildung von i20S und damit die schnelle Präsentation von viralen Epitopen auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen. Von MHC Klasse I Komplexen präsentierte virale Epitope werden von weiteren CTLs erkannt und eliminiert. Nicht infizierte Zellen überleben. Dieser Regelkreis erlaubt es dem Immunsystem zum ursprünglichen Zustand zurückzukehren, sobald die Infektion vorüber ist.

IFN- γ -induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response

Sylvia Heink,^{*} Daniela Ludwig, Peter-M. Kloetzel, and Elke Krüger[†]

Institute of Biochemistry, Charité-Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany

[†] To whom correspondence should be addressed. E-mail: elke.krueger@charite.de

^{*}Present address: Institute of Immunology, Friedrich-Schiller University, 07740 Jena, Germany.

Edited by Peter Cresswell, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, and approved May 5, 2005

Received March 2, 2005.

Abstract

Peptide generation by the proteasome is rate-limiting in MHC class I-restricted antigen presentation in response to IFN- γ . IFN- γ -induced *de novo* formation of immunoproteasomes, therefore, essentially supports the rapid adjustment of the mammalian immune system. Here, we report that the molecular interplay between the proteasome maturation protein (POMP) and the proteasomal $\beta 5i$ subunit low molecular weight protein 7 (LMP7) has a key position in this immune adaptive program. IFN- γ -induced coincident biosynthesis of POMP and LMP7 and their direct interaction essentially accelerate immunoproteasome biogenesis compared with constitutive 20S proteasome assembly. The dynamics of this process is determined by rapid LMP7 activation and the immediate LMP7-dependent degradation of POMP. Silencing of POMP expression impairs recruitment of both $\beta 5$ subunits into the proteasome complex, resulting in decreased proteasome activity, reduced MHC class I surface expression, and induction of apoptosis. Furthermore, our data reveal that immunoproteasomes exhibit a considerably shortened half-life, compared with constitutive proteasomes. In consequence, our studies demonstrate that the cytokine-induced rapid immune adaptation of the proteasome system is a tightly regulated and transient response allowing cells to return rapidly to a normal situation once immunoproteasome function is no longer required.

3.3 Modulation der MHC Klasse I Antigenpräsentation an proteasomalen Untereinheiten durch Viren oder in Tumorzellen

Viren und maligne entartete Zellen haben zahlreiche Strategien entwickelt, um einer effizienten Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen (Ehrlich, 1997 zur Übersicht). Ein häufig beobachteter Mechanismus ist die Manipulation von Komponenten der MHC Klasse I Antigenpräsentationsmaschinerie inklusive des Proteasomensystems.

3.3.1. Das HIV-Tat-Protein interagiert mit verschiedenen proteasomalen α - und β -Untereinheiten

Das Proteasomensystem spielt eine wichtige Rolle in der MHC Klasse I-restringierten Antigenpräsentation. Über diesen Weg werden antigene Peptide von Virusproteinen auf MHC I-Komplexen an der Zelloberfläche spezifischen CTLs präsentiert, die dann die virusinfizierte Zelle eliminieren können. Viele Viren haben Strategien entwickelt, wie sie sich einer effizienten Eliminierung durch das Immunsystem entziehen können. Dabei spielt die Manipulation der Antigenengenerierung durch das Proteasomensystem durch Virusproteine eine wesentliche Rolle.

Das humane HI-Virus-1 (*Human immunodeficiency virus*), der Erreger von AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) ist ein Lehrbuchbeispiel für verschiedene Strategien, dem Immunsystem zu entkommen. HIV-1 Tat, ein viraler Transaktivator der Transkription, kann die Immunantwort gegen HIV-1 direkt auf verschiedenen Ebenen manipulieren (Gallo, 2002 zur Übersicht). So konnte gezeigt werden, dass HIV-Tat an Proteasomen binden kann und die proteasomale Antigenprozessierung durch Konkurrenz mit PA28 negativ beeinflusst (Seeger et al., 1997; Huang et al., 2002).

Von den bisherigen Studien blieben jedoch die Untereinheiten, mit denen Tat direkt interagiert, weitgehend unklar. Über Interaktionsstudien mit Hilfe eines *in vitro* Expressionssystems konnten wir zeigen, dass HIV-Tat spezifisch mit $\alpha 4$ und $\alpha 7$ interagiert. Das würde auch die effiziente Konkurrenz von PA28 am 20S Proteasomenkomplex erklären. Weiterhin interagierte Tat überraschenderweise mit 6 β -Untereinheiten des 20S (alle außer $\beta 4$) sowie mit den Immununtereinheiten $\beta 2i$ /Mecl1 und $\beta 5i$ /LMP7. Die Interaktionen von Tat mit den β -Untereinheiten konnte *in vivo* bestätigt werden und führten zu einer Inhibition der proteasomalen Aktivität. Die Blockierung der Proteasomenaktivität *in vivo* trägt somit direkt zum *immune escape* des Virus bei (Apcher et al., 2003).

In weiterführenden Arbeiten konnten wir feststellen, dass die Interaktion von Tat mit $\beta 5i$ /LMP7 zur Verdrängung der Immununtereinheit aus dem nassierenden 20S Komplex führt. Damit haben wir erstmalig ein Beispiel in der Hand, bei dem Virusinterferenz mit dem Immunsystem direkt auf Ebene der Proteasomenbiogenese funktioniert.

Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal α and β subunits

Edited by Hans-Dieter Klenk

G. Sébastien Apcher^{a, b, c}, Sylvia Heink^a, Daniela Zantopf^a, Peter-M. Kloetzel^a, Hans-P. Schmid^c, R. John Mayer^b and Elke Krüger^a

^a Humboldt Universität zu Berlin, Universitätsklinikum Charité, Institut für Biochemie, Monbijoustr. 2, 10117, Berlin, Germany

^b Laboratory of Intracellular Proteolysis, School of Biomedical Sciences, University of Nottingham Medical School, Queen's Medical Centre, Nottingham NG7 2UH, UK

^c ERTAC, Université Blaise Pascal, Campus des Cezeaux, 24 Avenue des Landais, 63177, Aubiere Cedex, France

Received 23 June 2003; revised 11 August 2003; accepted 8 September 2003. ;

Available online 19 September 2003.

Abstract

The human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) Tat protein was previously reported to compete the association of PA28 regulator with the α rings of the 20S proteasome and to inhibit its peptidase activity. However, the distinct interaction sites within the proteasome complex remained to be determined. Here we show that HIV-1 Tat binds to $\alpha 4$ and $\alpha 7$, six β subunits of the constitutive 20S proteasome and the interferon- γ -inducible subunits $\beta 2i$ and $\beta 5i$. A Tat-proteasome interaction can also be demonstrated in vivo and leads to inhibition of proteasomal activity. This indicates that Tat can modulate or interfere with cellular proteasome function by specific interaction with distinct proteasomal subunits.

3.3.2. Tumorzelllinien exprimieren die nichtfunktionelle Proteasomenuntereinheit LMP7_E1 und sind dadurch defizient für Immunoproteasomen

Eine veränderte oder verminderte Oberflächenexpression von beladenen MHC I-Molekülen auf Zellen trägt wesentlich zum Prozess der Onkogenese bei und wird als Hauptmechanismus angesehen, der Tumorzellen befähigt sich der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen. Viele maligne Tumorzellen sind durch den Verlust oder die Herunterregulation von Komponenten der Antigenpresentationsmaschine wie die TAP-Transporter, MHC I selbst oder das i20S insbesondere der β 5i/LMP7-Untereinheit gekennzeichnet. Das humane PSMB8-Gen kodiert durch unterschiedliche Nutzung der ersten beiden Exons für zwei verschiedene Isoformen der β 5i/LMP7 Untereinheit, die deshalb LMP7_E1 bzw. LMP7_E2 genannt werden. Während der Einbau des vorherrschenden PSMB8-Genprodukts LMP7_E2 in Proteasomenkomplexe zu funktionellen i20S führt, wird LMP7_E1 nicht in 20S Komplexe inkorporiert und ist damit nicht funktionell (Fruh et al., 1992).

In unseren Arbeiten konnten wir zeigen, dass humane Tumorzelllinien die nichtfunktionelle Isoform LMP7_E1 zusätzlich zu oder anstelle von LMP7_E2 nach IFN- γ -Stimulation exprimieren. LMP7_E1 unterscheidet sich von LMP7_E2 nur in seiner Prosequenz. Interessanterweise, war in allen von uns getesteten Tumorzelllinien die LMP7_E1 Variante eindeutig nachzuweisen, während wir in primären Zellen ausschließlich funktionelles LMP7_E2 detektieren konnten. Die preferentielle Expression von LMP7_E1 in der humanen Coloncarzinom-Zelllinie RKO resultiert in einer Herunterregulation von LMP7_E2. Dadurch waren diese Zellen nicht mehr in der Lage i20S zu bilden. Eine molekulare Erklärung für dieses Phänomen lieferte der Befund, dass LMP7_E1 nicht effizient mit POMP interagieren kann und deshalb nicht in nasszierende i20S Komplexe rekrutiert wird. Im Gegensatz zu früher publizierten Arbeiten konnte die Bildung von i20S in solchen Tumorzellen nicht durch Stimulation mit IFN- γ wiederhergestellt werden. Nach Transfektion von preferentiell LMP7_E1 exprimierenden Zellen mit funktionellem LMP7_E2 setzte jedoch die Bildung von i20S wieder ein. Unsere Daten beschreiben damit erstmalig einen neuen Mechanismus, der zum Prozess der Onkogenese beiträgt (**Heink et al., 2006**).

Priority Reports

Tumor Cell Lines Expressing the Proteasome Subunit Isoform LMP7E1 Exhibit Immunoproteasome Deficiency

Sylvia Heink, Benjamin Fricke, Daniela Ludwig, Peter-M. Kloetzel and Elke Krüger

Institute of Biochemistry, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Requests for reprints: Elke Krüger, Institut für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, CCM, Monbijoustrasse 2, 10117 Berlin, Germany. Phone: 49-30-450-528186; Fax: 49-30-450-528921; E-mail: elke.krueger@charite.de

The immune system can recognize antigenic peptides derived from tumors by their presentation on MHC class I complexes to CTLs. Immunoproteasomes (i20S) can substantially enhance the MHC class I peptide repertoire, making down-regulation of i20S an important strategy of tumor cells in manipulating immune surveillance. Here, we report that human cancer cells express the nonfunctional immunosubunit-variant LMP7E1, in addition to, or instead of LMP7E2, in response to IFN- γ . This preferential expression of LMP7E1 and the consequent down-regulation of LMP7E2 results in i20S deficiency. The molecular explanation for this phenomenon is the incapacity of LMP7E1 to interact efficiently with the proteasome maturation protein, which regularly recruits LMP7E2 into nascent i20S precursor complexes. In contrast to previous reports, i20S formation in these cancer cells cannot be restored by IFN- γ treatment. However, expression of LMP7E2 in these cells restores the i20S-deficient phenotype. Thus, our data describe a novel mechanism that contributes to the process of oncogenesis.

3.4 Übergreifende Diskussion und Ausblick

Energieabhängige Proteolysesysteme gewährleisten zusammen mit klassischen Chaperonsystemen in allen Organismen die entscheidende Balance zwischen Proteinbiosynthese, korrekter Proteinfaltung und Proteinabbau. Ein Auslenken dieses empfindlichen Gleichgewichts würde zur Akkumulation fehlgefalteter und damit funktionsuntüchtiger Proteine führen, kann aber auch die Verfügbarkeit kurzlebiger in der Regel regulatorisch wirksamer Proteine beeinflussen. Bis zu einer individuellen Grenze können Zellen solche Ungleichgewichte in der Proteinhomöostase tolerieren. Geht die Akkumulation nicht funktioneller Proteine in einer Zelle über diese Grenze hinaus, kommt es zu massiven, irreversiblen Schäden und ultimativ zum Zelltod. Ungleichgewichte in der Proteinhomöostase werden als Ursache aber auch als Folge einer Vielzahl von Erkrankungen diskutiert. Als Beispiele seien hier neurodegenerative Erkrankungen oder Tumorentstehung genannt. Ein detailliertes Wissen über die molekularen Vorgänge zur Regulation energieabhängiger Proteolysesysteme ist deshalb unabdingbar für die Entwicklung von neuen Therapeutika.

Eine strenge Regulation der proteolytischen Aktivität ATP-abhängiger Proteolysesysteme ist somit für pro- und eukaryontische Zellen überlebenswichtig. Die Genexpressionskontrolle energieabhängiger Proteolysesysteme in *E. coli* durch einen positiven, autoregulatorischen feed-back Mechanismus war zu Beginn der Arbeiten zu dieser Habilitationsschrift bis hin zu molekularen Details bereits intensiv untersucht und verstanden. Über die Regulation energieabhängiger Proteolysesysteme in Gram-positiven Bakterien, war jedoch weitaus weniger bekannt. Unsere Arbeiten zur Regulation der Clp-Proteasen in *B. subtilis* leisten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Genexpressionskontrolle energieabhängiger Proteolysesysteme in Gram-positiven Bakterien der „low G+C branch“ (geringer GC Gehalt des Genoms), zu denen neben dem Modellorganismus *B. subtilis* auch eine Reihe menschenpathogener Erreger gehören. Da alle Komponenten hoch konserviert sind, haben die Arbeiten damit auch Bedeutung für die Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen dieser Bakteriengruppe (**Krüger et al., 2001**). Clp-Proteasen aus *Listeria monocytogenes* (Roquette et al., 1998; Nair et al., 2000; Kreft und Vazquez-Boland, 2000 zur Übersicht), *Staphylococcus aureus* (Frees et al., 2004, 2005; Michel et al., 2006), *Streptococcus pneumoniae* (Kwon et al., 2004; Ibrahim et al., 2005) und *S. pyogenes* (Derré et al., 1999) tragen zur Virulenz dieser pathogenen Bakterien bei. Die Bedeutsamkeit von Clp-Proteasen für die Virulenz solcher Gram-positiver humanpathogener Erreger wird durch die Wirkungsweise der neuen Acyldepsipeptid-Antibiotikaklasse unterstrichen. Durch

Anwendung von Reversed-Genomics-Techniken konnte gezeigt werden, dass die antibakterielle Wirkung dieser Antibiotika durch Bindung an die Proteaseuntereinheit ClpP zustande kam. Zum Schutz der Zelle vor der Zerstörung durch diese universelle Protease wird ClpP nur mithilfe einer Clp-ATPase aktiviert. Die Bindung von Acyldepsipeptid-Antibiotika an ClpP in Gram-positiven Bakterien kann unter Umgehung der ATPase-Assoziation als Sicherungsmechanismus ClpP hyperaktivieren. Diese unkontrollierte Proteolyse hemmt die bakterielle Zellteilung und führt letztlich zum Tod der Bakterien. Wegen dieses neuartigen Mechanismus war keinerlei Kreuzresistenz zu vermarkteten Antibiotika oder Kandidaten für die klinische Entwicklung zu beobachten (Brötz-Oesterhelt et al., 2005).

In Antwort auf eine Inhibition der Proteasomenaktivität mit nicht-toxischen Dosen an Proteasomeninhibitor aktivieren Säugerzellen *in vivo* die verstärkte Expression proteasomaler Untereinheiten in einem konzertierten autoregulatorischen feed-back Mechanismus. Unsere Arbeiten zeigen erstmalig, dass die proteasomale Genexpression in Mammaliazellen als definierter Regulationsparameter für die Proteasomenmenge in der Zelle eine wichtige Rolle spielt (Meiners et al., 2003). Wie für einen autoregulatorischen Mechanismus zu erwarten stellt diese Induktion der Genexpression eine transiente Antwort dar, da sich das System selbst zurückregulieren muss. Eine Reduktion der proteasomalen Aktivität von weniger als 50% war ausreichend, um eine Zellantwort zu forcieren. Das Ergebnis impliziert, dass die Akkumulation proteasomaler Substrate möglicherweise ein Sensor für den Induktionsmechanismus ist, der die Neuf ormation aktiver Proteasomenkomplexe induziert, um die erniedrigte Enzymaktivität zu kompensieren. Unter diesen Bedingungen treten verstärkt ubiquitinierte Proteine auf und die Anzahl aktiver 26S Proteasomenkomplexe sinkt möglicherweise unter eine für die Zelle kritische Grenze. Dieser Aspekt fällt vor allem durch die Anwendung von Proteasomeninhibitoren als Chemotherapeutika ins Gewicht (Roccaro et al., 2006).

Auf Grund der starken Konserviertheit der Proteasomenbiogenese zwischen niederen und höheren Eukaryonten erschien es lohnenswert zu prüfen, ob auch die Details der Regulationsmechanismen für die proteasomale Genexpression in Hefe- und Mammaliazellen konserviert sind. In Analogie zum Hefesystem kann man auch in Mammalia einen (oder mehrere) Faktor(en) postulieren, der die Homöostase des Proteasomensystems über einen autoregulatorischen Mechanismus kontrolliert. Im Hefesystem sind zwei Parameter für die Regulation der Genexpression proteasomaler Untereinheiten von Bedeutung, das Vorhandensein eines nonameren cis-Elementes im Promoterbereich (PACE; Mannhaupt et al., 1999) sowie dessen Bindung durch den Transkriptionsfaktor Rpn4 (Mannhaupt et al., 1999;

Xie und Varshavsky, 2001; Fleming et al., 2002). Trotzdem unsere Daten einen Regulator mit Rpn4-ähnlicher Funktion in Mammalia nahe legen, ergaben Datenbankrecherchen weder ein Rpn4-homologes Protein in Säugern, noch konnten PACE-Elemente im Promoterbereich der Gene für proteasomale Untereinheiten identifiziert werden. Mittlerweile wissen wir, dass diese konzertierte Antwort auf Proteasomeinhibition durch eine verstärkte Transkriptionsinitiation an den ARE (*antioxidant response element*)-Sequenzen in den proteasomalen Promotoren durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 vermittelt wird. Nrf2 wird unter Normalbedingungen über das Keap1-Protein ubiquityliert und durch das 26S Proteasom abgebaut. Die Aktivierung von Nrf2 kann einerseits durch Oxidation und Inaktivierung von Keap1 oder andererseits durch direkte Phosphorylierung über verschiedene Signalwege erfolgen (Kobayashi und Yamamoto, 2005 zur Übersicht). Genexpressionprofile mit Hilfe von cDNA-Microarrays ergaben, dass ungefähr 500 UPS Komponenten transkriptionell über Nrf2 und c-Jun reguliert werden (Krüger und Steffen, in Vorbereitung).

Rückkopplungsmechanismen, die autoreguliert sind, haben sich evolutionär offenbar als stabiles Konzept erwiesen. So ist die Hitzeschockantwort von *E. coli* bis zum Menschen durch solche molekularen Mechanismen kontrolliert (Morimoto 1998, Bukau 1997 zur Übersicht). Ebenso unterliegt die Genexpression ATP-abhängiger Proteolysesysteme von Bakterien bis zum Menschen autoregulatorischen Mechanismen (Missiakas et al., 1998; **Krüger et al., 2001**; Mannhaupt et al., 1999; Xie und Varshavsky, 2001; **Meiners et al., 2003**). Damit ist die ATP-abhängige Proteolyse durch Organismenreiche hinweg in einer bemerkenswerten Parallelität durch den proteolytischen Abbau derselben Faktoren autoreguliert, die die Neuformation der Proteasekomplexe kontrollieren. Obwohl sich die pro- und eukaryontischen Regulatorproteine und ihre Zielsequenzen unterscheiden, ist das Paradigma der Selbstkontrolle der Genexpression ATP-abhängiger Proteolysesysteme über Organismenreiche hinweg konserviert worden.

Die Regulation energieabhängiger Proteasesysteme auf Ebene der Genexpression ist für die komplexen 26S Proteasomen der Eukaryonten nicht die alleinige Möglichkeit der Regulation. Die intrazelluläre Homöostase eukaryontischer 26S Proteasomen kann über Genexpression aber auch über den Einbau und die Aktivierungskinetik ihrer aktiven β -Untereinheiten reguliert werden. Dabei spielt die Dynamik der Proteasomenbiogenese eine wesentliche Rolle für die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen. Der Einbau unterschiedlicher aktiver β -Untereinheiten wiederum hat Einfluss auf die Aktivität und Schnittpräferenz des Proteasoms. Eine geordnete Biogenese des Proteasoms ist zwingende Voraussetzung zur Formation aktiver Proteasomenkomplexe, die eine zentrale Rolle für die verschiedensten

zellphysiologischen Vorgänge in Eukaryonten spielen. Die Assemblierung und Maturierung komplexer eukaryotischer Proteasomen benötigen jedoch die Unterstützung multipler, akzessorischer Faktoren. Offenbar hat sich in Säugerzellen ein komplettes Netzwerk an Helferfaktoren und Chaperonen entwickelt (**Krüger et al., 2003**; Schmidtke et al., 1997), die alle mehr oder weniger wichtig für eine effiziente Proteasomenbiogenese sind und an unterschiedlichen Stellen im System angreifen. Pac1/2 sind als Heterodimer aktiv und verhindern durch die Bindung an $\alpha 5$ und $\alpha 7$ die Ausbildung von α -Doppelringen. Eine Depletion von Pac1 oder Pac2 hat nur geringe Auswirkungen auf die Gesamthomöostase des Proteasomensystems (Hirano et al., 2005). Kürzlich wurde von der selben Gruppe ein weiterer Assemblierungshelfer beschrieben, den sie Pac3 nannten. Pac3 soll ebenfalls für die α -Ringassemblierung, aber auch für die Rekrutierung von β -Untereinheiten verantwortlich sein. Es konnte allerdings keine Interaktion von Pac1/2 mit Pac3 nachgewiesen werden. Ein „knock-down“ von Pac3 allein hat ebenfalls keine größeren Konsequenzen für die Funktionsfähigkeit des Proteasomenpools in einer Zelle (Hirano et al., 2006). Unsere Arbeiten zum Assemblierungsfaktor POMP bestätigen die für Hefe gefundenen Funktionen und Eigenschaften von POMP als kleines, kurzlebiges Protein, das nur mit Assemblierungsintermediaten assoziiert vorliegt und vor allem für die korrekte Maturierung der β -Untereinheiten verantwortlich ist (Ramos et al., 1998; **Witt et al., 2000**; **Heink et al., 2005**). Es gibt allerdings auch eklatante Unterschiede in Funktion und Bedeutung von Säuger-POMP im Vergleich zu Hefe-Ump1p. Wir konnten nachweisen, dass POMP eindeutig Rekrutierungsfunktion für β -Untereinheiten inne hat und für das Überleben der Zelle essentiell ist, während Ump1p zwar die korrekte Maturierung der β -Untereinheiten koordiniert, aber in Hefe entbehrlich ist (Ramos et al., 1998; **Heink et al., 2005**). Weiterhin belegen unsere Daten, dass POMP in der Lage ist α -Untereinheiten zu binden (**Fricke et al., in revision**). Wir können durch diese Befunde die Arbeiten von Hirano et al. (2005/2006) komplettieren und liefern eine molekulare Erklärung für den bislang unbekanntem Mechanismus, wie β -Untereinheiten auf den α -Ringens assembliert werden.

In Anbetracht der Komplexität der Proteasomenbiogenese mit 17 verschiedenen Untereinheiten in Säugern, die alle in die definierte $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ 20S Struktur assembliert werden müssen, stellte sich die Frage nach spezifischen Assemblierungsorten für 20S Proteasomen in Säugerzellen. Bisher war es jedoch nicht möglich, die zellulären Orte proteasomaler Funktion von denen der Proteasomenneubildung zu unterscheiden, weil alle Antikörper gegen proteasomale Untereinheiten sowohl Vorläuferkomplexe als auch aktive Proteasomenkomplexe erkennen. Mit Hilfe zweier Antikörper, die ausschließlich

Proteasomenvorläuferkomplexe erkennen, konnten wir die Hauptschritte der Proteasomenbiogenese sowohl für c20S als auch für i20S am Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisieren. Das war insofern überraschend, da man bisher glaubte, dass die Assemblierung frei im Cytoplasma bzw. wie bei Hefen im Zellkern (Lehmann et al., 2002) stattfindet. Unsere weiterführenden Daten belegen eine POMP-vermittelte Bindung von verschiedenen Assemblierungsintermediaten (α -Ringe, 13S und 16S Vorläuferkomplex) an die ER-Membran. Am ER werden unterstützt durch POMP und andere Helferproteine die β -Untereinheiten eingebaut. Damit dient POMP als eine Art molekulares Gerüst an dem sich die Assemblierung der 20S Proteasomen durch Bindung der α -Ringe und Rekrutierung von β -Untereinheiten vollzieht. Mit einem solchen Mechanismus wäre die Zelle in der Lage, genügend *de novo* assemblierte Proteasomen für ihre Funktionen direkt vor Ort zur Verfügung zu stellen (**Fricke et al., in revision**). Unsere Daten können bisher weitere Assemblierungswege frei im Cytoplasma oder im Zellkern nicht völlig ausschließen. Allerdings zeigen unsere Experimente über radioaktive Pulse-Markierung, dass wenigstens 70% der gesamten Proteasomenvorläuferkomplexe mit dem ER assoziiert vorliegen.

Trotz eines rasanten Wissenszuwachses sind die molekularen Details der Biogenesemechanismen weitgehend ungeklärt. Zukünftig werden wir uns der Erforschung der molekularen Interaktionen in ihrer Struktur- und Funktionsdynamik widmen, die die Biogenese des 20S Proteasoms aus Säugerzellen regulieren und determinieren. Es wird den Fragestellungen nachgegangen wie sich einzelne Proteasomenvorläuferintermediate hinsichtlich ihrer Struktur- und Funktionsdynamik unterscheiden, welche Helferproteine und in welcher Stöchiometrie notwendig sind, um intakte und aktive 26S Proteasomen zu formen und welche Schritte dabei geschwindigkeitsbestimmend sind. Vor allem strukturelle Daten zu Proteasomen-vorläuferkomplexen aus höheren Eukaryonten sind notwendig, um entsprechende Struktur- und Funktionsbeziehungen ableiten zu können. Dazu lieferten unsere eigenen und die Arbeiten anderer Gruppen an achaeobakteriellen Systemen einen entscheidenden Grundstock (Groll et al., 2003; **Mullapudi et al., 2004**; Witt et al., 2006). Aus unseren neuesten Daten zur Membran-assoziierten Assemblierung am ER von Säugerproteasomen ergeben sich Untersuchungen zur zellulären Verteilungsdynamik von Proteasomenvorläuferkomplexen und deren Mechanismen der Membraninteraktion.

Eine zelluläre Funktion, die direkt durch Proteasomenneubildung beeinflusst wird, stellt die MHC Klasse I Antigenpräsentation dar. Die proteasomale Peptid-Generierung als Antwort auf Virus-induzierte Interferone (IFN) ist limitierend für die MHC Klasse I restringierte Antigenpräsentation. Aus diesem Grund unterstützt die IFN-induzierte *de novo* Synthese von

Immunoproteasomen (i20S) wesentlich die schnelle Adaptation des Mammalia-Immunsystems an Pathogene. Diese Anpassung ist insbesondere wichtig für die Immunantwort bei Infektionen mit schnell replizierenden Viren. Wir konnten wir zeigen, dass die Bildung von i20S eine beschleunigte und transiente Antwort ist. Das funktionelle Zusammenspiel der IFN γ -induzierbaren Proteasom-Komponenten POMP und LMP7 wurde erstmals als eine Voraussetzung der Modulation der zellulären Immunantwort aufgrund der schnellen *de novo* Formation von Immunoproteasomen beschrieben (**Heink et al., 2005; Strehl et al., 2005**). Diese Arbeiten leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Regulation der Proteasomenhomöostase während der Immunadaptation des Proteasomensystems. Weiterhin unterstützen sie die Hypothese, dass die meisten antigenen Peptide von frisch synthetisierten Proteinen generiert werden. In Übereinstimmung mit der DRiP-Hypothese (Yewdell et al., 2003, Yewdell, 2005 zur Übersicht) kann eine Zelle sofort und unmittelbar auf eine Infektion durch schnell replizierende Viren mit der MHC Klasse I-vermittelten Präsentation von Virusepitopen antworten (siehe Abb. 11). Während der akuten Phase einer Infektion sezernieren aktivierte Lymphozyten das immunmodulatorische Cytokin IFN γ . Neuerdings hat sich herausgestellt, dass i20S auch durch Typ I IFN wie IFN β induziert werden (Shin et al., 2006), das in Antwort auf eine Virusinfektion von nahezu jeder Zelle sezerniert werden kann. Infizierte Zellen exprimieren in Antwort auf IFN β oder IFN γ proteasomale Immununtereinheiten, die präferenziell in Precursorkomplexe eingebaut werden und beschleunigt zu aktiven i20S maturieren. Die Generierung von MHC Klasse I restringierten Peptiden wird dadurch sehr schnell moduliert und infizierte Zellen können effektiv erkannt und eliminiert werden. Ist die Infektion vorüber, bleibt eine weitere Synthese von Immunoproteasomen in den nicht infizierten Zellen aus, die bestehenden Immunoproteasomen werden mit einer geringen Halbwertszeit rasch beseitigt und die Zelle kehrt schnell zu ihrem Ausgangszustand zurück. Die Brisanz unserer Befunde für das Gesamtverständnis der Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der MHC Klasse I Antigenpräsentation wurde durch einen Kommentar eines der führenden Wissenschaftler auf diesem Gebiet, Prof. J. Yewdell (NIH, Bethesda, USA), gewürdigt (Yewdell, 2005).

Die funktionelle Bedeutung von i20S für die MHC Klasse I Antigen Präsentation und die Immunantwort wird durch die vielen Beispiele von Immunevasionsstrategien deutlich, die in Zusammenhang mit dem oncogenen Potential von Tumorzellen oder den Pathogenitätsmechanismen von Viren gebracht werden. Ein häufig beobachtete Strategie ist die Manipulation von Komponenten der MHC Klasse I Antigenpräsentationsmaschinerie inklusive des Proteasomensystems (Ehrlich, 1997 zur Übersicht).

I20S weisen zwar keine grundsätzlich veränderte proteolytische Aktivitäten im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen auf, generieren aber effizienter verschiedene antigene Peptide und damit ein divergentes Repertoire an MHC I-Peptidliganden. Vor allem für zahlreiche virale MHC I-Epitope konnte eine optimierte Generierung durch i20S beschrieben werden (Kloetzel, 2001; **Krüger et al., 2003**; **Strehl et al., 2005** zur Übersicht). Der Einfluss von i20S auf die Prozessierung von Tumorantigenen wird kontrovers diskutiert. Einerseits wurden tumorspezifische Antigene beschrieben, die durch i20S besser generiert werden (Schultz et al., 2002), andererseits wurde auch eine effizientere Generierung von bestimmten Tumorepitopen durch konstitutive Proteasomen gezeigt (Morel et al., 2000).

Wir haben in unseren Arbeiten zwei Beispiele gefunden, bei denen Immunevasionstrategien auch mit der Proteasomenbiogenese interferieren. Die Blockierung der Proteasomenaktivität durch HIV-Tat durch direkte Interaktion mit β -Untereinheiten und vor allem mit LMP7 stellt so ein Beispiel dar und kann *in vivo* direkt zum *immune escape* des Virus beitragen (**Apcher et al., 2003**). Vor allem die Verdrängung der Immununtereinheit β 5i/LMP7 aus dem nasszierenden 20S Komplex durch Interaktion von Tat stellt sich mit dem jetzigen Wissen über die Rolle von POMP und LMP7 in der Modulation der zellulären Immunantwort aufgrund der schnellen *de novo* Formation von Immunoproteasomen in völlig neuem Licht dar. Unser zweites Beispiel ist ein neuer Mechanismus, der zum Prozess der Onkogenese in Tumorzelllinien beiträgt. Humane Tumorzellen, die preferentiell die nichtfunktionelle β 5i-Isoform LMP7_E1 exprimieren sind defizient für i20S, weil LMP7_E1 nicht mit POMP interagiert und damit nicht in nasszierende i20S eingebaut werden kann (**Heink et al., 2006**). Auch in diesem Fall wird das funktionelle Zusammenspiel von POMP und LMP7 unterbrochen, sodass keine geordnete Biogenese von i20S stattfinden kann.

In weiterführenden Projekten werden wir detailliert die frühe Phase nach Zytokinstimulation oder Virusinfektion in Zielzellen oder dendritischen Zellen hinsichtlich der Induktion der Proteasomenneubildung und die daraus resultierende MHC Klasse I Immunantwort untersuchen. Wir haben fundierte Hinweise, dass Zytokine wie Interferon- γ oder eine Virusinfektion einen kompletten Umbau des UPS hervorrufen. Im Detail betrifft das nicht nur den bekannten Umbau des Proteasoms selbst sowie der Induktion der kompletten Antigenpräsentationsmaschine sondern auch die Modulation von Komponenten der Ubiquitylierungskaskade. Dadurch werden unter anderem DRiPs induziert und damit der Pool an verfügbaren Peptiden für eine verbesserte MHC Klasse I Antigenpräsentation erhöht. Die Charakterisierung dieser Modulation des UPS durch proinflammatorische Zytokine oder Virusinfektionen wird nicht nur einen Beitrag zum besseren Gesamtverständnis der molekularen Vorgänge unter diesen Bedingungen leisten, sondern kann auch Ansätze zur besseren Bekämpfung von Virusinfektionen liefern.