

DISSERTATION

**Nukleärer Import von 19S
regulatorischen Komplexen in der
Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt- Universität zu Berlin

von Diplom Ingenieurin Petra Wendler
geb. 09.05.1972 in Gehrden, Hannover

Präsident der Humboldt- Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. P.-M. Kloetzel
 2. Prof. Dr. W. Dubiel
 3. Prof. Dr. H. Holzhütter

eingereicht: 12.03.2004
Datum der Promotion: 28.05.2004

Abstract

Das 26S Proteasom führt die letzten Schritte des essentiellen, Ubiquitin abhängigen Proteinabbaus durch, indem es ubiquitinierte und fehlgefaltete Proteine erkennt und eliminiert. Da es in *S. cerevisiae* während allen Stadien der Zellteilung vornehmlich im Zellkern lokalisiert ist, ist der Importweg dieses 2,5 MDa umfassenden proteolytischen Komplexes in den Zellkern von besonderem Interesse. Das 26S Proteasom unterteilt sich in das katalytisch aktive 20S Proteasom sowie den 19S Regulatorkomplex. Für 20S Proteasomen konnten Lehmann und Mitarbeitende (2002, JMB, 317, 401) zeigen, dass Vorläuferkomplexe über den Karyopherin alpha/beta abhängigen Importweg in den Zellkern gelangen und dort zu 20S Proteasomen heranreifen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die nukleäre Lokalisation der 19S Regulatorkomplexe ebenfalls von Karyopherin alpha/beta abhängt. Die Untersuchung der potentiellen klassischen Kernlokalisationssequenzen (cNLS) in den Untereinheiten des 19S Base Subkomplex ergab, dass Rpn2 und Rpt2, eine non-ATPase Untereinheit sowie eine ATPase Untereinheit des Base Komplex, funktionelle cNLS beherbergen. Die Deletion der Rpt2 NLS führte zur wt Lokalisation der proteasomalen Subkomplexe. Die Deletion der NLS in Rpn2 dagegen bewirkte eine verschlechterte proteasomale Funktion und eine Mislokalisierung der Komplexe. Unsere Daten unterstützen ein Modell wonach die nukleären 26S Proteasomen aus Subkomplexen zusammengelagert werden, die durch Karyopherin alpha/beta in den Zellkern gelangen.

Schlagworte: Kerntransport, 19S Regulator, Proteasom, *S. cerevisiae*

Abstract

26S proteasomes fulfil final steps in the ubiquitin-dependent degradation pathway by recognising and hydrolysing ubiquitylated proteins. As the 26S proteasome mainly localises to the nucleus in yeast, we addressed the question how this 2 MDa multisubunit complex is imported into the nucleus. 26S proteasomes consist of 20S proteolytically active core and 19S regulatory particles, the latter composed of two subcomplexes, namely the base and lid complexes. We have shown that 20S core particles are translocated into the nucleus as inactive precursor complexes via the classical karyopherin alpha/beta import pathway (Lehmann et al. 2002; JMB, 317, 401). Here, we provide evidence that nuclear import of base and lid complexes also depends on karyopherin alpha/beta. Potential classical nuclear localisation sequences (NLS) of base subunits were analysed. Rpn2 and Rpt2, a non-ATPase and an ATPase subunit of the base complex, harbour functional NLS. The Rpt2 NLS deletion yielded wild type localisation. However, the deletion of the Rpn2 NLS resulted in improper nuclear proteasome localisation and impaired proteasome function. Our data support the model by which nuclear 26S proteasomes are assembled from subcomplexes imported by karyopherin alpha/beta

Keywords: Nuclear import, 19S regulatory complex, proteasome, *S. cerevisiae*

Zusammenfassung

Das 26S Proteasom führt die letzten Schritte des essentiellen, Ubiquitin abhängigen Proteinabbaus durch, indem es ubiquitinierte und fehlgefaltete Proteine erkennt und eliminiert. Da es in *S. cerevisiae* während allen Stadien der Zellteilung vornehmlich im Zellkern lokalisiert ist, ist der Importweg dieses 2,5 MDa umfassenden proteolytischen Komplexes in den Zellkern von besonderem Interesse. Das 26S Proteasom unterteilt sich in das katalytisch aktive 20S Proteasom sowie den 19S Regulatorkomplex. Für 20S Proteasomen konnten Lehmann und Mitarbeitende (2002) zeigen, dass Vorläuferkomplexe über den Karyopherin α/β abhängigen Importweg in den Zellkern gelangen und dort zu 20S Proteasomen heranreifen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die nukleäre Lokalisation der 19S Regulatorkomplexe ebenfalls von Karyopherin α/β abhängt. Die Untersuchung der potentiellen klassischen Kernlokalisationssequenzen (cNLS) in den Untereinheiten des 19S Base Subkomplex ergab, dass Rpn2 und Rpt2 cNLS beherbergen, die Karyopherin α binden und in der Lage sind GFP Fusionsproteine in den Zellkern zu dirigieren, wenn diese in *S. cerevisiae* überexprimiert werden. Der C-terminale Bereich der ATPase Rpt1 ähnelt einer cNLS, zeigt aber nur geringe Bindung an Karyopherin α . Far Western Analysen bestätigen, dass Δ NLS rpn2 und Δ NLS rpt2 im Gegensatz zu Rpn2 und Rpt2 nicht mehr an Karyopherin α binden können und die Kernlokalisierung der 19S Komplexe vom klassischen Importweg abhängig ist. Stämme, die eine cNLS Deletion in Rpn2 oder Rpt2 tragen, sind stark temperatursensitiv. Die Deletion der NLS in Rpn2 führt außerdem zu Canavanin Sensitivität und einer herabgesetzten 26S proteasomalen Aktivität. Des Weiteren scheint die NLS in Rpn2 für die korrekte Lokalisation der 19S Komplexe kritischer zu sein als die in Rpt2, da 19S regulatorische Komplexe in Δ NLS rpn2 exprimierenden Stämmen im Gegensatz zu Δ NLS rpt2 exprimierenden Stämmen unter restriktiven Temperaturbedingungen im Cytoplasma lokalisiert sind. Die Deletion einer einzelnen cNLS im 19S Base Komplex hat unter permissiven Bedingungen keinen Einfluss auf die Lokalisation der 19S Komplexe, so dass unter diesen Bedingungen vermutlich mehrere Karyopherin α/β Transporter kooperativ an die verschiedenen cNLS im 19S Komplex binden und diesen durch die Kernporen leiten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur molekularen Masse des transportierten Komplexes weisen darauf hin, dass 19S regulatorische Partikel als 19S Base und Lid Subkomplexe in den Zellkern importiert werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Proteinabbau im Ubiquitin- Proteasom- System	6
1.2	Aufbau des 20S Proteasoms sowie des 19S regulatorischen Komplexes	10
1.3	Regulation des Ubiquitin- Proteasom Systems	15
1.4	Biogenese des 26S Proteasoms in <i>S. cerevisiae</i>	16
1.5	Intrazelluläre Lokalisation von Proteasomen	18
1.6	Allgemeine Mechanismen des Kerntransports	19
1.7	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Materialien und Methoden	26
2.1	Oligonukleotide, Vektoren, Stämme und Kultivierung von Mikroorganismen	26
2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.3	Proteinbiochemische Methoden	35
3	Ergebnisse	41
3.1	Funktioneller Austausch endogener 19S proteasomaler Untereinheiten gegen GFPHA, ProA oder HA markierte Varianten	41
3.2	Untersuchung klassischer Kerntransportmutanten	45
3.3	Klassische Kernlokalisationssequenzen im 19S Base sowie Lid Komplex	49
3.4	19S Base NLS- GFPS Fusionsprodukte lokalisieren im Zellkern und copräzipitieren Kar α/β in vivo	50
3.5	Charakterisierung der Δ NLS Mutation in Rpt2	53
3.6	Charakterisierung der Δ NLS Mutation in Rpn2	59
3.7	Far Western Untersuchungen zur Bindung von 19S proteasomalen Untereinheiten an Kar α/β	65
4	Diskussion	68
4.1	19S Untereinheiten lokalisieren im Zellkern und präzipitieren 19S Komplexe, Ubp6 und Ecm29	68
4.2	Kernimport von 19S Partikeln ist abhängig von Karyopherin α/β	70
4.3	Kernlokalisationssequenzen in Rpn2 und Rpt2 binden an Karyopherin α	72
4.4	Mehrere NLS im 19S Komplex sind am effizienten Kernimport beteiligt	73
4.5	Die Biogenese des 20S Proteasoms ist unabhängig von der 19S Lokalisation	78
4.6	Ausblick	78
4.7	Spekulationen über den biologischen Sinn der nukleären 19S Lokalisation	80
4.8	Importmodell für 19S regulatorische Partikel	81
5	Literaturverzeichnis	84
6	Abkürzungsverzeichnis	94

1 Einleitung

1.1 Proteinabbau im Ubiquitin- Proteasom- System

Das Überleben eukaryonter Zellen ist entscheidend vom unverzüglichen Abbau kurzlebiger Proteine abhängig, die in Bereichen wie der Transkription, der Zelldifferenzierung, der Zellzykluskontrolle oder der DNA Fehlerkorrektur zum Einsatz kommen. Auch Proteine, die fehlerhaft sind, müssen erkannt und beseitigt werden. Eine effiziente Vernichtung einer Vielzahl von Proteinen ist ebenfalls wichtig, sobald die Zelle Stresssituationen ausgesetzt ist oder die fehlgesteuerte Proteinproduktion bei der Krebsentstehung bzw. bei viralen Infektionen bekämpfen muss. In höheren Eukaryonten stellt hierbei die Generierung von Antigenen, die an der Zelloberfläche von MHC I (*major histocompatibility complex*) Molekülen präsentiert werden können, eine wichtige Immunreaktion dar. Nahezu alle diese Aufgaben werden in eukaryonten Zellen ATP abhängig durch einen Multi- Proteinkomplex von ca. 2,5 MDa - das 26S Proteasom - ausgeführt (Ciechanover, 1998).

26S Proteasomen erkennen ubiquitinierte Proteine und zerlegen sie in Peptide einer Länge von 3-22 Aminosäuren (Kisselev *et al.*, 1999). Funktionell und strukturell bestehen sie aus zwei Subkomplexen: dem proteolytisch aktiven, zylinderförmigen 20S Kernpartikel sowie den an einem oder beiden Enden des 20S gebundenen 19S Regulatorkomplexes. Das 20S Proteasom alleine ist lediglich in der Lage, kurze Peptide zu spalten, während den regulatorischen Partikeln die Aufgaben der Erkennung ubiquitinerter Proteine, der Proteinentfaltung, der Abspaltung des Ubiquitinrestes sowie der Übertragung des Polypeptids in das 20S Proteasom zukommen. Für die effiziente Funktion des 19S regulatorischen Partikels sowie für die Zusammenarbeit mit dem 20S Proteasom wird ATP verbraucht (Hershko *et al.*, 1984). Biochemisch kann der Regulatorkomplex in zwei Subkomplexe aufgetrennt werden, die als 19S Base sowie 19S Lid Komplex bezeichnet werden (Glickman *et al.*, 1998a; Saeki *et al.*, 2000).

Die rechtzeitige, substratspezifische Beseitigung von Proteinen bedarf einer hochentwickelten Kontrolle, die im Ubiquitin- Proteasom- System gewährleistet wird. Verschiedene Enzyme sind für die Erkennung des entsprechenden Proteins und dessen Markierung mit kovalent gebundenen Ketten von Ubiquitinresten verantwortlich. Diese Ubiquitinreste dienen anschließend dem Proteasom als Degradationssignal für das markierte Protein. Ubiquitin ist genau wie das Proteasom in Eukaryonten evolutionär hochkonserviert. Das 8,6 kDa *Saccharomyces cerevisiae* Protein besteht aus 76 Aminosäuren und unterscheidet sich nur in drei Aminosäuren vom humanem Ubiquitin (Özkaynak *et al.*, 1989). Für die Konjugation an das entsprechende Substrat, muss Ubiquitin zunächst ATP abhängig aktiviert werden, indem es mit dem Ubiquitin aktivierenden Enzym (E1; UBA- *ubiquitin activating enzyme*) ein energiereiches Thiolester- Intermediat bildet. Dieses wird auf ein Ubiquitin konjugierendes Enzym (E2; UBC- *ubiquitin conjugating enzyme*) übertragen, das den aktivierten Ubiquitinrest unter

Anwesenheit einer, das Substrat bindenden Ubiquitin Ligase (E3) auf das zu degradierende Protein transferiert (Hershko & Ciechanover, 1998).

In *S. cerevisiae* sind bisher zwei UBA Enzyme (UBA1, UBA2), 15 UBCs und ca. 60 E3-Ligasen bekannt (von Arnim, 2001). Die E3 Ligasen nehmen als die größte, stetig wachsende Proteinfamilie in diesem System eine Schlüsselposition ein, indem sie die zu degradierenden Proteine erkennen und den Abbau einleiten. Als Ubiquitinierungssignale dienen den E3 Ligasen einzelne N-terminale Aminosäuren (*N-end rule degron*; Bachmair & Varshavsky, 1989), kurze Sequenzen wie die *destruction box* in Cyclinen oder stark hydrophobe Bereiche, die als Membrananker dienen oder im Molekülinneren globulärer Proteine vorkommen (Gilon *et al.*, 1998). Aufgrund struktureller oder funktioneller Ähnlichkeit können die E3 Ligasen in 6 Subtypen unterteilt werden:

- die E3 α Proteine,
- die HECT (Homolog zu E6-assoziiertem Protein Carboxylterminus) Domäne tragenden Proteine,
- den APC (*anaphase promoting complex*: Anaphase fördernden Komplex) bzw. das Cyclosom,
- den SCF Komplex (Skp1, Cdc53 in *S. cerevisiae* bzw. Cullin in humanen Zellen, E-box Protein),
- Ring Finger Proteine

und einem SCF ähnlichen Komplex, der das von Hippel- Lindau Tumorsuppressor Protein (pVHL) beinhaltet (zusammengefasst in Ciechanover *et al.*, 2000).

Wenn das zu degradierende Protein durch die E3 Ligase erkannt ist, überträgt die entsprechende E2 den ersten Ubiquitinrest, indem eine Peptidbindung des C-terminalen Glycins (G76) von Ubiquitin entweder an die ϵ -NH₂ Gruppe eines substrateigenen Lysins oder in einigen Fällen auch an die α -NH₂ Gruppe des Substrats geknüpft wird (Hershko & Ciechanover, 1998; Breitschopf *et al.*, 1998). Da 19S regulatorische Partikel für die effiziente Erkennung der Ubiquitinmarkierung eine Kette von mindestens vier und für den effizienten Abbau des Substrats mehr als fünf Ubiquitinreste benötigen, werden anschließend weitere Ubiquitinreste, meist bereits in Kettenform, durch Lysin 48- G76 Isopeptidbindungen übertragen (Thrower *et al.*, 2000; Chau *et al.*, 1989).

Bisher sind zwei Untereinheiten des 26S Proteasoms bekannt, die Polyubiquitinketten binden können: Rpn10/ S5a und Rpt5/ S6' (Deveraux *et al.*, 1994; van Nocker *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 2002). *S. cerevisiae* Rpn10 und humanes S5a interagieren mittels einem bzw. zwei Ubiquitin- interagierenden Motiven (UIM) im C-terminalen bzw. mittleren Bereich des Proteins mit Polyubiquitin (Hofmann & Falquet, 2001). Allerdings ist weder Rpn10 noch sind dessen Homologe in *S. pombe* oder der Moos Art *Physcomitrella patens* essentiell (van Nocker *et al.*, 1996; Girod *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass die Rpn10 Deletion in verschiedenen genetischen Hintergründen

synthetisch lethal ist, führte zu dem Vorschlag, dass mehrere proteasomale Untereinheiten bei der Bindung der ubiquitinierten Substrate kooperieren (Fu *et al.*, 1998). Rpt5 als potentielle, unterstützende Untereinheit ist zwar eine essentielle 26S Untereinheit, besitzt jedoch keine UIM und bindet die Ubiquitinketten nicht so stark, dass sie mit dem 26S Proteasom im Glyceroldichtegradienten cosedimentieren (Lam *et al.*, 2002). Mit Rad23/ Rhp23 und Dsk2/ Dph1 wurden zwei Adapterproteine gefunden, die in der Lage sind, mit ihrer UBA (*ubiquitin pathway associated*) Domäne Ubiquitinreste und mit ihrer UBL (*ubiquitin like*) Domäne die Rpn1 Untereinheit des 26S Proteasoms zu binden (Elsasser *et al.*, 2002). Ubiquitin Ligasen binden ebenfalls transient an das 26S Proteasom, wie Xie und Varshavsky (2000) für Ubr1 und Ufd4 (binden Rpn2, Rpt1 und Rpt6) zeigen konnten, oder copräzipitieren wie Untereinheiten des APC Ubiquitin Ligase Komplex und des SCF Protein Ligase Komplex mit dem 19S Regulator Komplex (Verma *et al.*, 2000). Weitere Möglichkeiten, dem 26S Proteasom Substrate zuzuliefern, sind in Abb. 1 dargestellt.

Über die zeitliche Reihenfolge der nach der Substraterkennung durch das 26S Proteasom erforderlichen Abbauschritte sowie über die für Proteinerkennung und -abbau erforderlichen, strukturellen Umlagerungen im 26S Proteasomen, ist bisher nur sehr wenig bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass der effiziente Abbau von Proteinen von der Integrität des gesamten Komplexes abhängig ist (Glickman *et al.*, 1998a). Peptide werden bereits vom 20S Proteasom abgebaut. Diese Aktivität kann aber durch Assoziation des 20S Proteasoms mit dem 19S Base oder mit dem gesamten Regulatorkomplex erheblich gesteigert werden (Glickman *et al.*, 1998a). Dies geschieht vermutlich, indem die ATPase Untereinheit Rpt2 im 19S Base den Translokationskanal in das 20S Proteasom öffnet und den Zugang der Substrate zu den proteolytischen Untereinheiten erleichtert (Köhler *et al.*, 2001). Da die von den α Untereinheiten gebildete hydrophobe, axiale Öffnung des 20S Proteasoms nur einen Durchmesser von ca. 13 Å hat, muss das zu degradierende Protein vor der Translokation entfaltet werden (Lowe *et al.*, 1995). Diese Aufgabe wird den sechs AAA (*ATPases associated with various cellular activities*) ATPasen im 19S Base aufgrund von Homologien zu anderen ATPase Komplexen dieser Familie zugeschrieben (Rubin *et al.*, 1998). Alle ATPase Komplexe dieser Familie besitzen hochkonservierte AAA Domänen, die eine Nukleotid abhängige Konformationsänderung der ATPasen induzieren können. Diese Konformationsänderung wirkt sich so auf das gebundene Substrat aus, dass Polypeptide entfaltet werden, Protein-Protein Interaktionen zerstört werden oder eine gerichtete Bewegung ausgeführt werden kann (Vale, 2000). Ein Hinweis darauf, dass die proteasomalen ATPasen Faltungszustände eines Proteins verändern können, stammt aus der Arbeit von Braun *et al.* (1999), die zeigt, dass sowohl der 19S Base als auch das 26S Proteasom *in vitro* in der Lage sind, ungefaltete Citratsynthase zu binden und zu reaktivieren.

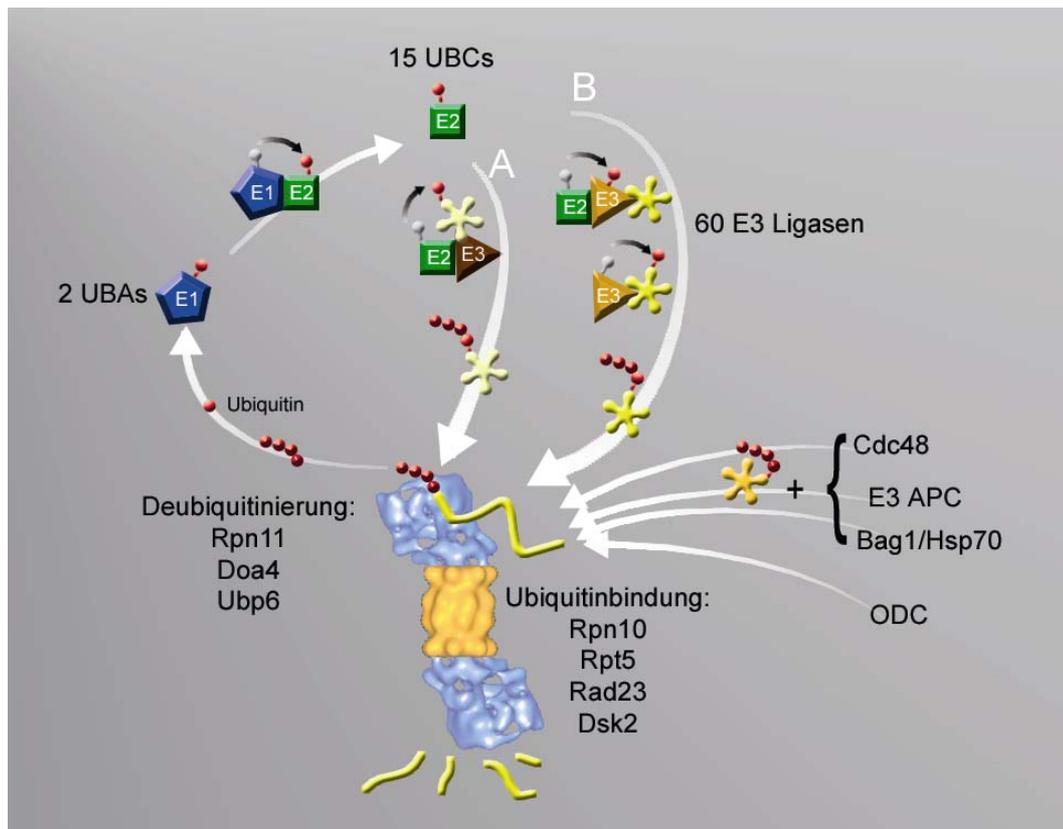


Abb. 1: Proteinabbau im Ubiquitin Proteasomen System. Ubiquitin wird durch das Ubiquitin aktivierende Enzym E1 (UBA) aktiviert und auf das Ubiquitin konjugierende Enzym E2 (UBC) übertragen. Von der E2 kann Ubiquitin direkt auf das Substrat übertragen werden, dass an eine Ubiquitin Ligase E3 gebunden ist (Möglichkeit A). Dies geschieht, wenn die E3 Ligase zu der Familie der Ring Finger E3 Ligasen gehört. Enthält die E3 Ligase eine HECT Domäne, wird das aktivierte Ubiquitin zunächst auf die E3 Ligase übertragen, um anschließend mit dem Substrat verknüpft zu werden (Möglichkeit B). Weitere Ubiquitinreste werden an den ersten Ubiquitinrest konjugiert. Die Polyubiquitinkette wird spezifisch von proteasomalen Untereinheiten (Rpn10, Rpt5) sowie von mit dem Proteasomen assoziierten Proteinen (Rad23, Dsk2) erkannt. Das Substrat wird entfaltet und zu kurzen Peptiden degradiert. Wiederverwendbares Ubiquitin wird durch die Aktivität verschiedener deubiquitinierender Proteine freigesetzt. Die Anzahl der in *S. cerevisiae* bekannten E1, E2 und E3 Enzyme ist angegeben. Alternativ zur Ubiquitinerkennung durch o.g. Proteine kann das ubiquitinierte Substrat durch Cdc48/VCP (*valosin containing protein*), durch E3 Ligasen (z.B. APC Komplex) oder durch Bag1 (*Bcl2 associated athanogene*) gekoppeltes Hsp70 direkt an das Proteasomen weitergeleitet werden. Die Ornithin Decarboxylase (ODC) wird Ubiquitin unabhängig durch das Proteasomen erkannt und degradiert. Abbildung nach Ciechanover und Brundin, 2003 sowie Hartmann-Petersen *et al.*, 2003.

Da der Abbau der strukturell sehr stabilen Ubiquitinmarkierung zusammen mit dem zur Degradation gekennzeichneten Protein energetisch verschwenderisch wäre, stellt die Abspaltung bzw. Monomerisierung dieser Markierung eine weitere, essentielle Funktion des 19S Regulators dar. Auch hier sind bereits mehrere deubiquitinierende Enzyme gefunden, die integraler oder peripherer Bestandteil des 26S Proteasoms sind. Fast allen ist zu eigen, dass sie spezifisch die Amidbindung nach dem C-terminalen G76 von Ubiquitin und damit die Peptidbindung zwischen Ubiquitin und Substrat spalten. Die substöchiometrisch mit dem Proteasom interagierenden Proteine Doa4 und Ubp6 besitzen beide eine deubiquitinierende Cysteinprotease- Aktivität. Zellen in denen Doa4 mutiert ist, reichern kurze ubiquitinierte Peptide an und Deletionsstämme von Ubp6 zeigen einen erhöhten Ubiquitinumsatz, da der Ubiquitinrest zusammen mit dem Substrat abgebaut wird (Papa *et al.*, 1999; Leggett *et al.*, 2002). Im Zusammenspiel von Ubp6 mit

Rpn11, einer essentiellen Untereinheit des 19S Komplexes, entwickelt sich die volle ubiquitinierende Aktivität des Regulators (Guterman & Glickman, 2004). Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Cysteinproteasen handelt es sich bei Rpn11 um eine Zink Metalloprotease, die lediglich im 19S bzw. 26S Komplex eingebunden, nicht aber isoliert, aktiv ist (Yao & Cohen 2002, Verma *et al.*, 2002).

1.2 Aufbau des 20S Proteasoms sowie des 19S regulatorischen Komplexes

Die Struktur des *S. cerevisiae* 20S Proteasoms wurde mit Hilfe der Röntgenkristallographie in einer Auflösung von 2,4 Å aufgeklärt (Groll *et al.*, 1997). Es besteht -C2 symmetrisch aufgebaut- aus zweimal 14 Untereinheiten mit Massen von 21-31 kDa, die als heptamere Ringe α_{1-7} β_{1-7} β_{1-7} α_{1-7} übereinander angeordnet sind und im Inneren des zylinderförmigen Gebildes insgesamt drei Kavitäten bilden (siehe Abb. 2A und B). Die α Untereinheiten bilden die äußeren Ringe und verschließen mit ihren N-Termini das 20S Proteasom, solange kein weiterer Faktor wie zum Beispiel der 19S regulatorische Komplex gebunden wird. Durch die Bindung der ATPase Untereinheit Rpt2 des 19S Komplexes an den N-Terminus von α_3 kann der Translokationskanal in das 20S Proteasom geöffnet werden (Köhler *et al.*, 2001). Zwischen den Ringen der β Untereinheiten befindet sich die zentrale Kavität von 5 nm Durchmesser, in der jeweils zwei proteolytisch aktive β_1 , β_2 und β_5 Untereinheiten lokalisiert sind. Das katalytisch aktive Threonin dieser β Untereinheiten (Gruppe der N-terminale nukleophilen-Hydrolasen) kann im Prinzip Peptidbindungen nach jeder Aminosäure spalten. Aufgrund der unterschiedlichen lokalen Strukturumgebung der aktiven Untereinheiten werden jedoch Schnitte nach bestimmten Aminosäuren bevorzugt (Groll & Huber, 2003). Die β_1 Untereinheit schneidet präferenziell nach sauren Aminosäuren (*peptidyl glutamyl peptid hydrolyzing* [PGPH] Aktivität), β_2 nach basischen Aminosäuren (Trypsin ähnliche Aktivität) und β_5 nach hydrophoben Aminosäuren (Chymotrypsin ähnliche Aktivität) (Orlowski, 1990; Heinemeyer *et al.*, 1994). In Mammalia werden Proteasomen, die diese drei konstitutiven Untereinheiten tragen, nach Induktion mit dem Zytokin γ Interferon gegen Proteasomen, die die nicht essentiellen, katalytischen Immununtereinheiten β_{1i} , β_{2i} und β_{5i} (LMP2, MECL-1, LMP7) tragen, ausgetauscht (Frentzel *et al.*, 1994). Die Anwesenheit der sogenannten Immunoproteasomen nach Interferon γ Induktion führt zu einer effizienteren Präsentation der generierten Peptide an der Zelloberfläche durch MHC Klasse I Rezeptoren. Diese Präsentation intrazellulärer Antigene stellt eine essentielle Funktion des Immunsystems dar (zusammengefaßt in Kloetzel 2001).

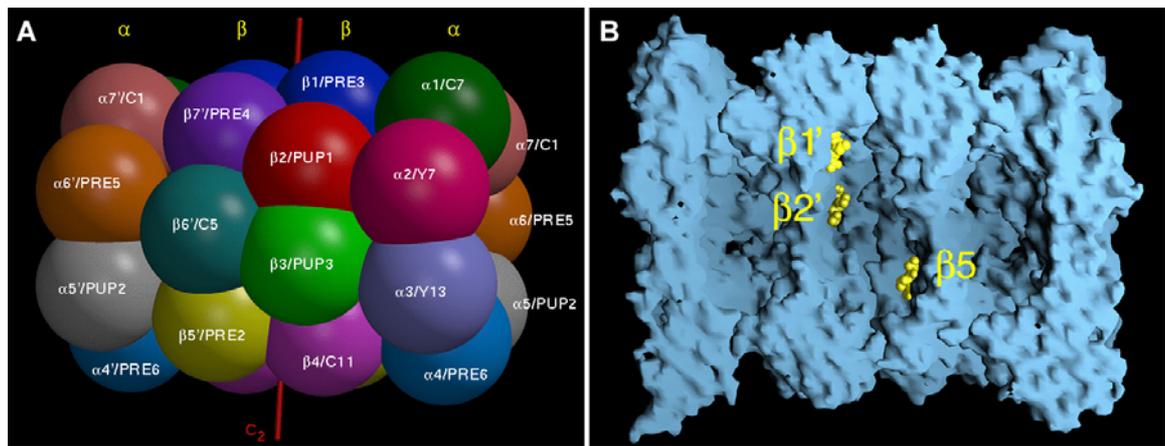


Abb. 2: Struktur des 20S Proteasoms aus *S. cerevisiae* als sphärisches Modell **(A)** und als GRASP (*graphical representation and analysis of structural properties*) Modell **(B)** mit Kennzeichnung der Lage der katalytischen β Untereinheiten (Groll *et al.*, 1997)

Aufgereinigte Proteasomen bestehen immer aus einer Mischung von freien 20S Partikeln und mit einem (RP_1CP) oder zwei regulatorischen Partikeln (RP_2CP) komplexiertem 20S (Glickman *et al.*, 1998b). *In vivo* dagegen scheinen Proteasomen mit gleicher Stöchiometrie von 20S und 19S Untereinheiten und ca. 15000- 30000 Molekülen/Zelle oder ca. 1% des Gesamtproteins vor allem als RP_2CP Form vorzuliegen (Russell *et al.*, 1999). Strukturell ist der 19S Komplex (in Säugetieren PA700 und in *D. melanogaster* μ Partikel genannt) sehr schlecht untersucht. Dreidimensionale Rekonstruktionen elektronenmikroskopischer Aufnahmen von *D. melanogaster* 19S zeigen, dass es sich um einen ca. 20 x 45 nm großen, asymmetrischen Komplex handelt, der hochbeweglich zu sein scheint (siehe Abb.4 A; Walz *et al.*, 1998). Der 19S besteht aus mindestens 17 verschiedenen Untereinheiten mit Massen von 30 bis 110 kDa und einer Gesamtmasse von ca. 1 MDa (Glickman *et al.*, 1998b). Unter Salzeinwirkung zerfällt der 19S Komplex in den 19S Base Subkomplex, bestehend aus sechs ATPasen (Rpt1-6) und zwei nicht ATPase Untereinheiten (Rpn1, Rpn2), sowie den 19S Lid Subkomplex, bestehend aus den Untereinheiten Rpn3 und Rpn5 – Rpn12 (Saeki *et al.*, 2000). Die Zuordnung von Rpn10 zu einem der beiden 19S Subkomplexen ist dabei uneindeutig. Untersuchungen in $\Delta Rpn10$ Stämmen haben ergeben, dass 19S regulatorische Partikel in Abwesenheit von Rpn10 leicht in 19S Lid und Base dissoziieren, so dass Rpn10 vermutlich an der Verbindungsstelle zwischen Base und Lid lokalisiert ist (Glickman *et al.*, 1998a). Aufgereinigte, native 19S Lid Subkomplexe enthalten allerdings in den meisten Präparationen kein Rpn10 (Glickman *et al.*, 1998a; Braun *et al.*, 1999; Hoelzl *et al.*, 2000).

Die im 19S Base lokalisierten AAA ATPasen gehören zu der Familie der Walker ATPasen, deren unveränderbarer Lysinrest im Walker A Motiv mit der Phosphatgruppe des ATPs interagiert (Walker *et al.*, 1982). Sie sind vermutlich ringförmig angeordnet und lagern sich im Kontakt mit dem 20S Proteasom an die α Untereinheiten an. Alle sechs ATPasen sind essentiell, funktionell nicht redundant und mit 66- 76% Sequenzidentität zwischen *S. cerevisiae* und humanen Varianten evolutionär stark konserviert (Ghislain *et al.*, 1993; Rubin *et al.*, 1998; Glickman *et al.*, 1998b). In Übereinstimmung mit der

beobachteten Sensitivität gegenüber Mutationen im ATP bindenden Motiv von Rpt2/Yta5 und Rpt5, konnten für diese Untereinheiten die essentiellen Funktionen des „gatings“ (Öffnen des 20S Translokationskanals) und des Bindens von Multiubiquitinketten nachgewiesen werden (Köhler *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2002). Des weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die ATPasen des 19S Komplexes unabhängig vom Proteasom *in vitro* und *in vivo* an den aktivierten Promotorbereich sowie die DNA des *GAL1* Gens binden können und für eine effiziente Transkriptionselongation durch die RNA II Polymerase benötigt werden (Ferdous *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002). Mittels der Bindung dieses APIS Komplex (*AAA proteins independent of 20S*: AAA Proteine unabhängig vom 20S) an die DNA könnte in Analogie zu den Hsp100 Chaperon ATPasen aus Bakterien die Energieversorgung der Transkriptionsmaschinerie gesichert werden.

Rpn1/Hrd2/S2 und Rpn2/Sen3/S1, die beiden nicht zu den ATPasen zählenden Untereinheiten des 19S Base, sind mit Molekulargewichten von 110 bzw. 104 kDa die beiden größten Untereinheiten des 19S Regulators. Sie besitzen ca. 20% Sequenzidentität zueinander und 40% Identität zu ihren humanen Homologen. Je nach genetischem Hintergrund sind Deletionen der Gene als lethal oder nicht lethal beschrieben worden (Yokota *et al.*, 1996; Glickman *et al.*, 1998b; DeMarini *et al.*, 1995). Beide Untereinheiten enthalten mehrere sich wiederholende Leucin reiche Sequenzen (LRR: *leucin rich repeat*), die als Protein – Protein Interaktionsdomänen vorgeschlagen worden sind (Lupas *et al.*, 1997). Für Rpn1 konnte auch gezeigt werden, dass es über seine Leucin reichen Sequenzen die Ubiquitin ähnlichen Domänen von Dsk2 und Rad23 zu binden vermag (Elsasser *et al.*, 2002). Des weiteren sind die LRR Bestandteile eines von Kajava (2002) definierten Sequenzmotivs, das in verschiedenen proteasomalen und cyclosomalen Untereinheiten gefunden wurde (PC Motiv) und dessen Wiederholungen Rpn1 und Rpn2 in der Strukturvorhersage eine α helicale, torroidartige Struktur geben. In systematischen Ansätzen, die die Interaktionen des Hefe Proteoms zu entschlüsseln versuchen, präzipitieren Rpn1 und Rpn2 mit den 19S regulatorischen Untereinheiten (Ho *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002) wie Rpt1 auch mit 3,4- 3,9% aller anderen untersuchten Komplexe und gelten somit als kontaminierende Proteine (Gavin *et al.*, 2002). Diese Interaktionen mit einer Vielzahl von Komplexen spiegeln jedoch möglicherweise nur die große Bedeutung des 19S Base Subkomplex in der Erkennung und Entfaltung von proteasomalen Substraten wieder.

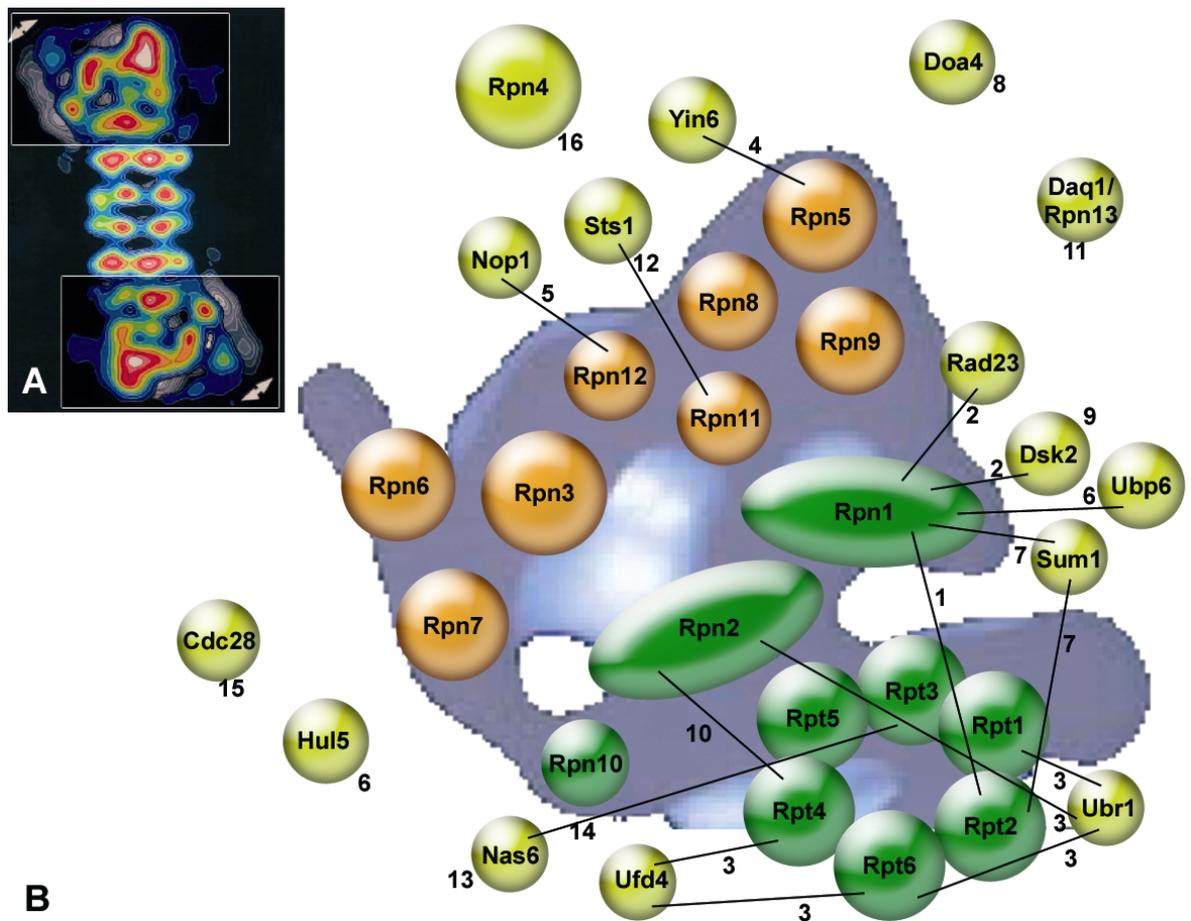


Abb. 3: (A) Struktur des 26S Proteasoms von *Drosophila melanogaster* Embryonen. Abgebildet ist die aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen erhaltene Dichteverteilung. Um die wackelnde Bewegung des 19S regulatorischen Komplex auf dem 20S Proteasom zu verdeutlichen, sind Extremstadien gewählt (farbig und grau), aus denen die 5° Rotation an der Berührungsfläche zwischen 19S und 20S ersichtlich wird (Walz *et al.*, 1998). Strukturen des 19S Komplexes sind weiß umrandet. (B) Schematische Darstellung des 19S regulatorischen Komplex mit interagierenden Proteinen. 19S Base Untereinheiten sind in grün, 19S Lid Untereinheiten in orange und interagierende Proteine in gelb dargestellt. Protein- Protein Interaktionen sind durch schwarze Verbindungslinien gekennzeichnet. Proteine, die mit dem 19S Komplex interagieren und deren Interaktionspartner unbekannt sind, sind ohne Verbindungslinie dargestellt. Zahlen kennzeichnen die Veröffentlichungen, in denen die Interaktionen beschrieben sind: (1) Wilkinson *et al.*, 1997; (2) Elsasser *et al.*, 2002; (3) Xie und Varshavsky 2000 sowie 2002; (4) Yen *et al.*, 2003a; (5) Tone *et al.*, 2000; (6) Leggett *et al.*, 2002; (7) Dunand- Sauthier *et al.*, 2002; (8) Papa *et al.*, 1999; (9) Kleijnen *et al.*, 2000; (10) Richmond *et al.*, 1997; (11) Verma *et al.*, 2000 (12) Tabb *et al.*, 2000; (13) Hori *et al.*, 1998; (14) Uetz *et al.*, 2000; (15) Kaiser *et al.*, 1999; (16) Fujimuro *et al.*, 1998

Rpn10/S5a stabilisiert mit dem N- terminalen Bereich (AS 1-61) die Verbindung zwischen 19S Lid und Base (Glickman *et al.*, 1998a), während der Bereich von AS 200- 230 in *S. cerevisiae* bis *H. sapiens* mindestens eine konservierte Ubiquitin bindende Domäne (UIM) beherbergt (Voges *et al.*, 1999). Rpn10 ist in *S. cerevisiae* nicht essentiell (van Nocker *et al.*, 1996). *D. melanogaster* sowie *S. cerevisiae* Rpn10 wurden in bedeutsamen Mengen in freier monomerer Form gefunden, so dass es möglicherweise nur transient an das 26S Proteasom bindet und ihm ubiquitinierte Substrate zuliefert (Haracska und Udvardy, 1995; van Nocker *et al.*, 1996).

Der 19S Lid Komplex ist essentiell für den Abbau ubiquitiniert Proteine durch das 26S Proteasom (Glickman *et al.*, 1998a). Bislang konnte jedoch nur einer Untereinheit dieses Subkomplexes eine Funktion zugeordnet werden: die von *S. cerevisiae* zu humanen

Varianten hoch konservierte (66% Sequenzidentität) Untereinheit Rpn11 besitzt im proteasomalen Kontext eine deubiquitinierende Metalloproteaseaktivität (Yao & Cohen, 2002; Maytal- Kivity *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2002). Das für die Isopeptidase Aktivität verantwortliche JAMM (von Jab1/ MPN Domänen assoziiertes Metalloisopeptidase) Motiv EX_nHXHX₁₀D beherbergt Histidin Reste, die unter Zusammenarbeit mit Aspartat ein Zink Ionen binden, das zusammen mit dem Glutamat das katalytische Zentrum der Metalloisopeptidase bildet. Interessanterweise tritt diese ATP abhängige Aktivität unter Verwendung von ubiquitiniertem Sic1 als Substrat lediglich bei Anwesenheit vollständig assemblierter 26S Proteasomen auf (Verma *et al.*, 2002), nicht aber bei Anwesenheit von rekombinantem Rpn11 oder dem 19S Lid Komplex alleine. Deshalb wird vermutet, dass andere 19S Lid Untereinheiten bei der Abtrennung der Ubiquitinkette vom Substrat mit Rpn11 kooperieren müssen.

Der Lid Komplex besteht aus acht Untereinheiten, die als Subkomplex vom 26S Proteasom abgelöst und auch wieder angelagert werden können (Glickman *et al.*, 1998a). Alle acht Untereinheiten besitzen eins von zwei strukturellen Motiven, die auch in anderen Multiproteinkomplexen gefunden worden sind (Hofmann & Bucher 1998):

- das PCI (P_{roteasom}, C_{OP9} [*constitutive photomorphogenesis*] Signalosomen, eIF3 [eukaryotischer Initiationsfaktor 3]) oder
- das MPN (M_{pr1}, P_{ad1}, N- terminal) Motiv.

Rpn3, Rpn5-7, Rpn9 und Rpn12 tragen das bis zu 200 Aminosäuren lange PCI Motiv im C- terminalen Bereich, das in den jeweiligen Proteinen für Interaktionen innerhalb des 19S Lids verantwortlich ist (Fu *et al.*, 2001). Rpn8 und Rpn11 tragen das ca. 140 Aminosäuren lange MPN Motiv in ihren N- terminalen Bereichen (Glickman *et al.*, 1998a), das vermutlich die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen vermittelt und in Rpn11 das JAMM Motiv beherbergt. Die Ähnlichkeiten zwischen dem 19S Lid Komplex und dem COP9 Signalosomen bzw. dem eIF3 Komplex gehen soweit, dass Sequenzhomologien zwischen allen acht COP9 Signalosomen sowie drei eIF3 Komplex Untereinheiten zu bestimmten 19S Untereinheiten bestehen (zusammengefasst in Voges *et al.*, 1999). Auch funktionell besteht zwischen dem 19S Lid Komplex und dem COP9 Signalosomen, das im wesentlichen für die Phosphorylierung verschiedener regulatorischer Proteine verantwortlich ist und als negativer Regulator der SCF (E3) Ubiquitin Ligase beschrieben ist, eine Ähnlichkeit. Die COP9 Signalosomen Untereinheit Csn5 forciert die Abspaltung der Ubiquitin ähnlichen Markierung Nedd8 von den Cullin Untereinheiten des SCF Komplexes mit Hilfe des JAMM Motivs seiner MPN Domäne (Cope *et al.*, 2002). Nur Rpn12 scheint kein homologes Protein in anderen Multiproteinkomplexen zu besitzen. Aufgrund dessen und aufgrund der gezeigten Interaktion mit Rpn2, könnte dieses Protein die Verbindung zwischen 19S Lid und 19S Base stabilisieren (Yokota *et al.*, 1996). Rpn12 wurde ursprünglich als Protein beschrieben, das die nukleäre Integrität aufrechterhält und für die Aktivierung der Cdc28 Kinase notwendig ist (Nisogi *et al.*, 1992; Kominami *et al.*,

1995). Bis auf Rpn9 sind alle 19S Lid Untereinheiten essentiell (Winzeler *et al.*, 1999; Rpn9: Hori *et al.*, 1998). Die humane, zu Rpn11 sequenzzhomologe Untereinheit S12/Rpn8, bietet wie die 19S Base Untereinheiten eine Interaktionsfläche für die Bindung zwischen 19S Partikel und 20S Proteasom (Dubiel *et al.*, 1995).

In Immunpräzipitationen mit 19S Untereinheiten finden sich weitere Proteine, deren Assoziation mit dem 19S Regulator so häufig gefunden wurde, dass eine Unterscheidung in Proteasomen interagierende Proteine (PIP) und proteasomale Untereinheiten nur schwer getroffen werden kann. So schlagen Verma und Mitarbeitende (2000) eine Umbenennung des 17,9 kDa Proteins Daq1 in Rpn13 vor, da dieses Protein stöchiometrisch mit dem 19S Regulator präzipitiert und eine Deletion des entsprechenden Gens in *S. cerevisiae* zur Anreicherung ubiquitinerter Proteine führt. Das Protein Rpn4 wurde als integraler Bestandteil des Proteasoms postuliert, da es im Glyceroldichtegradienten mit dem 26S Proteasom cofraktioniert, anti Rpn4 Antikörper an aufgereinigtes 26S Proteasom bindet und eine Deletion des entsprechenden Gens in proteasomalen *nin1-1* (Rpn12) und Δ Rpn10 Mutanten synthetisch lethal ist (Fujimuro *et al.*, 1998). Da die Lebensdauer von Rpn4 sehr viel kürzer ist, als die des 19S Komplexes und gezeigt wurde, dass es vor allem an Transkriptionsprozessen beteiligt ist wird Rpn4 eher als PIP angesehen (Mannhaupt *et al.*, 1999). Die beiden in *S. cerevisiae* nicht essentiellen Proteine Ubp6 und Nas6 werden ebenfalls oft in Assoziation mit dem 26S Proteasom gefunden, sind aber aufgrund ihres substöchiometrischen Anteils in diesen Präzipitationen als PIPs klassifiziert (Verma *et al.*, 2000). Weitere mit 19S regulatorischen Partikeln interagierende Proteine sind in Abb. 3 B aufgeführt.

1.3 Regulation des Ubiquitin- Proteasom Systems

Das Ubiquitin- Proteasom System bietet der Zelle auf den Ebenen der Ubiquitinierung und der proteasomalen Aktivität verschiedenste regulatorische Eingriffsmöglichkeiten. So kann sowohl die feinabgestimmte Degradation von einzelnen Proteinen als auch eine breite Antwort auf äußere Einflüsse wie z. B. Hitzestress regulatorisch beeinflusst werden. Die Regulation des Abbaus einzelner Proteine geschieht im allgemeinen auf der Ebene der Ubiquitinierung. Dabei wird entweder die Bindung des Substrats an die entsprechende E3 Ligase durch posttranslationale Modifikationen oder strukturelle Veränderungen des Substrats variiert oder die Aktivität des spezifischen E2/E3 Ligase Komplexes moduliert (zusammengefasst in Glickman & Ciechanover, 2002). Der massive Proteinabbau in Folge von äußeren Faktoren, wie oxidativem oder Hitzestress, Hungerbedingungen oder DNA Schädigungen, als auch in höheren Eukaryonten unter pathologischen Bedingungen, wie bei Krebs, schweren Blutvergiftungen oder metabolischer Übersäuerung hat im allgemeinen eine Hochregulierung des gesamten Ubiquitin-Proteasom Systems zur Folge (Lecker *et al.*, 1999). Die konzertierte, transkriptionelle Hochregulierung der entsprechenden Gene dieses Systems wird in *S. cerevisiae* über das nonamere Proteasomen assoziierte Kontrollelement (*proteasome-associated control*

element; PACE) gesteuert. Es sind 111 Gene bekannt, die innerhalb des Promotorbereichs diese transkriptionsaktivierende PACE Sequenz tragen. Mindestens 30 dieser Gene sind Gene des Ubiquitin- Proteasom Systems (Mannhaupt *et al.*, 1999). Als an diese Sequenz bindender Transkriptionsaktivator, wurde das nicht essentielle Protein Rpn4 identifiziert. Da es sich bei Rpn4 um ein extrem kurzlebige Protein handelt ($t_{1/2} \sim 2\text{min}$), dessen Expression den normalen Expressionslevel der proteasomalen Untereinheiten aufrecht erhält, wurde von Xie und Varshavsky (2001) postuliert, dass die intrazelluläre Proteolyse über einen negativen Feedbackmechanismus durch Rpn4 gesteuert wird: dasselbe Protein, das für die Proteasomensynthese verantwortlich ist, würde vom aktiven Proteasom degradiert werden.

In humanen Zellen sind bisher keine einheitlichen transkriptionellen Regulationselemente für das Ubiquitin- Proteasom System beschrieben. Zur Optimierung der Antigenprozessierung und Präsentation induziert jedoch das Zytokin Interferon γ in humanen Zellen den Austausch aller proteolytisch aktiven, 20S β Untereinheiten gegen die Immununtereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ sowie den Austausch des 19S Regulators gegen den proteasomalen Aktivator-Komplex PA28 (zusammengefasst in Kloetzel, 2001).

1.4 Biogenese des 26S Proteasoms in *S. cerevisiae*

Damit funktionelle 26S Proteasomen entstehen, müssen 62 proteasomale Untereinheiten zusammenfinden. Der zeitliche und strukturelle Verlauf dieses Prozesses ist jedoch nur bruchstückhaft bekannt und beschränkt sich im wesentlichen auf die isolierbaren Vorläuferkomplexe des 20S Proteasoms. Da 20S Proteasom und 19S Regulator-Komplex in Zelllysaten in freier Form vorkommen können und unter Inkubation mit ATP wieder zum 26S Proteasom reassoziieren (DeMartino *et al.*, 1996), wird davon ausgegangen, dass diese Subkomplexe stabile Vorläuferkomplexe des Proteasoms darstellen. Die Aktivität gegen fluorogene Peptide dient dabei im allgemeinen zur Unterscheidung zwischen reifen 20S Proteasomen und deren Vorläuferkomplexen. Da fünf der sieben β Untereinheiten als Proprotein synthetisiert werden und deshalb Propeptide tragen, die erst in späten Assemblierungsstadien der 20S Biogenese autokatalytisch prozessiert werden, sind Vorläuferkomplexe des 20S Proteasoms proteolytisch inaktiv (Chen & Hochstrasser, 1996; Schmidtke *et al.*, 1996).

Die frühesten, aus *S. cerevisiae* isolierbaren Vorläuferkomplexe des 20S Proteasoms sind die sogenannten „15S precursor Komplexe“ oder halbe Kernpartikel (hCP: *half core particle*), die vermutlich aus den ringförmig angeordneten α Untereinheiten, den katalytischen, unprozessierten β Untereinheiten sowie dem proteasomalen Maturierungsfaktor Ump1 (ub- mediated proteolysis) bestehen (Chen & Hochstrasser, 1996; Ramos *et al.*, 1998). Anhand der Coimmunpräzipitation von halben Kernpartikeln mit Hilfe des Protein A markierten Ump1 aus *S. cerevisiae* Lysaten, konnte gezeigt werden, dass diese Komplexe alle 20S proteasomalen Untereinheiten mit Ausnahme von

$\beta 6$ und $\beta 7$ beherbergen (Lehmann *et al.*, 2002). Im weiteren Verlauf der Biogenese lagern sich nach dem Modell von Chen und Hochstrasser (1996) zwei halbe Kernpartikel zu einem instabilen Vorläuferkomplex, dem sogenannten Pre- holo- Proteasom oder naszierenden Kernpartikeln (n- CP: *nascent core particle*), zusammen. Ump1 wird dabei im Inneren des Komplexes eingeschlossen und beeinflusst die koordinierte Prozessierung der Propeptide der β Untereinheiten, bevor es vom aktiven 20S Proteasom abgebaut wird (Ramos *et al.*, 1998; Witt *et al.*, 2000). In diesem späten Stadium der Assemblierung assoziiert Blm3 mit den naszierenden Kernpartikeln und verhindert vermutlich die vorzeitige Prozessierung der β Untereinheiten (Fehlker *et al.*, 2003). Sowohl Ump1 als auch Blm3 sind in *S. cerevisiae* nicht essentiell.

Die Biogenese des 19S Partikels ist weitestgehend ungeklärt. Da mit Hilfe von *yeast two-hybrid* Untersuchungen keine Interaktionen zwischen 19S Base und 20S Proteasom bzw. zwischen 19S Lid und 19S Base gefunden werden konnten, wird angenommen, dass diese Subkomplexe sich vor der 19S bzw. 26S Assemblierung stabil formieren müssen (Fu *et al.*, 2001). Bisher sind lediglich Proteine bekannt, die für die Stabilität des 19S Lid Komplexes verantwortlich sind. So destabilisiert die Depletion der essentiellen Rpn6 Untereinheit 19S Regulatoren derart, dass über Affinitätschromatographie aufgereinigte Proteasomen nahezu keine 19S Lid Untereinheiten mehr enthalten (Santamaria *et al.*, 2003). Eine ähnliche destabilisierende Wirkung auf den 19S Komplex hat wie bereits erwähnt die Deletion von Rpn10 (Glickman *et al.*, 1998a). Die Deletion von Rpn9, der zweiten nicht essentiellen Untereinheit des 19S Lid Komplexes, führt dazu, dass kein Rpn10 in Proteasomen dieser Zellen inkorporiert wird (Takeuchi *et al.*, 1999). Während die Deletionen von Rpn10 und Rpn9 nur unter Stressbedingungen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des 19S Komplexes zeigen, geht die Depletion von Rpn6 mit massiven Zellzyklusdefekten, Anreicherung ubiquitiniertes Substrate sowie Aktivitätsverlusten einher. Des Weiteren wurden zwei nicht proteasomale Proteine gefunden, die an der Assemblierung des 19S Komplexes beteiligt sind: In *Schizosaccharomyces pombe* konnte gezeigt werden, dass Yin6, dessen Mammalia Homolog Int6 an der Tumorgenese von Brustkrebs beteiligt ist, für die korrekte nukleäre Lokalisation von Rpn5 und damit für die korrekte Assemblierung des 19S Lids verantwortlich ist (Yen *et al.*, 2003). Und Tone und Toh-e (2002) postulieren ein Modell wonach das essentielle Protein Nob1 (für „*nin one binding protein*“ = Rpn12 bindendes Protein) in Analogie zu Ump1 zunächst an die neu generierten 19S Komplexe gebunden vorliegt, im Zellkern die Assemblierung zum 26S Proteasom katalysiert und anschließend vom aktiven 26S Proteasom degradiert wird. Gestützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen, die zeigen, dass das Protein in *yeast two hybrid* Experimenten mit Rpn12 interagiert, dass eine temperatursensitive Mutation in diesem Gen unter restriktiven Bedingungen zu einer Delokalisation proteasomaler Untereinheiten ins Cytoplasma führt und die proteasomale Aktivität stark abnimmt sowie dass das Protein mit Rpt1 coimmunpräzipitiert (Tone und Toh-e, 2002;

Tone *et al.*, 2000). Es gibt jedoch widersprüchliche Veröffentlichungen, nach denen Nob1 18S rRNA 3'Endonukleaseaktivität besitzt und auf dem Weg aus dem Zellkern ins Cytoplasma an die 40S ribosomalen Vorläuferpartikel gebunden vorliegt (Schäfer *et al.*, 2003; Fatica *et al.*, 2003). Demnach ist das evolutionär konservierte Nob1 vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert und trägt in seinem C- Terminus eine RNA bindende Domäne und an seinem N- Terminus eine PIN Domäne, für die eine RNase Aktivität postuliert wurde. Fatica und Mitarbeitende konnten in ihren Untersuchungen keine Assoziation oder Cosedimentation von Nob1 mit den 26S proteasomalen Untereinheiten feststellen.

Die geregelte Assoziation und Dissoziation von 19S Komplexen an 20S Proteasom ist bisher nur in Mammalia Zellen gezeigt worden. So steuert bei 26S Proteasomen, die aus Herzmuskelzellen vom Schwein isoliert wurden, die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der ATPase Rpt6 die Assoziation bzw. Dissoziation des 19S Komplexes an das 20S Proteasom (Sato *et al.*, 2001). Die von einer mit dem 19S assoziierten Kinase phosphorylierte Rpt6 Untereinheit des 19S Komplexes bindet direkt an die $\alpha 2$ sowie $\alpha 1$ Untereinheit des 20S Proteasoms und wird erst nach der Dephosphorylierung wieder abgelöst. In Erythrozyten des Schweins wird die Assoziation des 19S Komplex mit dem 20S Proteasom durch die Anwesenheit des Modulatorkomplex bestehend aus p42/ Rpt4, p50/ Rpt5 sowie p27 um das achtfache stimuliert (DeMartino *et al.*, 1996). Der Modulatorkomplex vermittelt dabei die Assoziation der proteasomalen Subkomplexe, ist aber nicht mehr mit den aktiven 26S Proteasomen assoziiert (Adams *et al.*, 1997).

In *S. cerevisiae* wird dem nicht essentiellen, 210 kDa Protein Ecm29 (*extracellular mutant 29*) eine ähnliche Funktion zugeschrieben. Leggett und Mitarbeitende (2002) konnten zeigen, dass Ecm29 mit 20S Proteasomen verbunden ist und dass die Assoziation von 19S Partikeln mit 20S Proteasomen in Δ ecm29 Stämmen gestört ist.

1.5 Intrazelluläre Lokalisation von Proteasomen

Abgesehen davon, dass Proteasomen sowohl in Mammalia als auch in *S. cerevisiae* Zellen in Zytoplasma und Zellkern lokalisieren, unterscheiden sich die Ergebnisse der zahlreichen Untersuchungen zur proteasomalen Verteilung erheblich in Abhängigkeit von der Untersuchungsmethode, des untersuchten Zelltyps, der Zellzyklusphase und den Wachstumsbedingungen der untersuchten Zellen. Nach einheitlicher Aussage verschiedener Arbeitsgruppen sind Proteasomen jedoch mit Ausnahme der Vakuole gleichmäßig über das Zytoplasma verteilt und zeigen außerdem eine etwas stärkere Lokalisation im Zellkern mit Ausnahme der Nukleoli (zusammengefasst in Gordon, 2002, Wojcik und DeMartino, 2003).

Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigen, dass weniger als 20% der 26S Proteasomen cytoplasmatisch lokalisiert sind (Russell *et al.*, 1999; Enenkel *et al.*, 1998). Vielmehr lokalisieren sie über den gesamten Zellzyklus, der in *S. cerevisiae* ohne das Auflösen der

Kernmembran einhergeht, an Kernmembran und assoziiertem ER (Enekel *et al.*, 1998). In *S. pombe* Zellen dagegen, die hinsichtlich verschiedener Aspekte der chromosomalen Struktur, der Genregulation, des Zellzyklus und der Signalweiterleitung höheren Eukaryonten evolutionär ähnlicher sind als *S. cerevisiae* Zellen, verteilen sich die Proteasomen im Endstadium der Meiose II kurzzeitig über die gesamte Zelle bevor sie in den neu formierten Sporen wieder in der nukleären Peripherie relokalisieren (Wilkinson *et al.*, 1998). Die Kernmembran und assoziiertes ER bzw. die nukleäre Peripherie lässt sich durch *in vivo* fluoreszenzmikroskopische Methoden in Hefen nicht auflösen, so dass die Frage, ob Proteasomen hauptsächlich im oder am Zellkern lokalisiert sind, nicht eindeutig geklärt war. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Immunogold markiertem Rpn11 an der inneren Kernmembran in *S. pombe* Zellen konnten jedoch belegen, dass ein großer Anteil der Proteasomen nukleär lokalisiert ist (Wilkinson *et al.*, 1998).

Die Lokalisation der Proteasomen ist in humanen Fibrosarkoma Zellen, solange die Kernmembran intakt ist, nukleär. Löst sich die Membran während der Metaphase/Anaphase auf, verteilen sich die Proteasomen in der gesamten Zelle, um mit der Formation der neuen Kernmembran in den Tochterzellen wieder in den Zellkern aufgenommen zu werden (Reits *et al.*, 1997).

Da *S. cerevisiae* Zellen eine geschlossene Mitose vollziehen, können Proteasomen nicht durch den Aufbau einer neuen Kernmembran in den Zellkern eingeschlossen werden, sondern müssen über die Kernporen importiert werden. Für das 20S Proteasom konnte gezeigt werden, dass die für den Kerntransport verantwortlichen Transportrezeptoren an halbe Kernpartikel binden und mit deren Hilfe über die Kernmembran in den Zellkern gelangen (Lehmann *et al.*, 2002). Erst im Zellkern findet die Assoziation zum 20S Proteasom unter Assistenz von Blm3 und Abbau von Ump1 statt (Fehlker *et al.*, 2003). Die N- terminalen Sequenzen der 20S α Untereinheiten beherbergen Kernlokalisierungssignale, die vermutlich nach der Formierung des 20S Proteasoms durch strukturelle Umlagerungen unzugänglich sind, so dass bisher kein Kernimport von reifen 20S Proteasomen bzw. keine Bindung der Transportrezeptoren an das reife 20S gezeigt werden konnten.

1.6 Allgemeine Mechanismen des Kerntransports

Der Zellkern eukaryonter Lebewesen enthält die DNA als Heterochromatin in räumlicher Trennung zum Cytoplasma. Hier findet u. a. die Verdopplung des Genoms (Replikation), das Ablesen (Transkription) der Strukturgene in mRNA und die Assemblierung der Ribosomen statt. Das Zellkerninnere ist durch die doppelschichtige Kernmembran, die sich in das Membransystem des rauen endoplasmatischen Retikulums fortsetzt, vom Cytoplasma getrennt. Um einen geregelten Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten zu gewährleisten, ist die Kernmembran mit ca. 100 nm breiten Kernporen (*nuclear pore complex*, NPC) durchsetzt, die eine achtfache Rotationssymmetrie aufweisen und in *S.*

cerevisiae einen Proteinkomplex von ca. 30 verschiedenen Nukleoporinen mit einer Gesamtmasse von 50 MDa ausmachen (Rout *et al.*, 2000). Der vermutlich effektive Durchmesser des Transportkanals durch eine *Xenopus* Oozyten Kernpore beträgt lediglich 50 nm (Stoffler *et al.*, 2003). Die Nukleoporine erfüllen nicht nur eine strukturelle Aufgabe, sondern dienen auch als Interaktionsfläche für Transportrezeptoren (Rout *et al.*, 2003). Für den Transport durch die Kernporen wird unterschieden zwischen dem aktiven Transport und der freien Diffusion von Ionen und Metaboliten. Makromoleküle, die nicht mit der Kernpore interagieren, können ebenfalls durch Diffusion in den/ aus dem Zellkern gelangen. Die Effizienz der diffusiven Translokation ist jedoch nur für Proteine mit einem Durchmesser bis zu 9 nm hoch und ist darüber hinaus umgekehrt proportional zur Größe des Moleküls (Paine *et al.*, 1975). Die obere Ausschlussgrenze für einen diffusiven Transport über die Kernmembran in weniger als 24 Stunden scheint bei ca. 50 kDa zu liegen. Dagegen erreichen Proteinkomplexe, die mit Hilfe eines Transporters durch die Kernporen gelangen, Größen von bis zu 39 nm oder 2,5 MDa (z.B. Export von pre 60S ribosomalen Komplexen) (Pante und Kann, 2002). Allein die Betrachtung der Ribosomen Biogenese einer schnell wachsenden *S. cerevisiae* Kultur veranschaulicht die hohe Bedeutung des aktiven Kerntransports für die Zelle. Für die Verdopplung der Ribosomenanzahl innerhalb eines 1,5 stündigen Zellzyklus müssen ca. 150000 Proteine pro Minute in den Zellkern gelangen und gleichzeitig ca. 4000 ribosomale Untereinheiten aus dem Zellkern hinaus transportiert werden (Warner 1999). Diese Transportvorgänge werden vornehmlich durch die für die Zelle lebensnotwendigen Transportrezeptoren ausgeführt. Je nach Richtung des Transports, werden die Transporter in Importine (auch Karyopherine genannt) und Exportine unterteilt.

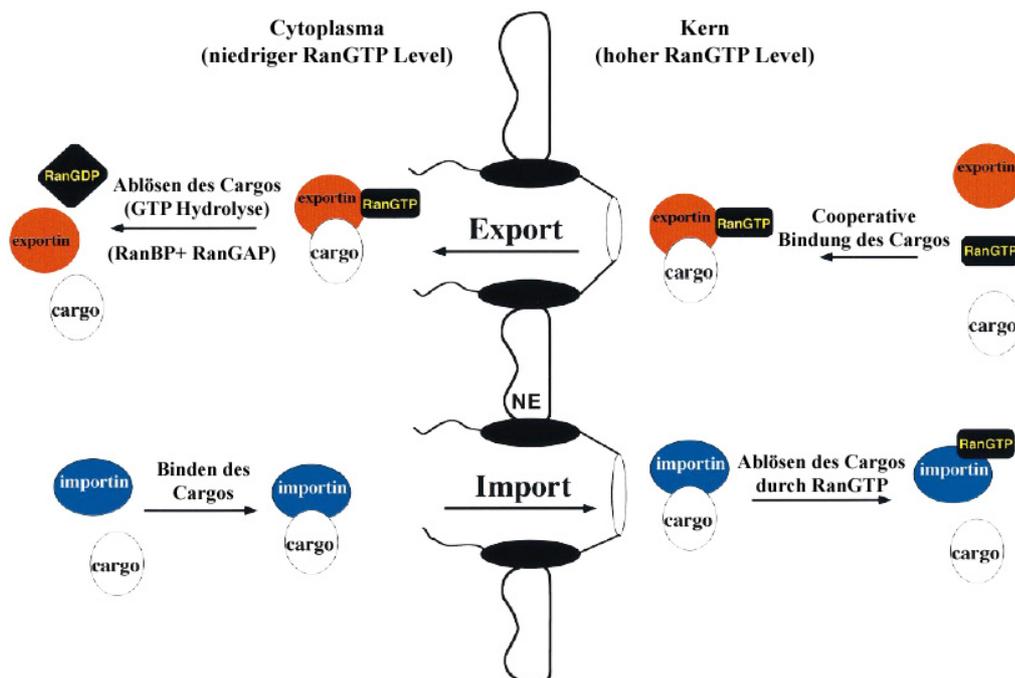


Abb. 4: Transportvorgänge über die Kernmembran aus Görlich, 1998

Alle Transportrezeptoren haben gemeinsam, dass sie direkt mit den Kernporen

interagieren können, ein N- terminales, RanGTP (Gsp1GTP in *S. cerevisiae*) bindendes Motiv tragen und eine Verwandtschaft zu Karyopherin β zeigen (Görlich *et al.*, 1997). Das generelle Prinzip des aktiven Transports beruht auf der starken Affinität der Transporter zu der GTP gebundenen Form der GTPase Ran und einem RanGTP Gradienten zwischen Cytoplasma und Kern, der die Im- und Exportvorgänge antreibt. Abb. 4 zeigt ein Schema dieser Prozesse. Der bestehende RanGTP Gradient wird aufrecht erhalten, indem Ran in der GDP gebundenen Form mit Hilfe des 15 kDa großen, Homodimer bildenden Importrezeptors NTF2 (*nuclear transport factor 2*) über die Kernporen geleitet wird und im Kern unter Stimulation des Nukleotid Austausch Faktors (RanGEF, *nucleotide exchange factor*: RCC1 in humanen Zellen, Prp20 in *S. cerevisiae*) in RanGTP überführt wird. Als GTP assoziierte Form verliert Ran seine Affinität zu NTF2, besitzt aber eine hohe Affinität zu den Transportrezeptoren. Auf der cytoplasmatischen Seite wird die GTPase Aktivität von Ran durch RanBP1 (*Ran binding protein 1*, Yrb1 in *S. cerevisiae*) und RanGAP1 (*Ran GTPase activating protein 1*, Rna1 in *S. cerevisiae*) stimuliert und der Exportkomplex aufgespalten, indem RanGTP beim Austritt aus der Kernpore zu RanGDP konvertiert wird (Görlich & Kutay, 1999).

Die Familie der Karyopherin Transportrezeptoren umfasst in *S. cerevisiae* 14 Proteine mit Molekulargewichtsgrößen von 90- 130 kDa (Görlich *et al.*, 1997). Karyopherin β (auch Kap β 1, Importin β oder kap95 genannt) ist das als erstes entdeckte und am besten charakterisierte Protein. Die Karyopherine werden auch Importin- β ähnliche Proteine genannt, obgleich die Sequenzähnlichkeit der Karyopherin Transportrezeptoren in vielen Fällen noch unter 20% Aminosäureidentität liegt und meistens nur auf die aminoternale, RanGTP bindende Domäne begrenzt ist. Trotzdem zeigen alle Rezeptoren eine starke Strukturhomologie. Charakteristisch sind sich wiederholende, α - helicale HEAT Strukturen, die aus einer gebogenen sowie einer geraden Helix bestehen und parallel zueinander angeordnet eine spiralförmige Proteinstruktur ergeben, wie Kristallstrukturen von Karyopherin β (vgl. Abb. 5A) und Transportin zeigen (Cingolani *et al.*, 1999 und Chook & Blobel 1999). Unter den 14 Karyopherinen sind 3 Exportine (Crm1/ Xpo1, Cse1, Los1) und 10 Importine (Kap95, Kap104, Kap108, Kap111/ Mtr10, Kap114, Kap119/ Nmd5, Kap121/ Pse1, Kap122/ Pdr6, Kap123/ Yrb4, Lph2), die unterschiedliche Substrate binden können (Görlich *et al.*, 1997; Wozniak *et al.*, 1998). Kap142 fungiert als Im- und Exportin (Yoshida & Blobel, 2001). Bis heute wurden für die 10 bekannten Importine jeweils ca. 2-4 Cargosubstrate gefunden. Da 1000 bis 2000 Proteine permanent oder zeitweise kernlokalisiert sind, wird vermutet, dass jedes Importin mehrere Substrate bindet (Mosammamaparast *et al.*, 2001). Für humanes Karyopherin β wurde gezeigt, dass es eine Reihe verschiedener Cargo Substrate direkt bindet, wie z.B. ribosomale Proteine, virale Proteine, Cyclin B1 und die T- Zell Protein Tyrosin Phosphatase (Übersicht in Ström & Weis, 2001). Die meisten Substrate, die über Karyopherin β importiert werden, sind jedoch Kernlokalisierungssignale (NLS; *nuclear localisation signal*) tragende Proteine.

Diese binden nicht direkt an Karyopherin β sondern an das Adapterprotein Karyopherin α (auch Kap α , Kap60, Importin α oder Srp1), dessen stark basische Importin β bindende (IBB; *Importin β binding*) Domäne Karyopherin β an dessen konkaver Seite erkennt und bindet (Abb. 5). *S. cerevisiae* besitzt nur Kap α als Adapterprotein, in humanen Zellen dagegen sind bislang 6 verschiedene Karyopherin α Varianten gefunden worden. Keine dieser Isoformen kann eine *S. cerevisiae* SRP1 Mutation komplementieren, so dass davon ausgegangen wird, dass die Karyopherin α Isoformen in höheren Eukaryonten spezialisierte Aufgaben übernehmen und nur bestimmte Zielproteine binden (Nachury *et al.*, 1998; zusammengefasst in Jans *et al.*, 2000). Nur vier der 14 Karyopherine sind in *S. cerevisiae* in den verschiedenen untersuchten Stammhintergründen lebensnotwendig: die Importine Kap95/ Karyopherin β und Kap121/ Pse1 sowie die Exportine Cse1 und Crm1 (zusammengefasst in Görlich & Kutay, 1999). Die Tatsache, dass nicht essentielle Karyopherine für den Import essentieller Proteine verantwortlich sind [z.B. Kap114 für *TATA binding protein* (TBP)- Import], legt nahe, dass einige Proteine der Karyopherin Familie überlappende Funktionen besitzen (Pemberton *et al.*, 1999). Für bestimmte Importwege, wie z. B. dem der ribosomalen Proteine und dem der Histone, sind sogar mehrere Karyopherine verantwortlich (Kap121, Kap123, Kap108 bzw. Kap114, Kap121, Kap123, Kap95) und untereinander austauschbar (Rout *et al.*, 1997; Mosammaparast *et al.*, 2001).

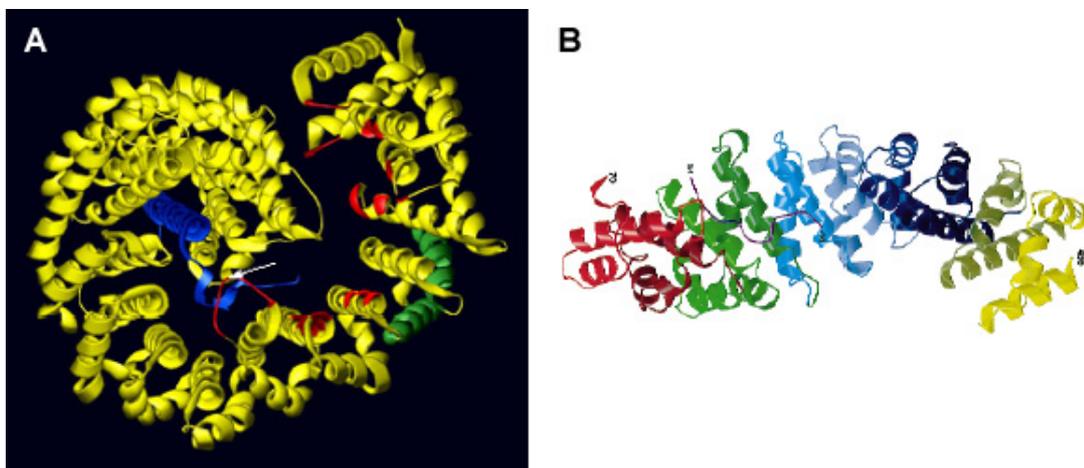


Abb. 5: (A) Struktur von Importin β gebunden an die IBB Domäne von Importin α (Ström & Weis, 2001). Importin β (gelb) bildet mit den 19 HEAT Sequenzen eine schneckenartige Struktur um die IBB Domäne von Importin α (blau). Helices, die wichtig für die Interaktion mit den Nukleoporinen und RanGTP sind, sind in grün bzw. rot dargestellt. Der weiße Pfeil kennzeichnet den Bereich saurer Aminosäuren, der sowohl zu RanGTP als auch zur IBB Domäne Kontakt hat. **(B)** Struktur von Maus Importin α mit der autoinhibitorischen N- terminalen IBB Domäne in Magenta und den verschiedenen Armadillo Motiv Wiederholungen in unterschiedlichen Farben dargestellt (Kobe, 1999).

Die Erkennung zwischen Substrat und Transporter geschieht mittels Kernlokalisationsignalen (NLS) bzw. Kernexportsignalen (NES= *nuclear export signal*) im Falle des Kernimports bzw. -exports. Beispiele für beide Signalsequenzen sind in Tab. 1 dargestellt. Die sogenannten klassischen NLS (cNLS) binden an Kap α / Srp1 und lassen sich anhand der Anzahl, der in die Bindung involvierter, lysinreicher Sequenzen in

monopartite und bipartite NLS unterscheiden. Kristallstrukturen von Peptiden beider Varianten mit Karyopherin α konnten die in Tab. 1 abgebildeten Konsensussequenzen für die Bindung zwischen Karyopherin α und cNLS bestätigen (vgl. Abb. 7) (Fontes *et al.*, 2000 und 2003). Bisher untersuchte NLS, die an Kap121/ Pse1 binden, sind alle basisch, zeigen aber keine offensichtliche Sequenz- Übereinstimmung (Leslie *et al.*, 2002; Chaves & Blobel, 2001; Delahodde *et al.*, 2001; Kaffman *et al.*, 1998; Mosammaparast *et al.*, 2001; Rout *et al.*, 1997). In einigen Untersuchungen wurden sehr große, mit dem Karyopherin interagierende NLS Bereiche gefunden, die zu der Annahme führten, dass die Erkennung der NLS durch Kap121/ Pse1 in ihrer Sekundärstruktur begründet liegt. Typische NES sind durch hydrophobe, leucinreiche Bereiche gekennzeichnet. Als Konsensussequenz ist 1997 von Iovine und Wente folgende Sequenz aufgrund des Vergleich verschiedener NES postuliert worden: $L(X)_n LXXLXL/I$.

Tab. 1: Substrate und deren Signalsequenzen der Importin- β ähnlichen Proteine. Die unterstrichene Sequenz in Spo12 ist ausreichend für die Translokation des Proteins in den Zellkern. Abkürzungen: HTLV-1: human T-cell leukemia virus type 1; Mouse importin- α IARS: autoinhibitorische pseudo- NLS von Importin α

Protein	Kernlokalisierungssignal Srp1	Referenz
SV40 large- T antigen	P <u>K K K R K V</u>	Kalderon <i>et al.</i> , 1984b
H2B	G <u>K K R S K V</u>	Moreland <i>et al.</i> , 1987
Mouse importin- α IARS	D E Q M L <u>K R R N V S</u>	Kobe & Kemp, 1999
Monopartite NLS Konsensus	<u>K R/K x R/K</u>	Chelsky <i>et al.</i> , 1989
Nucleoplasmin	<u>K R P A A T K K A G Q A K K K K</u>	Dingwall & Laskey, 1991
c- Myc	<u>K R V K L P A A K R V K</u>	Fontes <i>et al.</i> , 2003
Gcn4	<u>K R A R N T E A A R R S R A R K L Q R</u>	Pries <i>et al.</i> , 2003
Bipartite NLS Konsensus	<u>K R</u> _{x₁₀₋₁₂} <u>K R x K</u>	Fontes <i>et al.</i> , 2003
Kernlokalisierungssignal Kap95		
IBB Domäne von Srp1	<u>Y R R T N F K N K G R F S A D E L R R R R D T Q Q</u> <u>V E L R K A K R D E A L A K R R N F I</u>	Görllich <i>et al.</i> , 1996; Weis <i>et al.</i> , 1996
Rex Protein des HTLV-1	<u>M P K T R R R P R R S Q R K R P P T</u>	Palmeri & Malim, 1999
Kernlokalisierungssignal Kap108		
Lhp1	AS 112- 224 (RNA bindenden Domäne)	Rosenblum <i>et al.</i> , 1997 und 1998
Kernlokalisierungssignal Kap111		
Npl3	AS 283- 414 (RNA bindende Domäne)	Senger <i>et al.</i> , 1998
Kernlokalisierungssignal Pse1		
Pho4	P Y L N <u>K R K G K P</u>	Kaffman <i>et al.</i> , 1998
Pdr1	I Y <u>K S W T D M N K I L L D F D N D Y S V Y R S F A</u> H Y S I S C I I L V S Q A F S V A E	Delahodde <i>et al.</i> , 2001
Spo12	<u>K K S T S N L K S S H T T S N L V K K T M F K R D L</u> <u>L K Q D P K R K L Q L Q Q R F A S P T D</u>	Chaves & Blobel, 2001
Kernexportsignal Crn1		
Nmd3	<u>I N I D E L L D E L</u>	Ho <i>et al.</i> , 2000
Inhibitor der cAMP abhängigen Protein Kinase	<u>L A L K L A G L D I</u>	Wen <i>et al.</i> , 1995
Kap95	<u>L E G R I L A A L T L</u>	Iovine und Wente, 1997
HIV Rev	<u>L P P L E R L T L</u>	Fischer <i>et al.</i> , 1995

Das Adapterprotein Srp1 ist das Produkt eines essentiellen Gens in *S. cerevisiae* und wurde ursprünglich als der Suppressor von temperatursensitiven RNA Polymerase I Mutationen gefunden (Yano *et al.*, 1992). Das 60 kDa Protein beherbergt im wesentlichen zwei Interaktionsdomänen: eine große NLS bindende Region, die aus Armadillo Motiven besteht, und eine stark basische, aminoternale IBB Domäne, die in der Lage ist, sich autoinhibitorisch an die NLS bindende Region anzulagern (vgl. Abb. 7) (Conti *et al.*, 1998; Kobe 1999). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Affinität von Karyopherin α zur NLS unter Bindung von Karyopherin β drastisch ansteigt (Rexach & Blobel, 1995). Im Cytoplasma ist die autoinhibitorische Sequenz durch die Assoziation von Karyopherin α mit Karyopherin β maskiert und dies führt zu einer starken Bindung des Substrats an das Adapterprotein. Im Zellkern führt vermutlich das Ablösen von Karyopherin β zu einer Verdrängung des Substrats durch die autoinhibitorische Sequenz von Karyopherin α (Harreman *et al.*, 2003).

Die Zelle ist in der Lage die Effizienz des Kerntransports sowohl auf quantitativer als auch auf qualitativer Ebene zu regulieren. So werden in differenzierten humanen Leukämie Zelllinien Karyopherin $\alpha 1$ und $\alpha 2$ etwa gleich stark exprimiert, während schlecht differenzierte Zelllinien nur eine Isoform und diese in geringerer Menge enthalten (Nadler *et al.*, 1997). Ebenso kann sich der Level der mRNA Expression der Karyopherin α Isoformen in verschiedenen Geweben unterscheiden, was zu der Annahme führte, dass die verschiedenen Karyopherin α Isoformen in höheren Eukaryonten differenziell exprimiert werden (Köhler *et al.*, 1997; Nachury *et al.*, 1998). Eine generelle Herabregulation der Karyopherin β und Transportin vermittelten Kernimportmaschinerie in permeabilisierte HeLa Zellen wurde *in vitro* außerdem durch Gabe von Phosphatase Inhibitoren gezeigt (Kehlenbach und Gerace, 2000). Auf qualitativer Ebene stellt die Erkennung bzw. Zugänglichkeit der NLS eines Proteins durch Karyopherin α einen kritischen Parameter in der Effizienz des Imports in den Zellkern dar. Variationen der Importrate bestimmter Proteine können z. B. durch Phosphorylierungen oder inter- bzw. intramolekulare Maskierungen der NLS erzielt werden. In Fusionsproteinen, in denen die SV40 NLS von Proteinkinase 2 Erkennungssequenzen flankiert wird, steigt die Erkennung der SV40 NLS durch Karyopherin α/β um den Faktor 100, wenn die benachbarten Serinreste phosphoryliert vorliegen (Xiao *et al.*, 1997 und 1998). Der Kernimport von Pho4 über Pse1 ist blockiert, wenn Serin 152 phosphoryliert ist und erst der Proteasomen abhängige Abbau des NF- κ B p65 maskierenden Proteins I- κ B α im Cytoplasma gibt die NLS von NF- κ B p65 für den Kernimport frei (Traencker *et al.*, 1994). Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei dem p50 Precursor NF- κ B p105 beobachtet, dessen C-terminaler Bereich die eigene p50/p105 NLS verdeckt (Henkel *et al.*, 1992).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Untersuchung der Transportwege und Assemblierungsprozesse zur nukleären Lokalisation des 19S regulatorischen Partikels des 26S Proteasoms in der Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Mit Beginn der Arbeit war betreffs der zellulären Lokalisation des 19S Komplexes lediglich bekannt, dass GFP markiertes Cim5/ Rpt1 in *S. cerevisiae* vorwiegend an Kernmembran/ER und GFP markiertes Mts4/ Rpn1 sowie Pad1/ Rpn11 in *S. pombe* vorwiegend an der nukleoplasmatischen Seite der Kernmembran lokalisieren (Enenkel *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998). Beide Studien belegen, dass die markierten Proteine im Glycerolgradienten in proteolytisch aktiven Fraktionen bzw. mit 20S Proteasomen cosedimentieren und deshalb vermutlich in aktive 26S Proteasomen eingebaut vorliegen. Rout und Mitarbeitende (2000) haben die 19S Base Untereinheit Rpn1 in Assoziation mit präparierten Kernporen gefunden, was darauf hindeutet, dass 19S Untereinheiten Transportprozessen über die Kernporen unterworfen sind.

Bis auf Rpn10 - 12 besitzen alle 19S Untereinheiten Molekulargewichtsgrößen ab 45 kDa und sind damit vom diffusiven Transport über die Kernporen ausgeschlossen. Unklar bleibt jedoch mit Hilfe welcher Transporter die Proteine in/an den Kern gelangen, welche Signalsequenzen dafür verantwortlich sind und ob der 19S Komplex als gesamter Komplex oder in Subkomplexen transportiert wird. Mit einer Größe von ca. 20 x 45 nm und nahezu 1 MDa erreicht der 19S Komplex fast die Ausschlussgrenze des 50 nm breiten Kernporenkanals, so dass der Transport möglicherweise in Subkomplexen stattfinden muss. In diesem Zusammenhang ist interessant, ob 19S Komplexe in Analogie zum 20S Proteasom auf dem Weg in den Zellkern koordiniert assemblieren und ob Assemblierungsintermediate dieses Komplexes zu isolieren sind. Sollte die Reifung des 26S Proteasoms aus 20S und 19S Vorläuferkomplexen im Zellkern stattfinden, könnte ein Defekt im Import des 19S Komplex aufgrund der feinabgestimmten Regulation der Expression aller 26S Untereinheiten einen Einfluss auf die Biogenese des 20S Proteasom zeigen.

In der Ausführung soll der für den Kernimport des 19S regulatorischen Partikels verantwortliche Transporter anhand ausgesuchter Kerntransportmutanten bestimmt werden, die mit dem Transporter interagierenden Signalsequenzen lokalisiert werden und die Transporterbindung *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden. Des Weiteren soll der Transportkomplex wenn möglich isoliert und näher charakterisiert werden. Die Signifikanz der Signalsequenzen für die korrekte Lokalisation des 19S regulatorischen Partikels soll anhand von Mutations- oder Deletionsstämmen bestimmt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Oligonukleotide, Vektoren, Stämme und Kultivierung von Mikroorganismen

2.1.1 Oligonukleotide

Tab. 2: Bezeichnungen und Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'→ 3')	Bemerkung
TEV fwd	AAA CAT ATG ACG TAC CTG ACT ATG CAG TCG AGAACC TGT ACT TCC AGG GC	<i>NdeI</i> , TEV Schnittstelle
TEV rev	AAA TCT AGA TCA CGA ATT CGC GTC TAC TTT CGG	<i>XbaI</i>
biNLS Rpn2 fwd	AGC TTA AAA TGA AGG CAA GGG CAA AGA AGA CAA AGA AGG AAA AGG GTC CAA ATG AGG AAG AAA AGA AAA AAG GGT AC	<i>HindIII</i> <i>KpnI</i>
biNLSRpn2 rev	CCT TTT TTC TTT TCT TCC TCA TTT GGA CCC TTT TCC TTC TTT GTC TTC TTT GCC CTT GCC TTC ATT TTA	
KEKE fwd	AAA ACT CGA GGA GCT CCA TGT CAG ATG TGG TAC CGC A	<i>XhoI</i> <i>SacI</i>
-KEKE rev	AAA AGG ATC CTG CTT CCT CAT ACA TCC T	<i>BamHI</i>
Rpn2 rev	AAA AGG ATC CAG CAC TAG GGA AGT CGA CA	Primer 8996-29 Enekel
SV40 fwd	AGC TTA AAA TGG GGC CGA AGA AGA AGA GGA AGG TCG ACG GGT AC	<i>HindIII</i> <i>KpnI</i>
SV40 rev	CCG TCG ACC TTC CTC TTC TTC TTC GGC CCC ATT TTA	<i>SalI</i>
mSV40 fwd	AGC TTA AAA TGG GGC CGA AGA CGA AGA GGA AGG TCG ACG GGT AC	<i>HindIII</i> <i>KpnI</i>
mSV40 rev	CCG TCG ACC TTC CTC TTC GTC TTC GGC CCC ATT TTA	<i>SalI</i>
Rpt2 NLS fwd	AAA AAG CTT AAA ATG GAC AAA AAG AAG AAG AAG GGA TCT	<i>HindIII</i>
Rpt2 NLS rev	AAA GGT ACC CTT CGA CTC CCT TTC TTT TCT TAC GAC C	<i>KpnI</i>
Rpt2 D1-43 fwd	AAA AGA GCT CGA AAA ATT ACC CAA CAT ATA T	<i>SacI</i>
Rpt2 D1-43 rev	AAA AGA GCT CCA TTT TAT TTT CTA TTA AAA ACG C	<i>SacI</i>
Rpt2 fwd	AAA AAA CTC GAG GTA TAC AGA ATA CAG CTT CCT	<i>XhoI</i>
Rpt2 rev	AAA AAA GGA TCC CAA GTA TAA ACC TTC TAA ATT	<i>BamHI</i>
CFP fwd	AAA AGG ATC CAC CAT GGT GAG CAA GGG C	<i>BamHI</i>
CFP rev	AAA AGG ATC CCT TGT ACA GCT CGT CCA T	<i>BamHI</i>
Rpt1 NLS fwd	AGC TTA AAA TGG AGC TCA GAG CAC GTA GAA AGG TGG CTA CTG AGA AGG ATT TCC TGA AGG CTG TTG ATA AGG AGC TCG GGT AC	<i>HindIII</i> <i>KpnI</i>
Rpt1 NLS rev	CCG AGC TCC TTA TCA ACA GCC TTC AGG AAA TCC TTC TCA GTA GCC ACC TTT CTA CGT GCT CTG AGC TCC ATT TTA	
Rpn1 orf fwd	AAA GTC GAC GAG CTC GGA TGC TAC TAC GGA CGG	<i>SalI</i> <i>SacI</i>
Rpn1 orf rev	AAA GGA TCC CTC CTC TTC ACG ATA GTC AGG	<i>BamHI</i>
Rpn1 3' fwd	AAA GAA TTC GGC AAT ATC AAC CAG AAT AGG	<i>EcoRI</i>
Rpn1 3' rev	AAA CTC GAG TTG TGG TAT CGC TGT CGG	<i>XhoI</i>
Rpn11 orf fwd	AAA GTC GAC GAG CTC CCG CGG ACA CCG GCC GTG ACG	<i>SalI</i> <i>SacI</i>
Rpn11 orf rev	AAA GGA TCC TTT AAT TGC CAC TGA ATT AAC	<i>BamHI</i>
Rpn11 3' fwd	AAA GAA TTC AGA AAG CCC ACT ACA TAT ATA	<i>EcoRI</i>
Rpn11 3' rev	AAA CTC GAG GAA GCT CCT CTA CTA GCA CCG	<i>XhoI</i>

2.1.2 Vektoren

Tab. 3: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Plasmide; X in der Plasmidbezeichnung steht für die Proteine Rpn1, Rpn11 und Rpn2

Plasmid	Bemerkungen	Herkunft
pCR2.1-TOPO	<i>lacZ, AmpR, KanR,</i>	Invitrogen
pBKS	<i>lacZ, AmpR, basiert auf pUC19</i>	Stratagen
pBSHU	<i>lacZ, AmpR, HIS3, URA3</i>	C. Enenkel
pBSFlu	<i>lacZ, AmpR, (HA)2</i>	C. Enenkel
pBSFluRpnXHA	basiert auf pBSFlu	diese Arbeit
pBSHURpnX-3'	basiert auf pBSHU	diese Arbeit
pBSHURpnXGFPHA	<i>GFP, basiert auf pBSHU</i>	diese Arbeit
pBSLeuRpnXGFPHA	<i>LEU2, basiert auf pBSHURpnXGFPHA</i>	diese Arbeit
pBSHURpn2-3'HA	<i>lacZ, AmpR, HIS3, URA3 RPN2-3'</i>	C. Enenkel
pPS1890	<i>TRP1, ECFP (pRS304)</i>	P. Silver
Dp42	<i>ARS-CEN, LEU2, rpt2RF (pRS315)</i>	D. Finley (Rubin <i>et al.</i> 1998)
pRE105	<i>ARS-CEN, LEU2, PDR5*-GFP (pRS315)</i>	R. Egner
pRE104	<i>ARS-CEN, LEU2, PDR5-GFP (pRS315)</i>	R. Egner
pG	<i>2μ URA3, GAL:GFP-S (pYES)</i>	diese Arbeit
pNLSG	<i>2μ URA3, GAL:SV40NLSGFP-S (pYES)</i>	diese Arbeit
pmNLSG	<i>2μ URA3, GAL:mutSV40NLS-GFP-S (pYES)</i>	diese Arbeit
pRpt1NLSG	<i>2μ URA3, GAL:Rpt1NLS-GFP-S (pYES)</i>	diese Arbeit
pRpt2NLSG	<i>2μ URA3, GAL:Rpt2NLS-GFP-S (pYES)</i>	diese Arbeit
pRpn2NLSG	<i>2μ URA3, GAL:Rpn2NLS-GFP-S (pYES)</i>	diese Arbeit
pRpt2H-16	<i>ARS-CEN, URA3, Rpt2 (pRS316)</i>	diese Arbeit
pRpt2H	<i>ARS-CEN, LEU2, Rpt2-HA (pRS315)</i>	diese Arbeit
pRpt2G	<i>ARS-CEN, LEU2, Rpt2-GFPHA (pRS315)</i>	diese Arbeit
pΔNRpt2H	<i>ARS-CEN, LEU2, ΔN-Rpt2-HA (pRS315)</i>	diese Arbeit
pΔNRpt2G	<i>ARS-CEN, LEU2, ΔN-Rpt2-GFPHA (pRS315)</i>	diese Arbeit
YIplac128 Pre2HA	<i>lacZ, AmpR, LEU2, PRE2-HA</i>	J. Dohmen
YIplac128 Pre4HA	<i>lacZ, AmpR, LEU2, PRE4-HA</i>	U. Düring
pZZ-HIS5	GAGAGA Linker gefolgt von TEV Schnittstelle und ZZ Domäne aus pEZZ (Pharmacia)	DNA Fragment von M. Seeger
pSW509	<i>Kap95-L63A auf pRS315</i>	Iovine und Wente, 1997
pSW636	<i>ARS-CEN, LEU2, GFP-NUP49 (pRS315)</i>	Bucci und Wente 1998
pRS315SRP1ProA	<i>ARS-CEN, LEU2, SRP1-ProA (pRS315)</i>	Enenkel <i>et al.</i> , 1995

2.1.3 Stämme und Kultivierung von Mikroorganismen

Escherichia coli

Für Klonierungen und Präparationen rekombinanter Proteine werden folgende *E. coli* Stämme verwendet:

Tab. 4: Genotypen und Referenzen der verwendeten *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ , ø80d <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR, recA1, endA1, hsdR17</i> (r ^k , mk ⁺), <i>phoA, supE44, λ⁻, thi-1, gyrA96, relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
TOP10F'	F ['] { <i>lacIq Tn10</i> (Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ø80 <i>lacZ</i> M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galk rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

Kultivierungsbedingungen für *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli* Zellen wird Luria-Bertani (LB) Medium (10g/L Bacto-Trypton [Applichem, Darmstadt], 5g/L Hefeextrakt [Difco, Heidelberg], 6g/L NaCl [Applichem], pH 7.2) verwendet. Sterilfiltriertes Ampicillin (Applichem) wird nach dem Autoklavieren zu einer Endkonzentration von 50μg/ml ins Medium gegeben, wenn auf die Anwesenheit von Plasmiden selektiert wird. Für feste Nährböden wird Agar-Agar (Applichem) in der Konzentration von 15g/L eingesetzt. Transformanten ohne α-Komplementation werden durch Zugabe von 20 mg/ml X-Gal

(American Biorganics ABI, Niagara Falls) und 100mM IPTG (Applichem) pro Platte im Blau Weiß Screening ermittelt. Alle Kulturen werden bei 37°C für 16-20h angezogen. Flüssigkulturen werden bei 160rpm auf einem Rundschtüttler inkubiert.

Saccharomyces cerevisiae

Tab. 5: Genotypen und Referenzen der verwendeten *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Bemerkungen	Genotyp	Herkunft
WCGa		<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 can GAL</i>	Heinemeyer et al., 1994
PWn1C	Rpn1CFP	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN 1-CFPHA::LEU</i>	diese Arbeit
PWn1Cn49G	Rpn1CFPHA NUP49GFP	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN 1-CFPHA::LEU (pSW636)</i>	diese Arbeit
PWn1Cp5G	Rpn1CFPHA PDR5*GFP	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN 1-CFPHA::LEU (p105)</i>	diese Arbeit
PWn11C	Rpn11CFP	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN 11-CFPHA::LEU</i>	diese Arbeit
PWn11Cn49G	Rpn11CFPHA NUP49GFP	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN11-CFPHA::LEU (pSW636)</i>	diese Arbeit
PWn11Cp5G	Rpn11CFPHA PDR5*GFP	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN 11-CFPHA::LEU (p105)</i>	diese Arbeit
PWn11P	Rpn11ProA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN 11-ProteinA::HIS ::URA</i>	diese Arbeit
PWn1P	Rpn1ProA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN 1-ProteinA::HIS ::URA</i>	diese Arbeit
srp1-49	srp1-49	<i>MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15 leu2-3,112 ura3 –1 can1-100 srp1-49</i>	G. Fink
PWn11G1-49	srp1-49 Rpn11GFP	<i>MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15 leu2-3,112 ura3 –1 can1-100 srp1-49 RPN 11-GFPHA::HIS3 ::URA3</i>	diese Arbeit
SRP1	SRP1	<i>MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15 leu2-3,112 ura3 –1 can1-100</i>	G. Fink
PWn11GSrp	SRP1 Rpn11GFP	<i>MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15 leu2-3,112 ura3 –1 can1-100 RPN 11-GFPHA::HIS3 ::URA3</i>	diese Arbeit
PWn1G1-49	srp1-49 Rpn1 GFP	<i>MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15 leu2-3,112 ura3 –1 can1-100 srp1-49 RPN 1-GFPHA::HIS3 ::URA3</i>	diese Arbeit
PWn1GSrp	SRP1 Rpn1GFP	<i>MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15 leu2-3,112 ura3 –1 can1-100 RPN 1-GFPHA::HIS3 ::URA3</i>	diese Arbeit
CEY1b	SRP1-ProA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 Δsrp1::URA3 pRS315.SRP1-ProA</i>	Enenkel et al., 1995
PWG	pYESGFPS	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 (pG)</i>	diese Arbeit
PWNLSG	pYES SV40NLS	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 (pNLSG)</i>	diese Arbeit
PWmNLSG	pYES mSV40NLS	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 (pmNLSG)</i>	diese Arbeit
PWRpt1NLSG	pYES Rpt1NLS	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 (pRpt1NLSG)</i>	diese Arbeit
PWRpt2NLSG	pYES Rpt2NLS	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 (pRpt2NLSG)</i>	diese Arbeit
PWRpn2NLSG	pYES Rpn2NLS	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 (pRpn2NLSG)</i>	diese Arbeit
DY62	Rpt2	<i>Mata his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 Δrpt2::TRP (Dp42)</i>	D. Finley ; (Rubin et al., 1998)
PWt2H16	Rpt2HA	<i>Mata his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 Δrpt2::TRP (pRpt2H16)</i>	diese Arbeit
PWt2H	Rpt2HA	<i>Mata his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 Δrpt2::TRP (pRpt2H)</i>	diese Arbeit
PWΔNt2H	ΔNLS rpt2HA	<i>Mata his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 Δrpt2::TRP (pΔNRpt2H)</i>	diese Arbeit
PWn2H	Rpn2HA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit

PW Δ Cn2H	Δ NLS rpn2HA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-ΔC-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
PW β 5H	Pre2HA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 PRE2-HA::LEU</i>	diese Arbeit
PWn2H β 5H	Rpn2HA Pre2HA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-HA::HIS::URA PRE2-HA::LEU</i>	diese Arbeit
PW Δ Cn2H β 5H	Δ NLS rpn2HA Pre2HA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-ΔC-HA::HIS::URA PRE2HA::LEU</i>	diese Arbeit
PW β 7H	Pre4HA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 PRE4-HA::LEU</i>	diese Arbeit
PWn2H β 7H	Rpn2HA Pre4HA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-HA::HIS::URA PRE4-HA::LEU</i>	diese Arbeit
PW Δ Cn2H β 7H	Δ NLS rpn2HA Pre4HA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-ΔC-HA::HIS::URA PRE4HA::LEU</i>	diese Arbeit
PWn2Hn11P	Rpn2HA Rpn11Pro	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-HA::HIS::URA RPN11-ProteinA::LEU</i>	diese Arbeit
PW Δ Cn2Hn11P	Δ NLS rpn2HA Rpn11ProA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 RPN2-ΔC-HA::HIS::URA RPN11-ProteinA::LEU</i>	diese Arbeit
PWt2Hn11P	Rpt2HA Rpn11ProA	<i>Mata his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 Δrpt2::TRP RPN11-ProteinA::HIS::URA (pRpt2H)</i>	diese Arbeit
PW Δ Nt2Hn11P	Δ NLS rpt2 Rpn11ProA	<i>Mata his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-1 ura3-52 Δrpt2::TRP RPN11-ProteinA::HIS::URA (pΔNRpt2H)</i>	diese Arbeit
Kap95		<i>Mata ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 kap95::HIS3 pSW509(LEU2)</i>	lovine und Wente, 1997
Kap95n1G	Rpn1GFPHA	<i>Mata ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 kap95::HIS3 pSW509(LEU2) RPN1-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
Kap95n11G	Rpn11GFPHA	<i>Mata ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 kap95::HIS3 pSW509(LEU2) RPN11-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
pse1-1, PSY1201		<i>MATa, ura3-52, leu2Δ1, trp1-Δ63, GAL, pse1-1</i>	Seedorf und Silver, 1997
pse1-1n1G	Rpn1GFPHA	<i>MATa, ura3-52, leu2Δ1, trp1-Δ63, GAL, pse1-1 RPN1-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
pse1-1n11G	Rpn11GFPHA	<i>MATa, ura3-52, leu2Δ1, trp1-Δ63, GAL, pse1-1RPN11-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
Pse1n1G	Rpn1GFPHA	<i>MATa, ura3-52, leu2Δ1, trp1-Δ63, GAL, RPN1-GFP-HA::HIS::URA</i>	
Pse1n11G	Rpn11GFPHA	<i>MATa, ura3-52, leu2Δ1, trp1-Δ63, GAL, RPN11-GFP-HA::HIS::URA</i>	
rat2-1		<i>Matchis3-Δ200 ura3-52 leu2Δ1rat2-1</i>	Heath et al., 1995
rat2-1n1G	Rpn1GFPHA	<i>Matchis3-Δ200 ura3-52 leu2Δ1rat2-1 RPN1-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
rat2-1n11G	Rpn11GFPHA	<i>Matchis3-Δ200 ura3-52 leu2Δ1rat2-1 RPN11-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
nup133		<i>Mata ade2 his3 leu2 trp1 ura3 nup133::HIS3</i>	Belgareh und Doye, 1997
nup133n1G	Rpn1GFPHA	<i>Mata ade2 his3 leu2 trp1 ura3 nup133::HIS3 RPN1-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
nup133n11G	Rpn11GFPHA	<i>Mata ade2 his3 leu2 trp1 ura3 nup133::HIS3 RPN11-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
srp1-31		<i>MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15</i>	G. Fink

srp1-31n1G	Rpn1GFPHA	<i>leu2-3,112 ura3 -1 can1-100 srp1-31 MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15 leu2-3,112 ura3 -1 can1-100 srp1-31 RPN1-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
srp1-31n11G	Rpn11GFPHA	<i>leu2-3,112 ura3 -1 can1-100 srp1-31 MATa ade2-1 trp1-Δ63 his3-11,15 leu2-3,112 ura3 -1 can1-100 srp1-31 RPN11-GFP-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
Δrpn2		<i>MATa leu2 his3 trp1 ura3 ade2 sen3::LEU2</i>	YAT1886 ; Yokota et al., 1996
PWΔn2ΔCn2H	Δrpn2 ΔNLSrpn2HA	<i>MATa leu2 his3 trp1 ura3 ade2 sen3::LEU2 RPN2-ΔC-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
PWΔn2n2H	Δrpn2 Rpn2HA	<i>MATa leu2 his3 trp1 ura3 ade2 sen3::LEU2 RPN2-HA::HIS::URA</i>	diese Arbeit
PCE6	Pre6 ProA	<i>MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 PRE6-ProteinA::HIS::URA</i>	C. Enenkel

Kultivierungsbedingungen für *S. cerevisiae*

YPD Medium (Difco) dient als Flüssigmedium für die Anzucht von Hefen.

Synthetisches Selektionsmedium (*Complete Minimal*) Medium wird mit 1,7g/L YNB-AA/AS (*yeast nitrogen base without aminoacids and ammonium sulphate*, Difco), 5g/L (NH₄)₂SO₄, 20g/L Glucose und 1,3g/L Dropout Pulver ohne Uracil, Histidin, Leucin oder Arginin hergestellt. Es werden nach Bedarf zusätzliche Aminosäuren zugesetzt (30mg/L L- Histidin, 60mg/L L- Leucin, 30mg/L Uracil, 20mg/L Arginin), wenn bestehende Selektionen aufgehoben werden sollen.

Feste Nährböden enthalten 20g/L Bacto™ Agar (Difco).

Für die Expression von Genen hinter dem Galaktose Promoter werden *S. cerevisiae* Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in synthetisches Galaktose Selektionsmedium überführt, das statt 20g/L Glucose 20g/L Galaktose als Kohlenstoffquelle enthält. Die Induktion der Galaktose abhängigen Gene findet für 4-8 Stunden bei 28°C statt.

Zur Selektion mittels FOA (5-Flouoroorotic Acid; BTS, St. Leon Rot) wird ein 2x CM Medium mit 60mg/L Uracil und 40g/L Agar-Agar autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 55°C wird ein gleiches Volumen sterilfiltrierter FOA- Lösung (2g/L) zugegeben. Somit stellt sich im fertigen Festmedium eine FOA Konzentration von 1g/L ein.

Die Kultivierungen erfolgen auf einem Rundschtüttler bei 28°C oder bei Raumtemperatur bis eine Zelldichte (OD_{600nm}) von 1-7x 10⁷ Zellen/ml erreicht ist.

Kryokonservierung

Gefrierkulturen werden sowohl bei *E. coli* Zellen als auch bei *S. cerevisiae* Zellen hergestellt, indem 1ml Vorkultur mit 400µl 80% Glycerin sorgfältig vermischt und anschließend bei -70°C gelagert wird.

Untersuchung auf Canavanin- und Temperatur Sensitivität

Für Canavanin- Sensitivitätsbestimmungen werden CM Agar-Agar Platten ohne Arginin 0,6µg/ml Canavanin (Stammlösung: 3 mg/ml in H₂O sterilfiltriert) zugesetzt. Als Referenz werden CM Platten mit 20 mg/ml Arginin Zusatz verwendet. Jeweils 4µl einer dekadischen Verdünnungsreihe einer Hefekultur mit einer optischen Dichte von ca. 1x 10⁷ Zellen/ml werden auf die Platten aufgetropft und nach 3 tägiger Inkubation bei 28°C die relative Lebendkeimzahl bestimmt.

Für Temperatur- Sensitivitätsbestimmungen werden zwei YPD Agar-Agar Platten analog zu Canavanin Platten mit Hefezellen beimpft und für 3 Tage bei 28°C bzw. 37°C inkubiert und die Lebendkeimzahl gleicher Verdünnungsstufen miteinander verglichen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA Amplifikation durch PCR (polymerase chain reaction)

Die Amplifikation von DNA Fragmenten erfolgt entweder ausgehend von aufgereinigter Vektor DNA oder chromosomaler *S. cerevisiae* DNA als Vorlage. Alle Oligonukleotide werden bei Biotez, Berlin bestellt. In einem PCR Ansatz werden 1µl DNA, 10µl 10x PCR Puffer mit MgCl₂ (Roche, Mannheim), 0,8µl 25mM dNTPs und jeweils 1µl sense und antisense Oligonukleotid Primer (50 pmol/µl) in einem 0,5ml Eppendorfgefäß mit sterilem H₂O auf 100µl Endvolumen aufgefüllt. 0,4µl Taq-Polymerase (Roche, Mannheim) werden erst unmittelbar vor Start der PCR Reaktion zum Ansatz gegeben. Die PCR Bedingungen ergeben sich aus einer einminütigen Denaturierung der Primer bei 95°C, gefolgt von 30 Amplifikationszyklen bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 45 Sekunden, Primeranlagerung bei 45-50°C für 1 min und DNA Polymerisation bei 72°C für eine der Größe des zu amplifizierenden DNA Fragment angepassten Zeitspanne von ca. 1kb = 1min.

Abschließend findet die Endpolymerisation aller amplifizierten DNA Fragmente bei 95°C, 5 min statt.

Jeweils 2µl des amplifizierten Fragments werden nach Angaben des Herstellers mittels TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen) in den Vektor pCR 2.1®- TOPO® ligiert und sequenziert.

2.2.2 Gelelution und Reinigung von DNA Fragmenten

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelstücken sowie die Reinigung von DNA nach Restriktionen erfolgt mit dem Qiaquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben.

2.2.3 Dephosphorylierung

Die Selbstligation dephosphorylierter Vektor- DNA Enden wird mittels Alkalischer Phosphatase, durch die Entfernung der Phosphatgruppe vom 5' Ende des dsDNA Strangs, unterbunden. In einem Ansatz werden 44µl gereinigte DNA (ca. 0.5µg) mit 5µl 10 x Alkalische Phosphatase Puffer und 1µl Alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) vermischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 15 min bei 65°C.

2.2.4 Ligation

Für die Ligation dephosphorylierter Vektoren mit DNA-Fragmenten (*insert*) beträgt das Verhältnis der molaren Massen beider DNA Moleküle 3:1, während für die Ligation phosphorylierter Vektoren ein Verhältnis von 1:3 zum Insert besteht. Im Ligationsansatz wird ca. 50 ng Vektor- DNA mit der entsprechenden Menge Insert- DNA, 2µl T4-DNA-Ligase (1.2 U, New England Biolabs) sowie 2µl 10x T4-DNA-Ligase Puffer zu einem Endvolumen von 20µl vereinigt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.5 Restriktionsansätze

In einem analytischen Restriktionsansatz mit einem Endvolumen von 20µl sind nicht mehr als 1µg QIAGEN Mini Präp DNA, 2µl 10 x Restriktionspuffer, 0,2µl BSA (10 mg/ml; New England Biolabs, Schwalbach) und 0,5µl Restriktionsendonuklease (bis zu 10 U/µl) enthalten. In einem präparativen Restriktionsansatz mit einem Endvolumen von 300µl sind bis zu 20µg DNA, 30µl 10x Restriktionspuffer, 3µl BSA und 3µl Restriktionsendonuklease enthalten. Die Wahl des Inkubationspuffers ist abhängig vom verwendeten Enzym. Die Restriktion erfolgt bei 37°C für maximal 2 Stunden. Die Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach) oder Boehringer Mannheim bezogen.

2.2.6 Plasmidisolierung aus E. coli

Zur DNA Schnellaufarbeitung werden die Kolonien ü/N bei 37°C in 3ml LB+ Ampicillin Medium auf dem Rundschtüttler bei 120 rpm in sterilen Reagenzgläsern angezogen. Die Plasmidisolierung erfolgt gemäß Vorschrift mit dem Qiaprep® Spin Miniprep Kit der Firma QIAGEN. Plasmid- DNA aus 1,5ml Kultur wird in 50µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.2.7 Annealing von Oligonukleotiden

Sehr kurze dsDNA Fragmente von 30 bis hinzu 150 bp können erzeugt werden, indem komplementäre Oligonukleotidstränge miteinander hybridisiert werden. In dem Hybridisierungsansatz werden jeweils 50µl Oligonukleotid (75µg/ml in H₂O) mit 10µl 1M NaCl vermischt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen bei RT oder auf Eis kann die dsDNA in der Ligation eingesetzt werden. Der Anteil der hybridisierten Primer in der Annealingreaktion wird überprüft, indem ein Aliquot des Hybridisierungsansatzes in einer 5% igen Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wird.

2.2.8 DNA Fällung und Sequenzierung

DNA- Sequenzierungen werden von der Firma Agowa, Berlin durchgeführt. Dazu werden 50µl Vektor- DNA aus der Plasmidisolierung mit 1/10 Volumen 3M Na- Acetat pH 4,8 und 2,5fachem Volumen Ethanol versetzt und entweder sofort verschickt oder zuvor vollständig gefällt. Das heißt der Ansatz wird 30 min auf Eis inkubiert und die DNA anschließend durch Zentrifugation bei 14000xg 15 min pelletiert und getrocknet.

2.2.9 Agarose- Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Molekülen erfolgt mit Hilfe der Agarose- Gelelektrophorese. Die Beweglichkeit der DNA Moleküle in der Agarosematrix ist abhängig von der Porengröße des Gels und damit von der Agarosekonzentration. Alle Gelelektrophoresen werden mit 0,8-4% igen Agarosegelen durchgeführt.

Für ein 1%iges Minigel (50ml) werden 0,5 g Seakem LE Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) in 50ml 1x TBE Laufpuffer (90mM Tris- Base, 90mM Borsäure, 2mM EDTA, pH 8,0) durch Aufkochen gelöst und auf ca. 60°C abgekühlt. Der Agarose werden 0,25µg/ml Ethidiumbromid (Applichem) zugesetzt und anschließend wird der Ansatz in einen Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren wird das Gel in die Elektrophoreseapparatur (Biorad, München) überführt und die DNA Proben nach Zugabe von 1x Probepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, 10% Glycerol

in 1x TBE) aufgetragen. Die Elektrophorese findet bei 150-200 V in 1 x TBE Laufpuffer für 10 min statt. Die Emission ($\lambda_{560\text{nm}}$) des in die DNA interkalierten Fluoreszenzmittels unter der Anregung von UV Licht ($\lambda_{300\text{nm}}$, Appligene UV Tisch) wird photographiert (Dokumentationssystem Intas, Göttingen). Zur Größenbestimmung der DNA Fragmente werden 0,5 μg / Spur 1kb ladder DNA Marker (Invitrogen) verwendet.

2.2.10 Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Um DNA Fragmente der Größe von 40-150 bp zu trennen, wird anstelle eines Agarosegels ein Polyacrylamid-Gel (PAA- Gel) verwendet. 50ml eines 5%igen PAA- Gels werden durch Mischen von 8,3ml einer 30%igen Acrylamidlösung (Vernetzungsverhältnis 29:1) mit 5ml 10xTBE- Puffer und der entsprechenden Menge H₂O hergestellt. Die Polymerisierung wird mit 500 μl einer 10%igen APS Lösung und 33 μl TEMED gestartet. Die Elektrophorese findet in 1x TBE Puffer für 2h bei 75V statt. Zur Größenbestimmung wird der 1kb Marker von Invitrogen verwendet.

2.2.11 DNA Isolation aus *S. cerevisiae* (verändert nach Kaiser *et. al*, 1994)

5ml einer Hefekultur aus der logarithmischen Wachstumsphase werden abzentrifugiert (2000xg, 3min) und das Pellet wird in 0,5ml 1M Sorbitol aufgenommen. Zu der Suspension wird eine Spatelspitze Zymolyase 20T (ICN, Eschwege) gegeben und der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Protoplastierung wird mikroskopisch kontrolliert. Die Protoplasten werden bei 600xg für 5 min pelletiert und zügig in 0,5ml 50mM Tris- HCl, 20mM EDTA (pH 7,4) und 0,05ml 100g/L SDS aufgenommen. Das Lysat wird schnell in ein Wasserbad überführt und bei 65°C unter gelegentlichem Schütteln für 30 min inkubiert. Anschließend werden 0,2ml einer 5M Kaliumacetatlösung zugegeben und der Ansatz für 60 min auf Eis gehalten. Die Proben werden bei 14000xg für 30 min zentrifugiert und der Überstand in ein mit 0,7ml Isopropanol gefülltem, neuem Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wird für 5 min bei Raumtemperatur ausgefällt und anschließend für 10 s durch Zentrifugation bei 14000xg pelletiert. Das DNA Pellet wird in 300 μl TE (10mM Tris- HCl pH 8,0, 1mM EDTA) mit 0,3 μl RNase A (Qiagen) versetzt resuspendiert, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 30 μl 3M Natriumacetat (pH4,8) und 0,2ml Isopropanol gemischt. Die DNA wird wiederum kurz abzentrifugiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wird die DNA in 100 μl TE aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.12 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Der zu transformierende *E.coli* Stamm wird über Nacht bei 37°C in 5ml LB-Medium angezogen. Eine Hauptkultur von 100ml LB wird mit 2ml der Vorkultur beimpft und für etwa 2h bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Zellen wird bei einer Wellenlänge von 600nm über die optische Dichte (OD) kontrolliert. Bei einer OD von 0,4 wird das Wachstum gestoppt indem die Kultur für 5 min auf Eis gekühlt wird und die Zellen werden anschließend bei 2000xg in sterilen Greiner Röhrchen 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 40ml eiskaltem, sterilfiltriertem TFB1 (100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM KAc, 10mM CaCl₂, 15% [v/v] Glycerol, ad pH 5,8 mit 0,2M Essigsäure) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren der Zellen wird der Überstand sorgfältig entfernt und die *E. coli* in 4ml eiskaltem, sterilfiltriertem TFB2 (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% [v/v] Glycerol, ad pH 6,5 mit KOH) aufgenommen. Abschließend werden die Zellen in 105 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.13 Transformation von *E. coli*

50 μl kompetenter *E.coli* Zellen werden mit der zu transformierenden DNA vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 2 min einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und zügig in 0,5ml LB Medium aufgenommen. Zur Regeneration werden die *E. coli* 1 h bei 37°C inkubiert, bevor sie pelletiert und auf Selektivmedium ausplattiert werden. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht.

2.2.14 Transformation von *S. cerevisiae*

Der zu transformierende *S. cerevisiae* Stamm wird über Nacht in 50ml YPD angezogen und bei einer Zelldichte von ca. 5×10^7 Zellen/ml steril abzentrifugiert (2000xg, 5 min). Das Zellpellet wird einmal mit 10ml eiskaltem, sterilem H₂O sowie einmal in 10ml eiskaltem 1M Sorbitol gewaschen und mit 1ml eiskaltem 1M Sorbitol in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Nach kurzem Abzentrifugieren (30 Sekunden, 17900xg) wird das Zellpellet in 1 Vol eiskaltem 1M Sorbitol resuspendiert. 40 μl dieser Zellsuspension werden für eine Elektroporation mit 2-5 μl der zu transformierenden DNA in EQUIBIO Elektroporationsküvetten (2mm Elektrodenabstand, PeqLab, Erlangen) vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgt bei 1500 V, 25 μF und 200 Ohm im Gene Pulser® (Biorad, München). Sofort anschließend werden die Zellen in 1ml eiskaltem 1M Sorbitol aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und kurz abzentrifugiert (30 Sekunden, 17900xg). Der Überstand wird bis auf ca. 100 μl Sorbitol entfernt, das Zellpellet resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Inkubation erfolgt für 3-5 Tage bei 28°C.

2.2.15 5'Fluoroorotsäure- shuffling (nach Boeke *et al.*, 1987)

Die 5'Fluoroorotsäure (5'FOA; *fluoro orotic acid*)- shuffling Methode erlaubt, auf schnellem Weg

ein essentielles, plasmidständiges Gen gegen eine mutierte Variante auszutauschen und konditional letale Mutationen festzustellen. Dazu wird die chromosomale Kopie des essentiellen Gens deletiert und die Überlebensfähigkeit des Stamms durch die Anwesenheit eines autonom replizierenden Plasmids sichergestellt, das sowohl eine intakte Kopie des essentiellen Gens als auch den *URA3* Selektionsmarker trägt. Dieser sogenannte shuffle Stamm wird transformiert und ein zweites autonom replizierendes Plasmid, das die mutierte Genvariante und den *LEU2* Selektionsmarker trägt, in die Zellen eingeführt. Mit Hilfe der negativen Selektion von 5'FOA wird das *URA3* tragende Plasmid verdrängt, indem die *LEU2 / URA3* prototrophen Stämme zweifach auf Selektionsmedium, das 1g/L 5'FOA enthält, überstempelt werden. Kolonien, die nach der 5'FOA Selektion Uracil bedürftig und Leucin prototroph sind, enthalten nur noch Plasmide, die die mutierte Genkopie tragen, und werden weiter untersucht. Das Prinzip der negativen Selektion basiert auf der Toxizität von 5' Fluoroorotsäure für Uracil prototrophe Stämme. *URA3* kodiert für die Orotidin- 5'Phosphat Decarboxylase, die in der Uracil Biosynthese benötigt wird, aber unter Anwesenheit von 5'FOA, dieses in das Zellgift 5- Fluorouracil umwandelt. Eine Schematische Darstellung der Generierung von PWt2G aus PWt2H16 mit Hilfe der Plasmid shuffling Methode zeigt Abb. 6A. Die Erzeugung der auf diese Weise in PWt2H16 eingeführten Plasmide beschreibt Abb. 6B.

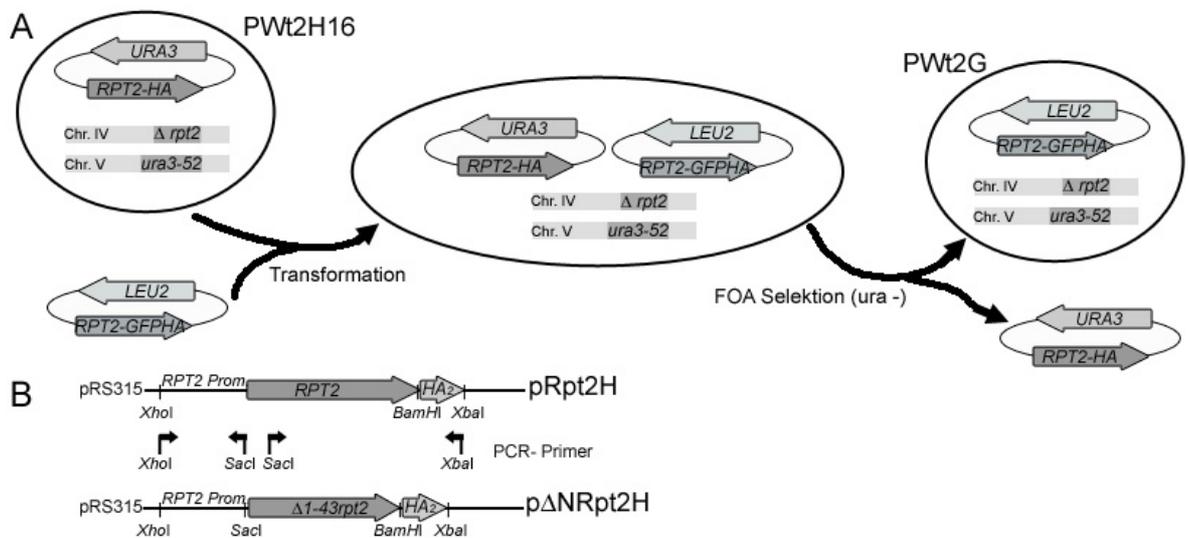


Abb. 6: (A) Schematische Darstellung der Erzeugung von PWt2G aus PWt2H16 mit Hilfe der Plasmid shuffling Methode. Leucin tragende Plasmide, die auf diese Weise in PWt2H16 eingeführt werden, sind pRpt2H, pRpt2G, pΔNRpt2H sowie pΔNRpt2G (B) pRpt2H entsteht aus pRS315-H, indem das ca. 1,8 kbp *RPT2* Gen einschließlich des 482 bp langen Promotorbereichs als *XhoI*-*BamHI* Fragment in pRS315-H ligiert wird. Mit Hilfe der angegebenen PCR Primer werden *XhoI*/*SacI* und *SacI*/*XbaI* Fragmente aus pRpt2H amplifiziert und in pRS315 ligiert. In pΔNRpt2H sind somit bp 1- 129 des *RPT2* Gens deletiert. Das *GFP* Gen wird für die Erzeugung von pRpt2G sowie pΔNRpt2G als *BamHI* Fragment in pRpt2H bzw. pΔNRpt2H eingesetzt. pRpt2H-16 gleicht pRpt2H, trägt aber statt des *LEU2* Gens das *URA3* Gen und basiert damit auf dem pRS316 Vektor.

2.2.16 Markierung von Genen mit Hilfe der Homologen Rekombination

Die Insertion einer linearisierten DNA Sequenz erlaubt, essentielle Gene an ihrem 3' Ende um eine beliebige Markierung zu verlängern (*tagging*) ohne das Gen dabei zu duplizieren. Dazu wird ein DNA Fragment, das die C- terminalen 200- 400 Basenpaare des zu markierenden Gens ligiert an die gewünschte Markierung, mindestens einen Selektionsmarker sowie eine beliebige 200-400 Basenpaare umfassende DNA Sequenz abwärts des zu markierenden Gens trägt, in Wildtyp Zellen eingebracht. Mittels homologer Rekombination zwischen 5' bzw. 3' Bereich des DNA Fragments und den homologen Sequenzen des chromosomalen Genlocus findet bei Selektion auf das eingebrachte Markerprotein die Insertion des DNA Fragments statt. Die zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten, linearisierten DNA Fragmente notwendigen Klonierungsschritte sowie die verwendeten Gene, Markierungen und selektierbaren Marker sind in Abb.7 und 8 dargestellt. Da es nicht zu einer Integration der eingeführten DNA kommt, sondern der Bereich zwischen den homologen Rekombinationsstellen ersetzt wird, werden mit dieser Technik keine DNA Bereiche dupliziert. Wird anstelle des DNA Fragments ein linearisiertes, integratives Plasmid eingesetzt, gibt es nur einen Bereich an dem die homologe Rekombination stattfindet und das gesamte Plasmid integriert am chromosomalen Genlocus ins Genom.

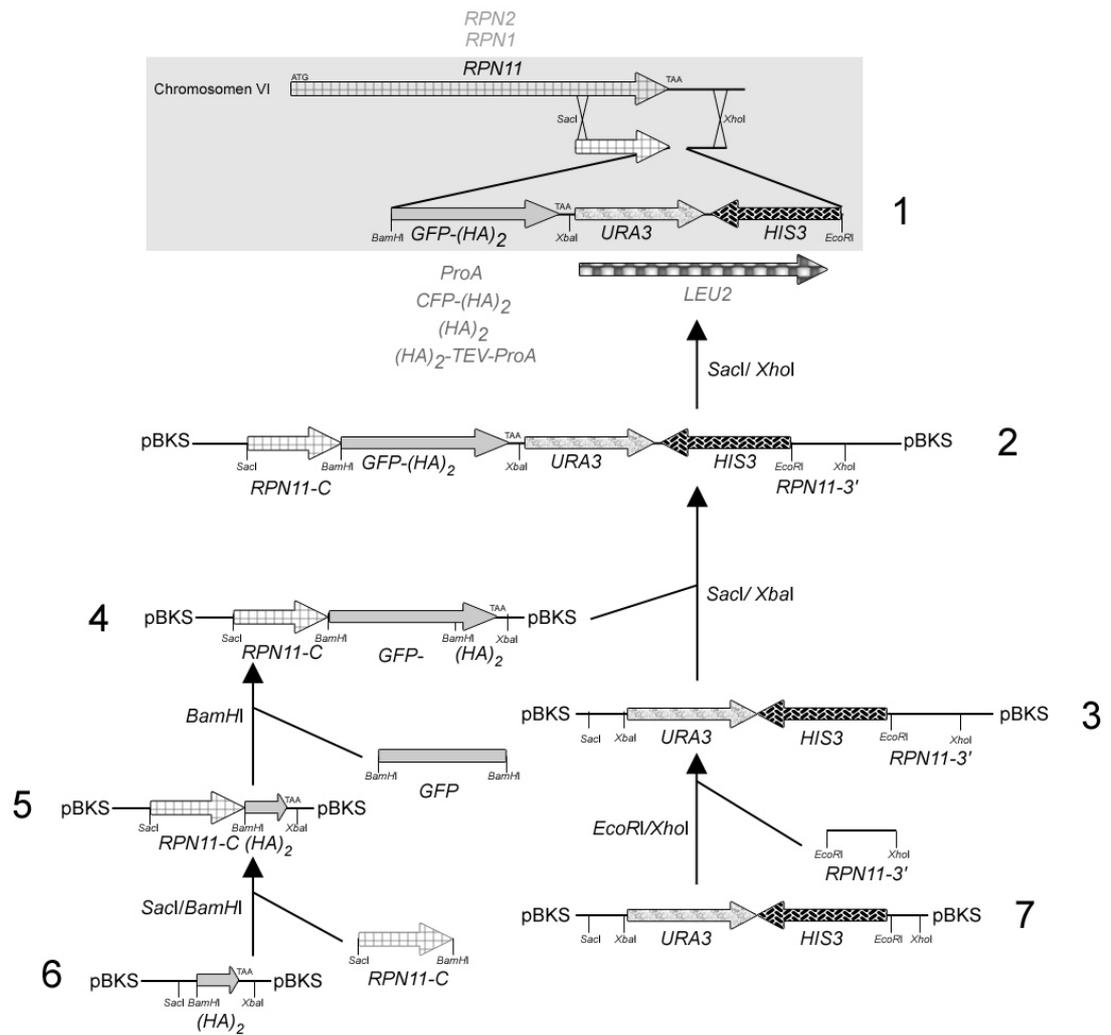


Abb. 7: Insertion linearisierter DNA Fragmente durch homologe Rekombination. Das *SacI/XhoI* linearisierte Genfragment (1) wird mittels homologer Rekombination in den chromosomalen Genlocus von *Rpn11* inseriert. Weitere in dieser Arbeit verwendete Markierungen und Gene sind in grauer Schrift angezeigt. Die zur Herstellung des Fragments notwendigen Klonierungsschritte verlaufen über *pBSFlu* (6), *pBSFluRpn11HA* (5), *pBSFluRpn11GFPHA* (4), *pBSHU* (7), *pBSHURpn11-3'* (3) und *pBSHURpn11GFPHA* (2).

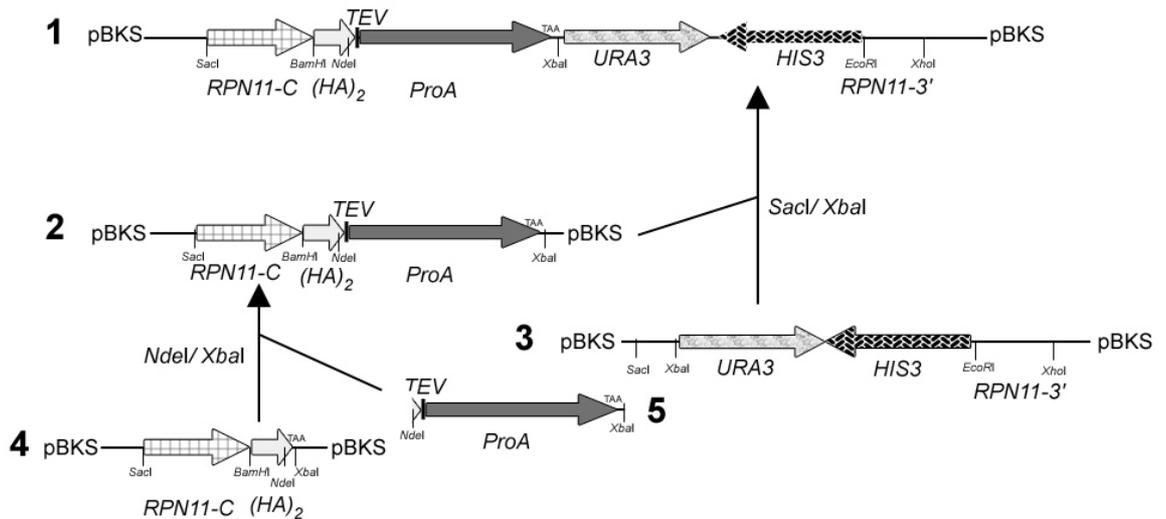


Abb. 8: Struktur des *RPN11-HA-TEV-ProA::URA3::HIS3* Fragment (1), das mit *SacI/ XhoI* linearisiert wird und mittels homologer Rekombination in den chromosomalen Genlocus von *Rpn11* inseriert wird. Die zur Herstellung des Fragments notwendigen Klonierungsschritte verlaufen über *pBSFluRpn11HA* (4), *pBSFluRpn11HATEVProA* (2) und *pBSHURpn11-3'* (3). Das *NdeI/ XbaI* Fragment (5), das für die TEV Schnittstelle und die zwei IgG bindenden Domänen codiert, wird mit Hilfe entsprechender Primer aus *pZZ-HIS5* amplifiziert.

2.2.17 Erzeugung der NLS-GFPs Fusionsproteine

Potentielle NLS aus *Rpt2*, *Rpt1* und *Rpn2* sowie die Kontroll- NLS des SV40 T-Antigens und deren mutierte Variante werden mit GFP und dem Strep- tag II (S) fusioniert (Abb. 9). Der N- terminale Bereich von *Rpt2* wird mittels PCR amplifiziert und über die *HindIII* und *KpnI* Schnittstellen in *pYESGFPS* ligiert. Alle anderen Konstrukte werden als komplementäre Oligonukleotidstränge miteinander hybridisiert und an den Restriktionsschnittstellen für *HindIII* und *KpnI* in den linearisierten *pYESGFPS* Vektor ligiert. Alle Konstrukte werden durch Sequenzierung der DNA überprüft. Die Transkription findet unter Kontrolle des *GAL1* Promotors (*PGAL1*) und der Terminationssequenz *CYC1* (*TTCYC1*) vom episomalen Vektor *pYES* statt.

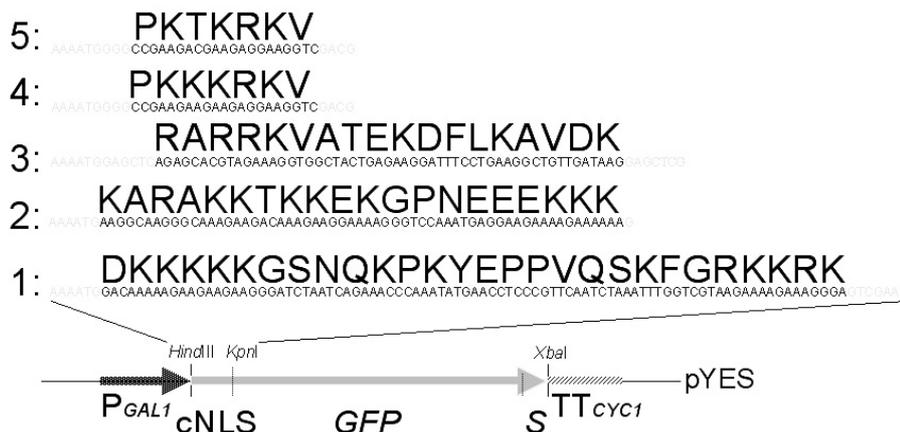


Abb. 9: Potentielle cNLS der 19S Untereinheiten *Rpt2* (1), *Rpn2* (2) und *Rpt1* (3) sowie die funktionelle SV40 NLS (4) und die mutierte SV40 NLS (5) werden wie abgebildet als GFP Fusionsprotein mit Strep- tag II Markierung (S) exprimiert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Aufschlussverfahren von Hefezellen

Abgesehen von der Hefeprotein Schnellaufarbeitung nach Yaffe und Schatz, 1984 werden Hefezellen je nach den Anforderungen der darauffolgenden Anwendungen in einem Puffersystem mit oder ohne ATP und $MgCl_2$ aufgearbeitet. Der ATP enthaltende Puffer A nach Saeki *et al.* (2000) besteht aus 50mM Tris- HCl (pH 7,5), 0,5mM EDTA (pH 7,75), 100mM NaCl, 10% Glycerol, 0,5mM Dithiothreitol, 2mM ATP, 10mM $MgCl_2$, 20 U DNaseI (Roche, 10U/ μ l), EDTA free Complete Protease Inhibitor cocktail (Roche) und 0,25mM Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF). Der PB Puffer ohne ATP enthält 20mM Tris- HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 0,25mM PMSF, 20 U DNaseI sowie 10% Glycerol.

2.3.1.1 Hefeprotein Schnellaufarbeitung nach Yaffe und Schatz, 1984

Zur analytischen Proteinaufarbeitung werden bis zu 1×10^9 Zellen einer Hefekultur abzentrifugiert (30 Sekunden, 17900xg), das Pellet in 1ml H₂O resuspendiert und die Zellen unter Zugabe von 160µl 1,85M NaOH und 85µl 2-β Mercaptoethanol 10 min auf Eis aufgeschlossen. Zur Fällung der Proteine wird der Ansatz mit 160µl 50% Trichloressigsäure (TCA) versetzt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 3 min bei 17900xg wird das Pellet mit 800µl eiskaltem Aceton gewaschen (3 Sekunden, 17900xg) und in entsprechendem Volumen 1x Proteinprobenpuffer (Laemmli, 1970) resuspendiert. Der pH-Wert wird mit 0,5M Tris (ungepuffert) auf ca. pH 6,8 eingestellt, die Proben 4 min bei 95°C erhitzt und unlösliches Material vor der Auftrennung in SDS PAGE abzentrifugiert (3 Sekunden, 17900xg).

2.3.1.2 Glasperlenaufschluss

Für präparative Proteinaufarbeitungen kleinen Maßstabs werden 300µl Zellpellet (ca. 5×10^9 Zellen) in 500µl des gewünschten Aufschlusspuffers resuspendiert, mit 300µl silikonisierter Glasperlen (425-600 µm Durchmesser, Sigma) versetzt und sieben Mal je eine Minute bei maximaler Leistung gevortext und dazwischen jeweils eine Minute auf Eis inkubiert. Um die Effizienz des Aufschlusses zu steigern kann der Ansatz dabei mehrfach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder aufgetaut werden. Abschließend werden die Zellreste bei 17000xg für 10 Minuten bei 4°C zusammen mit den Glasperlen pelletiert und die löslichen Proteine im Überstand bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

2.3.1.3 Aufschluss unter flüssigem Stickstoff

Für präparative Proteinaufarbeitungen größeren Maßstabs werden bis zu $1,5 \times 10^{10}$ Zellen einer Hefekultur für 3 min bei 5000 rpm (Beckman Avanti J-25, GS3) geerntet, einmal in dem gewünschten Puffer gewaschen (3 min, 5000 rpm Beckman Avanti J-25) und das Pellet anschließend in 1 Vol Puffer resuspendiert. Bevor die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden, werden Mörser und Stößel in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Der Aufschluss erfolgt unter ständiger Stickstoffzugabe bis das Zellpellet pulverisiert ist. Nach dem Auftauen auf Eis oder bei Raumtemperatur wird der Zellextrakt für 20 min bei 14000 rpm (Beckman Avanti J-25, SS34) und 4°C zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wird der Überstand auf Eis aufbewahrt.

2.3.1.4 French- Press Aufschluss

Die höchste Proteinextraktausbeute wird mit dem Aufschluss in der French® Pressure cell (AMINCO, 40000 psi Zelle) erreicht. Dazu werden bis zu 6×10^{10} Zellen wie zum Aufschluss unter flüssigem Stickstoff, pelletiert, gewaschen und in 1 Vol Puffer resuspendiert. Bei 1000psi werden die Zellen bis zu dreimal in der French Press Zelle aufgeschlossen. Die Lysate werden für 20 min bei 14000 rpm (Beckman Avanti J-25, SS34) und 4°C zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten.

2.3.2 Immunpräzipitation

2.3.2.1 HA Tag

Immunpräzipitationen von HA Fusionsproteinen werden in Puffer PB durchgeführt. 2ml Zellextrakt eines French Press Zellaufschlusses werden mit 200µl Protein A- Sepharose CL-4B (Pharmacia) für 3 Stunden bei 4°C inkubiert, um unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine zu entfernen. Die Protein A Sepharose wird abzentrifugiert (2000xg, 2 min), dreimal mit Puffer PB gewaschen und in 1 x Proteinprobenpuffer aufgeköcht. Das vorgeklärte Lysat wird mit 10µl mAb12CA5 (4µg Protein, Boehringer Mannheim) versetzt und über Nacht bei 4°C rollierend inkubiert. 100µl Protein A- Sepharose wird zum Zellextrakt gegeben und der Ansatz für 4 Stunden bei 4°C rolliert, um die HA Immunpräzipitate zu binden. Die Protein A- Sepharose wird durch Zentrifugation sedimentiert (2000xg, 2 min), dreimal mit 1,5ml Puffer PB gewaschen und in 1 vol einmal Probenpuffer aufgeköcht. Die gebundenen Proteine werden durch SDS PAGE und Immunoblot identifiziert.

2.3.2.2 Standard IgG Sepharose Affinitätschromatographie

Für die Standard IgG Sepharose Affinitätschromatographie wird der Zellextrakt bei Raumtemperatur zweimal über 1/ 25 Zelllysativolumen IgG Sepharose (6 Fast Flow/ Amersham Bioscience oder Cappel/ ICN, Eschwege) gegeben. Das Säulenmaterial wird mit 50 vol des verwendeten Aufschlusspuffers gewaschen und gebundene Proteine werden mit viermal 1ml 0,5M HOAc/NH₄Oac (pH 3,4) eluiert.

2.3.2.3 Sequenzielle IgG Sepharose Affinitätschromatographie

Die sequentielle IgG Sepharose Affinitätschromatographie wird verwendet, um einzelne 26S Subkomplexe nativ aus PWN11HTP Lysaten zu gewinnen. Bis zur Elution der gebundenen Proteine wird das Protokoll der Standard Affinitätschromatographie verfolgt. Dabei wird als Aufschluss- und Waschpuffer immer Puffer A verwendet. Zur Elution werden zunächst alle assoziierten Proteine mit 4ml Puffer B (Puffer A ohne $MgCl_2$ und ATP) abgelöst. Das 20S Proteasom eluiert vom 19S Regulatorkomplex mit 4ml Puffer B₃₀₀ (Puffer B mit 300mM NaCl) und der 19S Base löst sich vom Lid Komplex mit 4ml Puffer B₆₀₀ (Puffer B mit 600mM NaCl). Nach einem Waschschrift mit 10ml Puffer B wird der 19S Lid Komplex mit 10U TEV Protease (Invitrogen) pro 100µl Säulenmaterial für 3 Stunden bei Raumtemperatur eluiert.

2.3.2.4 Strep- tag II Affinitätschromatographie

Strep markierte Proteine werden über Strep-Tactin[®] Sepharose (Institut für Bioanalytik GmbH) eluiert. Zellaufschluss und Waschschriffe finden bei diesem Aufschluss in Puffer W (0,1M Tris- HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0) statt. Um biotinylierte Proteine, die unspezifisch an Strep tag II binden, aus dem Lysat zu entfernen, wird es für 30 Minuten bei 4°C mit ca. 40µg Avidin (Sigma) pro ml Lysat vorgeklärt. Vor Inkubation des Säulematerials mit ca. 40 vol Zellextrakt für 2 Stunden bei 4°C wird die StrepTactin Matrix mit 20 vol Puffer W gespült und der pH Wert des Zelllysats mit ungepuffertem 0,5M Tris auf pH 8,0 eingestellt. Die beladene Strep-Tactin[®] Sepharose wird in Poly- Prep[®] Chromatographie Säulen (Biorad) transferiert und zweimal mit 10 Bettvolumen Puffer W gewaschen. Die Elution der Strep markierten Proteine oder Komplexe erfolgt mit 6 x 0,5ml 5mM Desthiobiotin in Puffer W.

2.3.3 Proteinfällung und Proteinbestimmung

Die Fällung nativer Proteine erfolgt durch Zugabe von 1/10 Vol 72% (w/v) TCA sowie 1/10 Vol 0,15% (w/v) Natriumdesoxycholat bei 4°C für 20 min. Zum Einengen werden die Proteine 15 min bei 17900xg zentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit 100% Aceton gewaschen und in 1x Proteinprobenpuffer resuspendiert.

Proteinkonzentrationen werden mit Hilfe des Protein Assay Konzentrats von Biorad (München) nach Bradford (1976) bestimmt. Die Verdünnung des Bradford Reagenz und der Probe erfolgen nach Herstellerangaben. Die Komplexierung von Protein mit Coomassie Blue G250 wird nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur anhand der Extinktion bei 595nm im Photometer (UltraspecIII, Pharmacia) gegen einen Nullwert gemessen. Zur Erstellung einer Eichkurve werden BSA Lösungen definierter Konzentrationen (1-10µg/ml) verwendet.

2.3.4 SDS PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgt durch SDS PAGE (*Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) nach Laemmli (1970). Standardmäßig werden 0,75mm dicke Gele mit einer Lauflänge von ca. 6 cm in dem Protean- Mini II sowie III System von Biorad verwendet. Für zwei 12% ige Trenngele werden 4ml 30% ige Acrylamidlösung (Vernetzungsverhältnis 37,5:1; Applichem), 2,5ml 1,5M Tris- HCl pH 8,8, 100µl 10% w/v SDS und 3,5ml H₂O mit 50µl 10% Ammoniumpersulfatlösung (APS) und 5µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED) vermischt und zügig in die Gelkammern gegossen. Zur Herstellung zweier 4% iger Sammelgele werden 650µl 30% Acrylamid, 1,25ml 0,5M Tris- HCl pH 6,8, 50µl 10% w/v SDS, 3,05ml H₂O, 25µl 10% APS sowie 5µl TEMED vermengt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in 1x Laufpuffer (25mM Tris; 192mM Glycin; 0,1% w/v SDS) für ca. 45 min bei 200 V. Als Proteingrößen- Marker dient entweder der Rainbow[™] Proteinmarker (Amersham) mit den Proteinen der Größen 200 kDa, 97,4 kDa, 69 kDa, 46 kDa, 30 kDa, 21,5 kDa und 14,3 kDa oder der *low range* Marker (NEB) mit Proteinen der Größen 175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47,5 kDa, 32,5 kDa, 25 kDa, 16,5 kDa und 6,5 kDa.

2.3.5 Coomassie Färbung

Das Gel wird in die Färbelösung (0,2% [w/v] Coomassie- Brilliant- Blue R250, 30% [v/v] Methanol und 10% [v/v] Essigsäure in H₂O; zuerst Farbstoff in Methanol über Nacht lösen) kurz in der Mikrowelle aufgekocht und für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur abgekühlt oder über Nacht gefärbt. Zur Entfärbung wird das Gel entnommen und in mehrfach gewechselter Entfärbelösung (45% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Essigsäure in H₂O) solange entfärbt, bis der nicht proteingebundene Farbstoff entfernt ist. Um die Gele zu konservieren werden sie zwischen Geltrocknungsfolie (Promega), die von Geltrocknungspuffer (40% [v/v] Methanol, 7,5% [v/v] Essigsäure, 10% [v/v] Glycerol) durchnässt ist, in eine Geltrocknungsapparatur gespannt und für 3-4 Tage getrocknet.

2.3.6 Western Blot Analyse

Zunächst werden die Proteine mittels Nass- Blot- System (Biorad) oder Semi- dry- blotting Apparatur (PeqLab) nach einer SDS- PAGE auf Nitrocellulose (NC)- Membran (Optitran BA-S, Schleicher & Schuell) transferiert. Das Nass- Blot- System wird nach Angaben des Herstellers

luftblasenfrei und mit jeweils drei Lagen 3MM Whatman Papier zwischen Blotschwämmen und dem Gel-/ NC-Membran Sandwich zusammengebaut. Der Proteintransfer aus dem Gel erfolgt in Transferpuffer (12,5mM Tris, 95mM Glycin, 0,1% SDS, 20% [v/v] Methanol) für eine Stunde bei 70 V und ca. 300 mA bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 25 V und ca. 75 mA bei 4°C. Im Semi-dry- blotting System werden drei Lagen 3 MM Whatman Papier gefolgt von NC Membran, Gel, und weiteren drei Lagen Whatman Papier blasenfrei auf die Graphit Anode geschichtet und nachdem die Kathode aufgelegt ist, wird mit einer Stromstärke von ca. 2 mA/ cm² Filterfläche für eine Stunde geblottet. Anschließend wird der Proteinmarker auf der Membran mit Kugelschreiber nachgezeichnet und der Blot zur Kontrolle der Effizienz des Proteintransfers in Amidoschwarzlösung (30% [v/v] Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Amidoschwarz) angefärbt und nicht gebundener Farbstoff mit H₂O abgespült.

Für die Immunfärbung wird der Western Blot für 30 min in 5% w/v Magermilchlösung bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend über Nacht in dem gegen das zu detektierende Protein oder Peptid gerichtetem Primär- Antikörper in 5% w/v Magermilchlösung bei 4°C schüttelnd inkubiert. Der Blot wird bei Raumtemperatur dreimal für ca. 15 min in TST (50mM Tris- HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) gewaschen und mit dem gegen den Primär- Antikörper gerichteten Sekundär- Antikörper in 5% w/v Magermilchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Arbeit verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper sind in Tab.6 zusammengefasst. Die sekundären Antikörper- Peroxidase- Konjugate werden in der Chemolumineszenz Detektion sichtbar gemacht. Dazu wird der Blot für eine Minute in ca. 20ml ECL Reagenz (100mM Tris pH 8,5; 1,25mM Aminophthalhydrazide (Luminol, Fluka), 0,2mM Coumarinsäure; 0,01% H₂O₂) bei Raumtemperatur inkubiert und danach luftblasenfrei in durchsichtige Folien gelegt. In einer Expositionskassette wird ein UV- Film (X-OMAT UV Film, Kodak) auf den Blot gelegt und der Film exponiert (maximal 5 Minuten). Die Entwicklung des Films erfolgt in der Entwicklermaschine CAWOMAT 2000 IR (CAWO GmbH).

Tab. 6: Im Western Blot verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Referenz
anti- HA.11 16B12	Maus	1:1000	Babco
anti- Pre2/ β5	Kaninchen	1:1000	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1997
anti- Cim3/ Rpt6	Kaninchen	1:5000	Ghislain <i>et al.</i> , 1993
anti- GFP	Kaninchen	1:500	Clontech
anti- Karyopherin α	Kaninchen	1:3000	Enekel <i>et al.</i> , 1995
anti- Karyopherin β	Kaninchen	1:3000	G. Blobel
anti- Ubiquitin	Kaninchen	1:3000	DAKO
anti- Rpt2 (human)	Kaninchen	1:500	PW8305, Affiniti
Sekundäre Antikörper	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Referenz
anti- Kaninchen IgG- POD	Ziege	1:10000	DIANOVA
anti- Maus IgG- POD	Kaninchen	1:10000	DIANOVA

2.3.7 Proteaseassay mit fluorogenen Substraten

10µl einer Dichtegradientenzentrifugationsfraktion oder eines verdünnten Zellysats wird mit 100µl Substratpuffer (50mM Tris- HCl pH 7,5; 5mM MgCl₂; 0,05mM Peptidsubstrat) werden in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Greiner) vermischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei Aufarbeitungen unter Anwesenheit von ATP enthält der Substratpuffer ebenfalls ATP in einer Konzentration von 2mM. Werden die Aktivitäten mehrerer Gradienten verglichen, findet die Messung in der gleichen Mikrotiterplatte statt. Als fluorogene Substrate werden Z- leu- leu- glu- β Naphthylamid (Bachem) und Z- leu- leu- glu- 7- amino- 4- methyl- Coumarin (Calbiochem) als Test auf PGPH (*peptyl-glutamyl- peptide bond hydrolyzing*)- Aktivität sowie Suc- leu- leu- val- tyr- 7- amino- 4- methyl- Coumarin (Bachem) als Test auf chymotrypsinähnliche Aktivität des Proteasoms verwendet. Die Fluoreszenz der abgespaltenen fluorogenen Gruppen wird im Fluorostar Fluorimeter (SLT) mit Easy Software bei einer Anregungswellenlänge von 390nm bzw. 355nm und einer Abstrahlungswellenlänge von 460nm bzw. 405nm für die Abgangsgruppen 7-amino-4-methyl Coumarin (AMC) bzw. β- Naphthylamid gemessen.

2.3.8 Dichtegradientenzentrifugation

Die in Dichtegradienten aufgetrennten Lysate stammen vorwiegend aus Zellaufschlüssen unter flüssigem Stickstoff. 10-40% ige Glycerolgradienten werden im Gradientenmischer aus 5,7ml 10% iger Glycerollösung (10% [v/v] Glycerol in PB oder Puffer A) und 5,9ml 40% iger Glycerollösung (40% [v/v] Glycerol in PB oder Puffer A) in TH-641 oder SW40 Zentrifugenröhrchen (Beckman) vom Grund des Zentrifugenröhrchens gegossen. Der Gradient wird mit maximal 800µl Zellysat überschichtet und für 16 Stunden bei 40.000 rpm im SW40 Rotor (Beckman) oder im TH-641 Rotor (Sorvall) bei 4°C zentrifugiert. 600µl Fraktionen werden von der Öffnung des Röhrchens beginnend abpipettiert und auf Eis gehalten. Soll die relative proteasomale Aktivität gemessen werden, wird aus allen Fraktionen der Proteingehalt nach Bradford sowie die Proteaseaktivität gegen das

entsprechende fluorogene Substrat bestimmt. Aus dem Rest der Fraktion werden die Proteine über TCA ausgefällt und mittels SDS PAGE und Westernblot Analyse untersucht.

2.3.9 Far Western Analyse

NLS enthaltende Proteine werden mit Hilfe der Far Western Analyse mit Karyopherin α -ProA als Bindungspartner detektiert. Dazu werden MFY Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase unter Verwendung von Puffer PB mit EDTA freiem Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) in der French Pressure Cell aufgeschlossen. Die Zellreste werden entfernt (14000xg, 20 min) und das Lysat in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80°C bis zum Gebrauch tiefgefroren. Proteine oder Proteinkomplexe, die in der Far Western Analyse untersucht werden, werden im SDS PAGE Verfahren aufgetrennt und im Semi-dry-blot Verfahren unter Verwendung von Aminocaprinsäurepuffer (10mM Aminocaprinsäure, 10% Methanol) auf PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wird vor dem Transfer in 100% Methanol aktiviert. Ohne vorherige Amidoschwarzfärbung wird der Blot direkt nach dem Transfer in Renaturierungspuffer (50mM HEPES pH 7,3; 100mM KOAc; 5mM MgOAc; 0,3% Tween; 0,5% BSA) bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Membran wird für 30 Minuten in Blocking-Lösung (5% Magermilchpulver in PBST [80g/L NaCl; 2g/L KCl; 14,4g/L Na_2HPO_4 ; 2,4g/L KH_2PO_4 ; pH 7,4 mit HCl; 0,1% v/v Tween20]) bei Raumtemperatur geschwenkt. Werden NLS-GFPS Konstrukte untersucht erfolgt anschließend eine Inkubation in 10ml Blocking-Lösung die 20% CEY1b Lysat enthält, während bei der Untersuchung von Kernlokalisationssequenzen in 19S proteasomalen Untereinheiten 100% CEY1b Lysat verwendet wird. Als Kontrolle werden identisch behandelte Membranen in 10ml Blocking-Lösung mit $10\mu\text{g}$ Protein A inkubiert. Nach der Inkubation für 4 Stunden bei 4°C werden die Membranen dreimal 15 Minuten in PBST gewaschen, anschließend für eine Stunde in 5% Magermilchpulver mit Peroxidase gekoppeltem anti-Maus IgG Antikörper (1:10000) bei Raumtemperatur geschwenkt und danach wiederum dreimal 15 Minuten in PBST gewaschen. Mittels ECL Detektion werden NLS beinhaltende Proteine, die an Karyopherin α -ProA gebunden sind, nachgewiesen.

2.3.10 Direkte Fluoreszenzmikroskopie

Für die *in vivo* Lokalisation fluoreszenter Proteine werden die Zellen aus Selektivmedium soweit nicht anders angegeben bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase in YPD bei 28°C oder 37°C angezogen, einmal mit sterilem Wasser gewaschen und bis zur Mikroskopie auf Eis gehalten. In der Fluoreszenzmikroskopie wird das Leica DMR Mikroskop mit Quecksilberlampe HBO 50 W (Osram) und einem 100 x Ölimmersions-Objektiv (PL Fluotar) mit einer maximalen numerischen Apertur von 1,4 verwendet. Die für das jeweilige Fluorophor benutzten Filterblöcke sind in Tab. 7 zusammengefasst. Die Dokumentation erfolgt mit der Hamamatsu C5985 CCD Kamera in Verbindung mit der MetaVue Software (Visitron Systems, Puchheim) bei identischen Belichtungszeiten für alle Aufnahmen (2 sec, 2 fach gain). Zur Bestimmung der Pixelintensität von Rpn1-GFP und Rpn11-GFP in *srp1-49* und *SRP1* Zellen wird in Aufnahmen gleicher Belichtungszeit mit Hilfe des MetaVue Systems eine quadratische Fläche von etwa der Größe eines Fünftels des Zellkerns im Zytoplasma sowie im Zellkern gewählt und die durchschnittliche Pixelintensität dieser immer gleich großen Flächen berechnet. Mindestens 20 cytoplasmatische und nukleäre Werte von verschiedenen Aufnahmen werden gemittelt und das Verhältnis der Pixelintensitäten dieser Mittlungen für jeden Stamm berechnet, indem der Quotient aus der durchschnittlichen cytoplasmatischen und der durchschnittlichen nukleären Pixelintensität gebildet wird.

Tab. 7: In der direkten und indirekten Fluoreszenzmikroskopie verwendete Filterblöcke

Fluorophor	Wellenlänge (λ_{max})	Wellenlänge Filterblock	Filterblock
EGFP	488nm Exitation 507nm Emission	495nm Exitation 425nm Emission	FITC/ L4
ECFP	433nm Exitation 475nm Emission	440nm/ 20nm Exitation 480nm/ 30nm Emission	CFP
EYFP	513nm Exitation 527nm Emission	500nm/ 25nm Exitation 545nm/ 35nm Emission	YFP
Cy3™	552nm Exitation 568nm Emission	535nm/ 25nm Exitation 610nm/ 38nm Emission	Cy3™/ TRITC N2.1
DAPI	365nm Exitation 418nm Emission	340nm/ 80nm Exitation 425nm Emission	UV

2.3.11 Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz werden ca. 100ml Zellen einer Zelldichte von ca. 1×10^7 Zellen/ml pelletiert und zweimal in PBS gewaschen. Durch Inkubation in 1ml Formaldehydlösung (3,7% Paraformaldehyd in PBS) für 3 Minuten bei Raumtemperatur werden die Zellen fixiert und anschließend zügig abzentrifugiert, um sie in zweimal 10ml PBS zu waschen. Das Pellet wird in 1

Vol Protoplastierungspuffer (218,6g/L Sorbitol, 17,4g/L KH_2PO_4 , 7,0g/L Citrat) aufgenommen und mit 1/10 vol Glusulase sowie 1/100 Vol 1% Zymolyaselösung (Zymolyase 20T [ICN] in Protoplastierungspuffer) versetzt. Der Ansatz wird 90 Minuten bei 37°C inkubiert und dabei mehrfach invertiert. Die Protoplasten werden dreimal in 1,1M Sorbitol gewaschen (5 min, 2000xg) und das Pellet anschließend in 200 Vol Protoplastierungspuffer resuspendiert. Je ein Tropfen Protoplastenlösung wird in jede Vertiefung eines 15 well *multitest* Objektträgers gegeben, der zuvor mit 0,1% Poly- L- Lysin Lösung (MW 400 kDa, Sigma) beschichtet wurde. Nach 3-5 Minuten wird der Überstand vorsichtig entfernt und der Objektträger für 5 min in eiskaltes, sauberes Methanol getaucht bevor er für 30 Sekunden in sauberem Aceton inkubiert wird. Zum Trocknen wird der Objektträger kurz an der Luft geschwenkt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wird in jede Vertiefung für 10 Minuten ein Tropfen einer 1% igen BSA (*bovine serum albumin*)-Lösung in PBS gegeben. Nach Entfernung der Lösung wird sofort die Primärantikörperlösung wie folgt aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer auf dem Objektträger inkubiert: für den Nachweis HA markierter Proteine wird mAb12CA5 (Boehringer Mannheim) in einer Verdünnung von 1:100 und für den Nachweis verschiedener Nukleoporeine wird der mAB414 Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 1% BSA/ PBS eingesetzt. Der Primärantikörper wird entfernt und alle Vertiefungen dreimal mit 1% BSA/ PBS gewaschen, wobei jeder Waschgang 2 min einwirken gelassen wird. Als Sekundärantikörper wird Cy3™ gekoppelter Esel anti Maus IgG Antikörper (1:100 Verdünnung in 1% BSA/ PBS, Dianova) für mAb12CA5 und FITC gekoppelter Ziege anti Kaninchen IgG für mAB414 Antikörper (1:50 Verdünnung in 1% BSA/ PBS, R. Schekman, Berkeley) verwendet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen sechs Waschgänge in 1% BSA/ PBS, wobei nach dem dritten Waschgang für 20 min DAPI (4,6- Diamino-2- phenylindol) Färbelösung (1%) aufgetragen wird. Abschließend werden die Zellen in Moviol eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Mikroskopie erfolgt mit den in Tabelle beschriebenen Filterblöcken.

3 Ergebnisse

3.1 Funktioneller Austausch endogener 19S proteasomaler Untereinheiten gegen GFPHA, ProA oder HA markierte Varianten

Um den 19 S Regulator *in vivo* in *S. cerevisiae* lokalisieren zu können, werden die endogenen Kopien von Rpn1 als repräsentative 19S Lid Untereinheit und Rpn11 als repräsentative 19S Base Untereinheit mittels homologer Rekombination gegen die GFP-HA (*green fluorescent protein- Haemagglutinin epitop*) markierten Varianten ausgetauscht. *HIS3* und *URA3* werden dabei als Selektionsmarker eingesetzt. Durch Transformation von wt Stämmen werden die *RPN1-GFP-HA::URA3::HIS3* und *RPN11-GFP-HA::URA3::HIS3* Konstrukte an den gewünschten Stellen des *RPN1* bzw. *RPN11* Gens eingefügt und die Stämme PWn1GH und PWn11GH erzeugt (vgl. Abb. 7). Da Rpn1 und Rpn11 von essentiellen und einmalig im Genom vorhandenen Genen kodiert werden (Glickman *et al.*, 1998b; Rinaldi *et al.*, 1998), erfolgt der chromosomale Austausch dieser Untereinheiten durch Fusionsproteine nur dann, wenn die Fusionsproteine funktionell sind. Sowohl der Austausch von Rpn1 als auch von Rpn11 durch die GFP-HA oder Protein A markierten Varianten erbrachte lebensfähige Zellen. In der Western Blot Analyse aus Zellaufschlüssen dieser Stämme lassen sich GFP-HA markierte Proteine der molekularen Massen von 137 kDa (Rpn1-GFPHA) sowie 62 kDa (Rpn11-GFPHA) nachweisen (Abb. 10A). Beide Stämme (PWn1GH, PWn11GH) haben mit dem wt (WCGa) vergleichbare Wachstumsraten (Abb. 10B). Die *in vivo* Lokalisation von Rpn1-GFPHA und Rpn11-GFPHA in Zellen der logarithmischen Wachstumsphase ist sowohl im Temperaturoptimum (28°C), als auch unter Temperaturstress (37°C) vorwiegend nukleär (Abb. 10C). Die beobachtete cytoplasmatische Färbung erreicht nur ca. 1/5 der Intensität der nukleären Färbung.

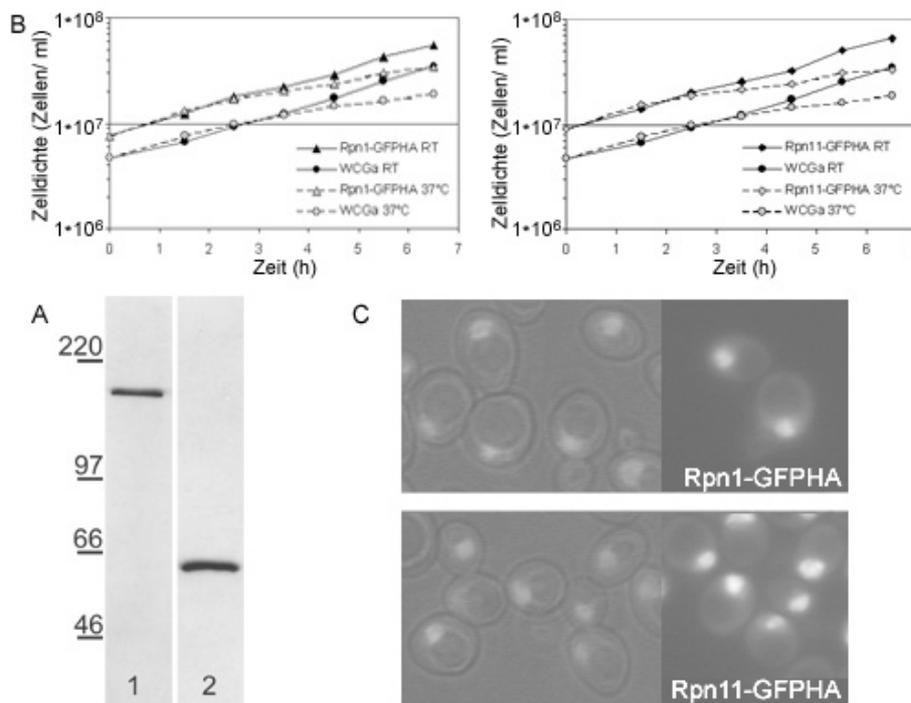


Abb. 10 (A) Zellextrakte von PWN1GH (1) und PWN11GH (2) wurden in der SDS PAGE aufgetrennt und in der Western Blot Analyse mit anti- HA Antikörper untersucht. **(B)** Stämme, die Rpn1-GFPHA (linke Abb.) oder Rpn11-GFPHA (rechte Abb.) exprimieren, wachsen bei 28°C und 37°C mit vergleichbarer Wachstumsrate wie der Wildtyp Stamm WCGa. **(C)** *In vivo* Lokalisation von GFPHA markiertem Rpn1 (obere Abb.) sowie Rpn11 (untere Abb.) in PWN1GH und PWN11GH. Die fluoreszierenden Untereinheiten werden in direkter Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht, indem der FITC Filterblock (rechts) oder simultan FITC Filterblock und Normarski Filter (links) verwendet werden.

Enenkel und Mitarbeitende (1998) beschreiben die proteasomale Lokalisation in *S. cerevisiae* Zellen als Kernmembran/ER assoziiert. Die Färbung von Zellkern und Endoplasmatischem Retikulum (ER) lässt sich aufgrund der geringen Größe von *Saccharomyces cerevisiae* Zellen in der direkten Fluoreszenzmikroskopie nur schwer auflösen, so dass nicht zu bestimmen ist, ob die markierten Untereinheiten im oder am Zellkern lokalisieren. Deshalb werden Stämme erzeugt, in denen endogenes Rpn1 oder Rpn11 jeweils gegen die CFP-HA (*cyan fluorescent protein*) markierte Variante ausgetauscht ist und zugleich GFP markiertes Nukleoporin Nup49, ER- ständiges Protein Pdr5* oder Plasmamembranprotein Pdr5 von autonom replizierenden Plasmiden mit Centromer Sequenz exprimiert wird (PWN1Cn49G, PWN1Cp5G, PWN11Cn49G und PWN11Cp5G). Nup49, Pdr5 und Pdr5* dienen dabei als Marker für die beschriebenen Zellstrukturen (Bucci und Wente, 1998; Egner *et al.*, 1995). Durch direkte Fluoreszenzmikroskopie mit Filterblöcken für FITC/ GFP und CFP werden beide mit Fluorophoren markierten Proteine parallel in der gleichen Zelle lokalisiert (Abb. 11A). CFP-HA markierte 19S Untereinheiten colokalisieren in der logarithmischen Wachstumsphase weder eindeutig mit dem ER- ständigen oder Plasmamembran ständigen Protein Pdr5* bzw. Pdr5 noch mit Nukleoporin Nup49, sondern zeigen vorwiegend Kernlokalisierung. Eine Colokalisation von Rpn1 und Nup49 wird jedoch beobachtet, wenn die Zellen vor der direkten Fluoreszenzmikroskopie für 45 min in Wasser inkubiert werden (Abb. 11B). Zwei weitere in dieser Arbeit betrachteten 19S Base

Untereinheiten (Rpt2 und Rpn2) sind unter Standardbedingungen (28°C) ebenfalls vorwiegend im Zellkern lokalisiert (vgl. Ergebnisse Kap. 3.5 und Kap. 3.6).

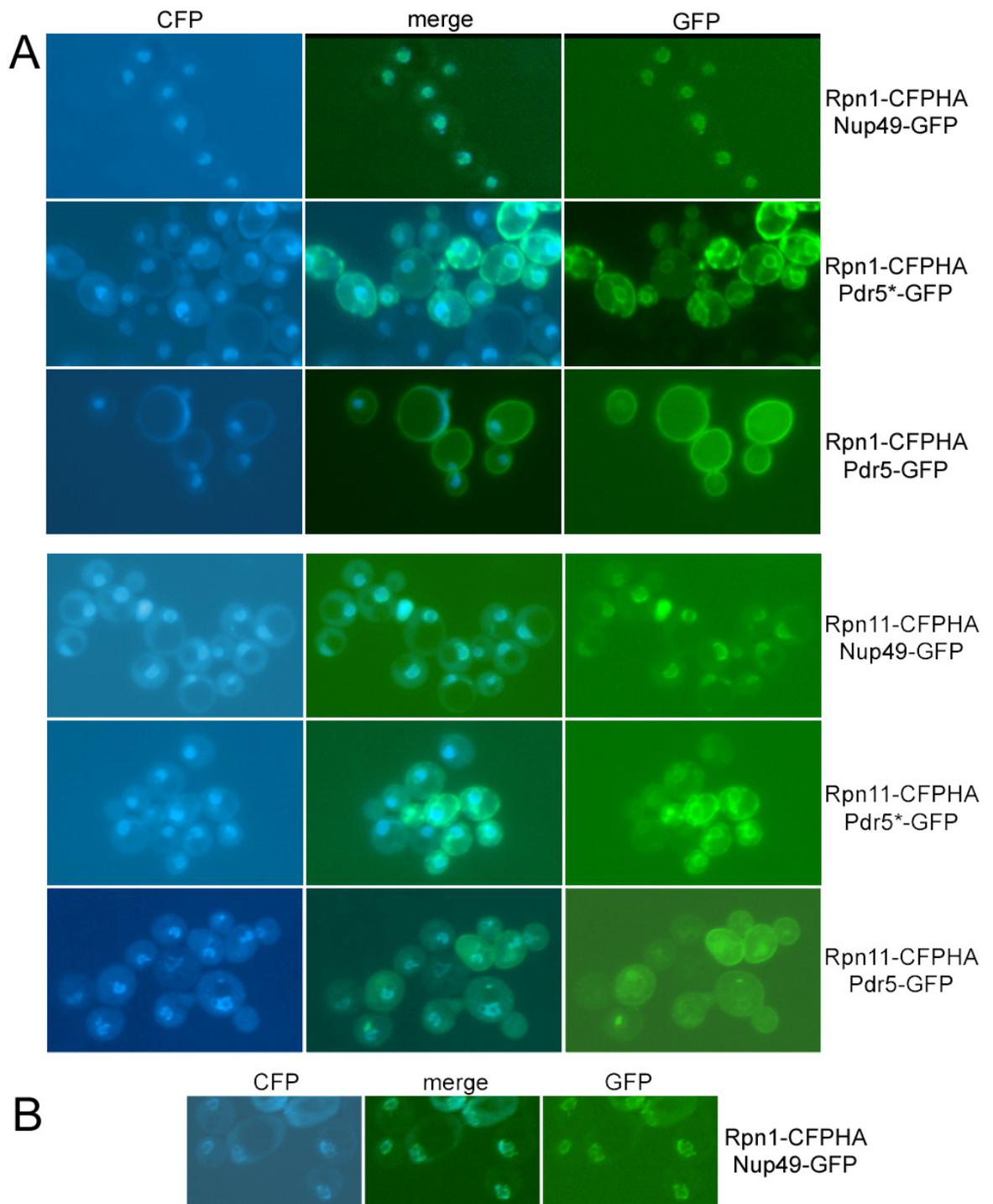


Abb. 11: (A) Parallele Fluoreszenzmikroskopie der *in vivo* Lokalisation von Rpn1-CFPHA oder Rpn11-CFPHA und Markerproteinen bestimmter Zellkompartimente. In Zellen, deren endogenes Rpn1 bzw. Rpn11 gegen die CFPHA markierte Variante ausgetauscht ist, werden die GFP markierten Varianten von Nup49, Pdr5* bzw. Pdr5 als Nukleoporin-, Endoplasmatisches Retikulum- bzw. Zellmembranmarker von Centromer tragenden Plasmiden exprimiert. Fluoreszierende 19S Untereinheiten werden mit dem CFP Filterblock (links), GFP markierte Proteine mit dem FITC Filterblock (rechts) aufgenommen und mit der Software Adobe Photoshop 6.0 ineinander kopiert (Mitte). **(B)** Zellen, die CFPHA markiertes Rpn1 sowie GFPHA markiertes Nup49 exprimieren, werden aus der logarithmischen Wachstumsphase für 45 min in Wasser inkubiert und die *in vivo* Lokalisation der Fluorophore wie unter 11 (A) mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die Markierung der 19S Untereinheiten mit Proteinen der Größe von GFP (28kDa)

könnte den Einbau dieser Untereinheit in den 19S Komplex beeinträchtigen. Um zu belegen, dass die markierten Untereinheiten vollständig im 19S/26S Komplex eingebaut sind, werden PWN1GH und PWN11GH Lysate in 10-40% iger Glycerol- Dichtegradienten Zentrifugation aufgetrennt und alle Fraktionen in der Western Blot Analyse auf Anwesenheit der 19S Base Untereinheit Cim3/Rpt6, der 20S Untereinheit α 1/ Scl1 sowie des GFP-HA markierten Proteins überprüft (Abb.12). Rpn1-GFPHA und Rpn11-GFPHA sedimentieren in den Gradienten im wesentlichen wie Cim3/Rpt6 und α 1/ Scl1 in den Fraktionen 10 bis 20, sind aber zu geringen Anteilen auch in den Fraktionen 8 und 9 nachweisbar. Es sind keine freien, markierten Untereinheiten in den langsam migrierenden Fraktionen (vgl. Fraktionnr. 1-4) zu detektieren.

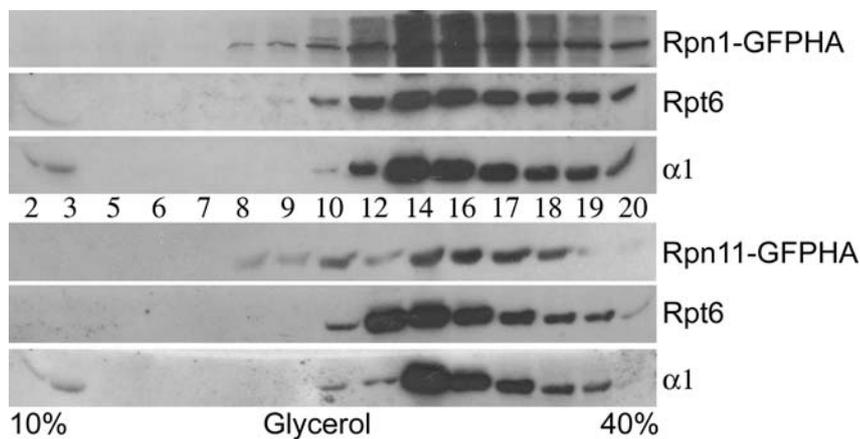


Abb. 12: PWN1GH und PWN11GH Lysate werden im Glyceroldichtegradienten sedimentiert und die angegebenen Fraktionen in der SDS PAGE aufgetrennt. In der folgenden Western Blot Analyse werden die HA markierten Untereinheiten, Rpt6 sowie α 1 mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

Die Analyse im Glycerolgradienten lässt keine Aussage über die Zusammensetzung des mit den markierten Untereinheiten assoziierten Komplexes zu. Deshalb werden Rpn1 und Rpn11 C- terminal mit Protein A markiert und die Komplexe, in denen diese Untereinheiten inkorporiert sind, in einer Coimmunpräzipitation an IgG Sepharose isoliert. Der Austausch der endogenen Proteine gegen ihre Protein A markierten Varianten erfolgt mit Hilfe der homologen Rekombination von *RPN1-ProA::URA3::HIS3* und *RPN11-ProA::URA3::HIS3* in die Genloci von *RPN1* und *RPN11* (PWN1P, PWN11P). Die Protein A Markierung umfasst hierbei fünf IgG bindende Domänen (insgesamt 30 kDa). Rpn1-ProA und Rpn11-ProA assoziierte Komplexe werden mittels Standard IgG Sepharose Affinitätschromatographie aus PWN1P und PWN11P Lysaten aufgearbeitet und in der SDS PAGE aufgetrennt [Abb. 13 (1) und (2)]. Die Coomassie gefärbten Proteine aus PWN1P Lysaten werden in der Analyse durch Fingerprint Massenspektroskopie den 19S regulatorischen Untereinheiten, Ecm29 und Ubp6 zugeordnet. Mit Ausnahme der unterrepräsentierten Untereinheit Rpn10 ist die Stöchiometrie der einzelnen Proteine zueinander nahezu identisch. In Abhängigkeit des gewählten Aufschlusspuffers lässt sich in der IgG Sepharose Affinitätschromatographie der 19S Regulator oder das gesamte 26S Proteasom isolieren. In Puffer PB copräzipitieren mit der Protein A markierten

Untereinheit lediglich 19S Untereinheiten, während in dem ATP und MgCl₂ enthaltenden Puffer A 26S Proteasomen präzipitiert werden können [Abb. 13 (3)]. Die Funktionalität der markierten Untereinheiten sollte unter Standardbedingungen gegeben sein, da essentielle Untereinheiten ausgetauscht worden sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindungen dieser Untereinheiten zu anderen 19S Untereinheiten oder Substraten auch unter Standardbedingungen durch die Markierung geschwächt oder verstärkt werden. So ist zum Beispiel zu beobachten, dass Rpn11-ProA in Aufarbeitungen in Puffer PB kaum Rpn12 copräzipitiert sowie Rpn1-ProA kaum Ecm29 präzipitiert, während unter den gleichen Bedingungen Rpn11-ProA Ecm29 und Rpn1-ProA Rpn12 copräzipitieren.

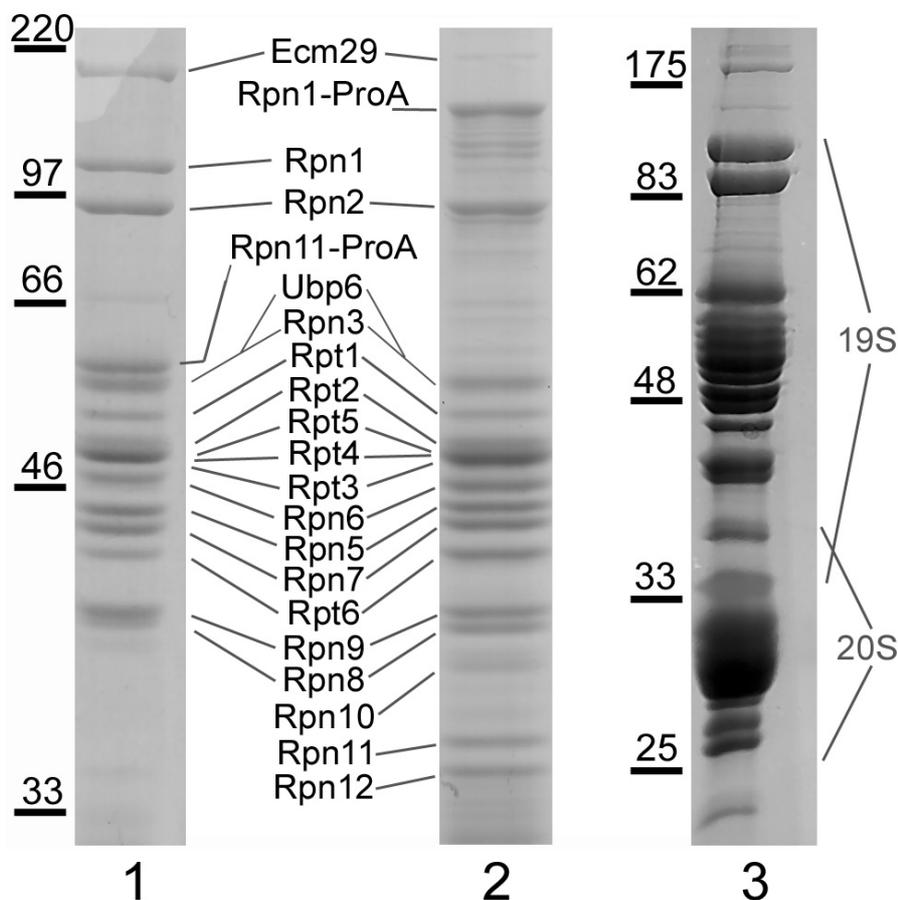


Abb. 13: Rpn1-ProA und Rpn11-ProA präzipitieren 19S und 20S proteasomale Untereinheiten. 19S Komplexe aus P_{Wn1P} (2) und P_{Wn11P} (1) Lysaten werden in der Standard IgG Affinitätschromatographie aufgereinigt und im SDS PAGE aufgetrennt. In der Coomassie Färbung sichtbare Proteine aus (2) werden in der Massen Fingerprint Analyse bestimmt. IgG Affinitätschromatographie unter Anwesenheit von Puffer A präzipitiert aus P_{Wn11P} Lysaten 26S proteasomale Untereinheiten (3). Molekulargewichtsmarker in kDa sind angegeben.

3.2 Untersuchung klassischer Kerntransportmutanten

Der 19S regulatorische Komplex besteht aus mindestens 17 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von insgesamt ca. 1 MDa. Allein die 19S Base Untereinheiten ergeben ein Gesamtmolekulargewicht von ca. 500 kDa. Für die, in die Kernmembran eingebetteten Kernporen wurde gezeigt, dass ab einer Partikelgröße von 9 nm bzw. einem Molekulargewicht von 40 kDa freie Diffusion in den Zellkern sehr ineffizient wird (Paine *et al.*, 1975) und selbst kleinere Proteine, wie z. B. Histone, aktiv in den Zellkern gelangen

(Jakel *et al.*, 1999). Die Kernlokalisierung der 19S regulatorischen Komplexe sollte dementsprechend auf einen Transporter- vermittelten Kernimport zurückzuführen sein und der verantwortliche Transporter über die Analyse von *S. cerevisiae* Mutationsstämmen, die einen Defekt im Kernimportweg zeigen, bestimmt werden können. Aus diesem Grund werden die GFP-HA markierten Varianten von Rpn1 und Rpn11 in Stämme mit Mutationen in folgenden Genen sowie deren entsprechende wt Stämme eingeführt: *srp1-49*, *srp1-31*, *rat2-1*, *nup133*, *pse1-1*, *kap95*. Eine Beschreibung der jeweiligen Mutation der Stämme ist in Tab. 8 dargestellt; der Genotyp und die Herkunft in Tab. 5. Die *srp1-49* Mutation wurde anhand der durch die Mutation eingeführten *Xba*I Schnittstelle in einer Restriktion des *srp1-49* PCR- Produkts verifiziert. Die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten 19S Untereinheiten in Zellen der logarithmischen Wachstumsphase nach 4 Stunden Inkubation bei permissiven (28°C) und restriktiven (37°C) Temperaturbedingungen wird in den resultierenden Stämmen (Tabelle 5) über direkte Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Alle Stämme zeigen bei permissiver Temperatur eine überwiegende Kernlokalisierung der 19S Untereinheiten. Bei restriktiver Temperatur zeigt sich lediglich in *srp1-49* Zellen im Vergleich zu den entsprechenden wt Zellen eine signifikante Veränderung des Fluoreszenzsignals, insofern dass die cytoplasmatische Fluoreszenz von GFP markiertem Rpn1 und Rpn11 deutlich ansteigt (Abb. 13A). In allen anderen Mutationsstämmen werden durch die Inkubation bei restriktiver Temperatur keine signifikanten Änderungen in der Verteilung des Fluoreszenzsignals ausgelöst. Die in dieser Arbeit angestrebte Charakterisierung der 19S Kernimportkomplexe setzt voraus, dass diese Komplexe in der Zelle angereichert vorliegen. In wt Zellen sind GFP markierte 19S Untereinheiten vorwiegend nukleär lokalisiert und Kernimportkomplexe nicht von 19S Komplexen unterscheidbar. Die deutliche cytoplasmatische Delokalisation der 19S Untereinheiten in *srp1-49* Zellen weist auf einen Anstau von Kernimportkomplexen in dieser Mutante hin. Deshalb wird nachfolgend untersucht, ob die GFP markierten 19S Untereinheiten in den *srp1-49* Stämmen frei oder komplexiert vorliegen.

Tab. 8: Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Mutationsstämmen, die einen Defekt im Kernimportweg zeigen. Die gekennzeichneten (*) Autoren haben die temperatursensitiven Mutanten generiert. Wenn die publizierten Ergebnisse aus gleichen Arbeitsgruppen stammen, sind die Zitate mit (°) markiert.

Stamm	Eigenschaft	Referenz
<i>srp1-49</i> (Kar α)	Defekt in Ub- Pro- β gal Degradation; G2/M Arrest; Sts1 und Rpn11 sind high- dosage Suppressoren der Mutation; kein Defekt in cNLS Bindung	Tabb <i>et al.</i> , 2000 [°]
	Glu-145 →Lys → Lokalisation der Mutation in der 1. Armadillo Sequenz; Zellzyklusdefekte; verlangsamtes Wachstum; Phänotyp ähnelt dem von Srp1 depletierten Zellen; Temperatursensitivität	Yano <i>et al.</i> , 1994 ^{°*}
	G2/M Arrest; <i>in vivo</i> Importdefekt von SV40NLS-GFP und Histon; Glu-145 →Lys ; Temperatursensitivität	Enenkel, unveröffentlicht
<i>srp1-31</i> (Kar α)	Defekt in cNLS Bindung und Protein Import; G2/M Arrest aufgrund defekter Cyclin Proteolyse	Loeb <i>et al.</i> , 1995
	Verlust der NLS Bindungsaktivität <i>in vitro</i>	Shulga <i>et al.</i> , 1996 [°]

	Ser-116 →Phe → Lokalisation der Mutation vor der 1. Armadillo Sequenz; Ser116 ist konservierte Aminosäure in Karyopherin α Isoformen; Chromosomeninstabilität; normales Wachstum	Yano <i>et al.</i> , 1994 ^o *
<i>rat2-1</i> (Nup120)	Defekt im Boten- RNA (mRNA) Export aus dem Zellkern ins Cytoplasma; Anhäufungen von Kernporenkomplexen in wenigen Regionen der Kernmembran; kein Defekt im NLS abhängigen Import	Heath <i>et al.</i> , 1995*
<i>nup133</i>	Anhäufungen von Kernporenkomplexen	Belgareh und Doye, 1997*
<i>pse1-1</i>	Temperatursensitivität; Normale Verteilung nukleärer Proteine; mRNA Export Defekt	Seedorf und Silver, 1997*
	cytoplasmatische Lokalisation von Pdr1; Hypersensitivität gegen Cycloheximid und 4- Nitroquinolin- N- Oxid	Delahodde <i>et al.</i> , 2001
	cytoplasmatische Lokalisation von Spo12; Sporulationsdefekt in <i>pse1-1/ pse1-1</i> Stämmen	Chaves und Blobel, 2001
<i>kap95</i>	NES Mutation in Karyopherin β ; kein Export von Kap95 und Karyopherin α aus dem Zellkern; kein Import von NLS Reporterprotein nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C	Iovine und Wentz, 1997*

Zunächst soll jedoch die subjektive Abschätzung der Pixelintensitäten der GFP markierten Untereinheiten in *srp1-49* Zellen durch eine Quantifizierung aus digitalen Aufnahmen im MetaVue- Programm ersetzt werden. Aus Aufnahmen identischer Belichtungszeiten wird, wie in Materialien und Methoden beschrieben, die cytoplasmatische zur nukleären Fluoreszenzintensität ins Verhältnis gesetzt. Ist der Import der markierten Untereinheit gestört (restriktive Temperatur), sollte eine Zunahme der cytoplasmatischen Färbung und eine Abnahme der Kernfärbung im Vergleich zu ungestörtem Import (permissive Temperatur) zu beobachten sein. Das Verhältnis von cytoplasmatischer zu nukleärer Pixelintensität sollte unter restriktiven Bedingungen zunehmen. Die Quantifizierung der Pixelintensitäten in *srp1-49* Zellen sowie *SRP1* wt Zellen ergibt, dass das Verhältnis der cytoplasmatischen zur nukleären Pixelintensität für Rpn1-GFPHA und Rpn11-GFPHA unter restriktiven Bedingungen in der Mutante deutlich (um 18% bzw. 14%) und im wt nur leicht (um 6% bzw. 5%) ansteigt (Abb. 14B). Die Pixelintensität im Zellkern der *srp1-49* Zellen bleibt dabei nahezu konstant, während die der wt Zellen abnimmt. Die cytoplasmatische Pixelintensität dagegen steigt in *srp1-49* Zellen deutlich an, während die der wt Zellen konstant bleibt.

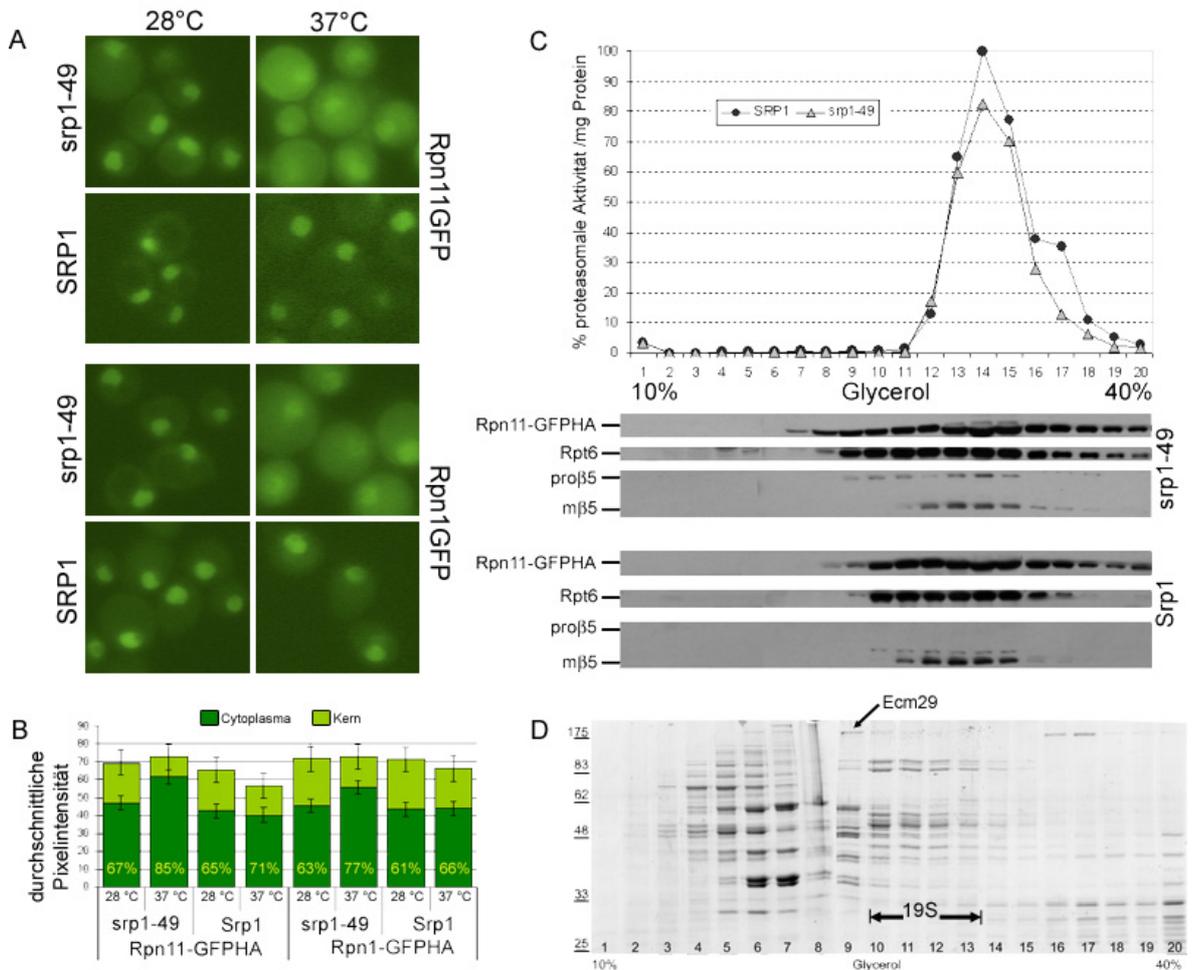


Abb. 14: (A) Rpn1 und Rpn11 sind in *srp1-49* und SRP1 Zellen gegen die GFPHA markierten Varianten ausgetauscht. Die *in vivo* Lokalisation der fluoreszierenden Untereinheiten wird nach 3 Stunden Wachstum bei 28°C bzw. 37°C mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. **(B)** Die nukleäre und cytoplasmatische GFP Pixelintensität der digitalen Aufnahmen von wenigstens 20 Zellen der in A abgebildeten Stämme wird quantifiziert, um die durchschnittliche Pixelintensität zu erhalten. Die mittlere Standardabweichung ist für alle Werte angegeben. Das Verhältnis von durchschnittlicher cytoplasmatischer zu nukleärer Pixelintensität für alle Stämme bei permissiver und restriktiver Temperatur ist in Prozent dargestellt. **(C)** Wild Typ und *srp1-49* Zellen, die Rpn11-GFPHA anstelle des endogenen Proteins exprimieren, werden für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und die Lysate dieser Zellen im Puffersystem ohne ATP Zusatz in der Glycerolgradientenzentrifugation aufgetrennt. Aus allen Fraktionen wird der Proteingehalt sowie die Protease- Aktivität gegen Suc- Leu- Leu- Val- Tyr- 7- Amino- 4- Methyl- Coumarin bestimmt und die relative proteasomale Aktivität pro mg Protein als prozentualer Wert des Maximalwerts errechnet. In der Western Blot Analyse werden die HA markierten Proteine, Rpt6 und β5 aller Fraktionen mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen. Das Signal der prozessierten β5 Untereinheiten deckt sich mit der proteasomalen Aktivität und zeigt damit die 20S enthaltenden Fraktionen an. Nicht prozessierte β5 Untereinheiten zeigen die Fraktionen des 13-16S Vorläuferkomplex des 20S Proteasoms an. **(D)** 26S Proteasomen werden aus PCE6 Lysaten in Puffer A an IgG Sepharose gebunden, 19S Komplexe mit 600mM NaCl nativ eluiert und in 10- 40% igen Glycerolgradienten sedimentiert. Proteine aller Fraktionen werden im SDS PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Färbelösung visualisiert.

In Untersuchungen zum Kerntransport von 20S Proteasomen zeigt der *srp1-49* Stamm nach vierstündiger Inkubation unter restriktiven Temperaturbedingungen eine Anreicherung von Ump1 assoziierten, halben proteasomalen Core- Partikeln (hCP) im Cytoplasma (Lehmann *et al.*, 2002). Die cytoplasmatische Anreicherung der markierten 19S Untereinheiten erfolgt unter den gleichen Bedingungen. Deshalb sollten PWN11*srp1-49* Zellen nach Inkubation bei 37°C für 4 Stunden ebenfalls 20S proteasomale Vorläuferkomplexe anreichern. Um dies zu belegen und um zu erfahren, ob die

cytoplasmatisch lokalisierten 19S Untereinheiten frei oder komplexiert vorliegen, werden Lysate der Stämme PWN11srp1-49 und PWN11SRP1 in einer 10-40% igen Glycerolgradienten Dichtezentrifugation aufgetrennt. Aus allen Fraktionen wird eine Proteinbestimmung, eine Analyse der chymotrypsinähnlichen, proteasomalen Aktivität sowie eine Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen HA, Cim3/Rpt6 und Pre2 durchgeführt (Abb. 14C). Das Maximum der proteasomalen Aktivität gegen fluorogenes Substrat fällt zusammen mit dem Signal für reifes Pre2/β5 (mβ5) in der schnell sedimentierenden Fraktion 14. 19S proteasomale Untereinheiten dagegen lassen sich im wt schon in Fraktion 10 und 11 nachweisen und cosedimentieren damit nicht nur mit der 20S proteasomalen Aktivität. In *srp1-49* Zellen finden sich Rpn11-GFPHA und Cim3/Rpt6 schon in den langsam migrierenden Fraktionen 8 und 9, ein geringer Anteil Cim3/Rpt6 sogar in Fraktion 4 und 5. Außerdem ist in Fraktion 9-11 sowie 13-15 unprozessiertes pro-Pre2 zu detektieren, das auf die Anwesenheit von hCP bzw. naszierenden Core- Partikeln hinweist.

Das Laufverhalten der 20S Proteasomen im Glycerol- Dichtegradienten lässt sich anhand der in den einzelnen Fraktionen messbaren Proteaseaktivität gegenüber fluorogenen Substraten gut abschätzen. Demnach sedimentiert freies 20S Proteasom in den Fraktionen 12-16, während 26S Proteasomen in den schneller migrierenden Fraktionen 14-20 zu erwarten sind, wie aus Messung der Proteaseaktivität unter Anwesenheit von ATP in der Glycerol- Dichtegradienten Zentrifugation hervorgeht (vgl. Abb. 28). Die 26S Aktivität gegen fluorogenes Substrat unter Anwesenheit von ATP ist dabei ca. dreimal so hoch wie die der 20S Proteasomen. 19S proteasomale Aktivität lässt sich unter diesen Assaybedingungen nicht messen. Aufgrund dessen wird das Laufverhalten von 19S Proteasomen im 10-40% igen Glycerol- Dichtegradienten aufgeklärt, indem der aufgereinigte 19S Komplex einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen wird. Für die Aufreinigung von nativen 19S Komplexen nach Saeki und Mitarbeitenden (2000) werden zunächst 26S Proteasomen aus PCE6 Lysaten über Pre6-ProA unter Verwendung von Puffer A an IgG- Sepharose gebunden. Der native 19S Regulator wird mit PufferB₆₀₀ (600mM NaCl) von den IgG gebundenen 20S Proteasomen abgelöst und über Glycerol-Dichtegradienten aufgetrennt. Im Coomassie gefärbten Gel sind die Untereinheiten des 19S Regulators in nahezu stöchiometrischer Verteilung jeweils in den Fraktionen 10-13 zu erkennen (Abb. 14D). Die höchste Proteinmenge findet sich in Fraktion 10. Der Vergleich des Laufverhaltens der 19S Untereinheiten in den Glycerolgradienten in Abbildung 14C und 14D zeigt, dass die 19S Untereinheiten im Srp1 wt Stamm PWN11SRP1 vorwiegend in 19S Partikel eingebaut sind (Sedimentation ab Fraktion 10), während die 19S Untereinheiten in der Mutante PWN11srp1-49 in Komplexe geringerer Dichte inkorporiert sind (Sedimentation ab Fraktion 8).

3.3 Klassische Kernlokalisationssequenzen im 19S Base sowie Lid Komplex

Da sich Rpn1 und Rpn11 in der Kerntransportmutante mit mutiertem Srp1/Kap60 unter

restriktiven Bedingungen cytoplasmatisch anreichern, lässt sich vermuten, dass 19S regulatorische Komplexe aktiv und signalvermittelt über Karyopherin α/β in den Zellkern transportiert werden. Der Karyopherin α/β abhängige Kernimport wird durch Kernlokalisationssequenzen vermittelt, die aus ein (monopartite) oder zwei (bipartite) Regionen basischer Aminosäuren bestehen. Obwohl die Variabilität verschiedener NLS hoch ist, konnten anhand der Kristallstrukturen von mono- sowie bipartite NLS enthaltenden Peptiden gebunden an Karyopherin α Konsensussequenzen für beide NLS bestätigt werden (Fontes *et al.*, 2000 und 2003). Die monopartite NLS Konsensussequenz ist K R/K X R/K, die der bipartite cNLS K R X10-12 K R X K. Der Karyopherin α/β abhängige Kernimport der 19S Regulatoren, lässt vermuten, dass die Untereinheiten des 19S Komplexes klassische Kernlokalisationssequenzen aufweisen. Die in der Sequenzanalyse aller 19S Untereinheiten detektierten, potentiellen cNLS der 19S Lid sowie Base Untereinheiten sind in Abb. 15 zusammengefasst. Die C- terminalen Bereiche aller ATPase Untereinheiten sowie Rpn8 enthalten keine potentiellen NLS in Übereinstimmung mit den Konsensussequenzen, sind aber auffällig basisch und deshalb ebenfalls abgebildet. Mit der Konsensussequenz für bipartite NLS übereinstimmende Peptidsequenzen finden sich in Rpt4 und Rpn2, während monopartite NLS Peptidsequenzen in Rpn1 und Rpt2 sowie den 19S Lid Untereinheiten Rpn5, Rpn6, Rpn9 und Rpn12 lokalisiert sind. Es sollte jedoch beachtet werden, dass sich nicht alle Lysinreichen Sequenzen *in vivo* als funktionelle Kernlokalisierungssignale erweisen, ebenso wie *in vivo* funktionelle cNLS nicht zwangsläufig mit einer der Konsensussequenzen übereinstimmen müssen.

¹ MGQGVSSGQD <u>KKKKK</u> GSNQKPKYEPVQSKFG <u>RKKRK</u> GGPATAEKLPNIYPST ⁵³	Rpt2/Yta5
⁵⁵ KALNQFKRK <u>LLEHRRYDDQLQRRQNI</u> R ⁸³	Rpt4/Sug2
⁸⁰⁴ LSTTARAKARAK <u>KTKEK</u> GPNEEE <u>KKK</u> EHEEKEKERETNKKGIKETKEND ⁸⁵⁷	Rpn2/Sen3
²¹ E <u>KQTPN</u> <u>KKDKKK</u> EEEEQLS ⁴⁰	Rpn1/Hrd2
⁴²⁰ SVCTEAGMFAIRARRKVAEKDFLKAVDKVISGYKKFSSTSRYMQYN ⁴⁶⁷	Rpt1/Cim5
³⁹³ AMCTEAGLLALRERRMQVTAEDFKQAKERVMKKNKVEENLEGLYL ⁴³⁷	Rpt2/Yta5
³⁸⁴ AIMQEAGLR ^{AVRKNRYVILQSDLEEAYATQV} KTNTVDKDFYK ⁴²⁸	Rpt3/Yta2
³⁹² NCATEAGFFAIRDDRDHINPDDLKAVRKVAEVKKLEGTIEYQKL ⁴³⁷	Rpt4/Sug2
³⁹² AVTVEAGMIALRNGQSSVKHEDFVEGISEVQARKSKSVSFYA ⁴³⁴	Rpt5/Yta1
³⁵⁹ GVCTEAGMYALRERRIHVTQEDFELAVGKVMNKNQETAISVAKLFLK ⁴⁰⁵	Rpt6/Cim3
⁴⁰ LVLE <u>KKTR</u> QASDL ⁵³	Rpn5/Nas5
¹¹⁹ EKSIEFAKREKR ^{VFLKHLSL} IKLATLHYQKKQYK ¹⁵³	Rpn6/Nas4
³²³ DKEATAPLIQRKNKKN ³³⁹	Rpn8
⁹⁷ KYLDDLKAQFQELDS <u>KKQR</u> NNGSK ¹²¹	Rpn9
⁹⁸ ESD <u>KKSK</u> LISLYLLNLL ¹¹⁵	Rpn12/Nin1

Abb. 15: Potentielle Kernlokalisationssequenzen der 19S Untereinheiten sind grau unterlegt. Sequenzen, die mit den Konsensussequenzen übereinstimmen, sind unterstrichen. Die Position der Aminosäuresequenz in den jeweiligen Proteinen ist angegeben.

3.4 19S Base NLS- GFPS Fusionsprodukte lokalisieren im Zellkern und copräzipitieren Kar α/β *in vivo*

Unter der Annahme, dass die potentiellen cNLS des 19S regulatorischen Komplexes *in vivo* als Kernlokalisationssequenz für Karyopherin α/β abhängigen Import fungieren, sollten diese Sequenzen in der Lage sein ein Reporterprotein in lebenden Zellen in den

Zellkern zu dirigieren. Deshalb werden potentielle NLS aus Rpt2 (DKKKKKGSNQPKYEPPVQSKFGRKKRK), Rpn2 (KARAKTKKEKGPNEEEKKK) sowie Rpt1 (RARRKVATEKDFLKAVDK), wie in Abb. 9 dargestellt, als Fusionsprotein mit GFP und dem Strep- tag II (S) unter dem Galaktose Promotor induzierbar exprimiert und die *in vivo* Lokalisation dieser Fusionsproteine bestimmt. Als Kontrollen dienen die monopartite cNLS des SV40 T- Antigen (PKKKRKV) sowie deren nicht funktionelle, mutierte Variante (PKTKRKV) (Kalderon *et al.*, 1984 a und b). Die Rpt1 und Rpn2 Sequenzen sowie die der Kontrollen werden als komplementäre Oligonukleotidstränge miteinander hybridisiert und in den linearisierten pYESGFPS Vektor ligiert. Der N-terminale Bereich von Rpt2 wird mittels PCR amplifiziert und über die entsprechenden Schnittstellen in pYESGFPS ligiert (siehe Materialien und Methoden). Durch Transformation von wt Zellen mit den erzeugten Vektoren entstehen die Stämme PWRpt1G, PWRpn2G, PWRpt2G, PWSV40G und PWSV40G.

Die Expression der Fusionsproteine in diesen Stämmen wird aus der logarithmischen Wachstumsphase durch Inkubation für 4 Stunden in synthetischem Galaktose Selektionsmedium induziert. Abb. 16 A zeigt die *in vivo* Lokalisation der 19S NLS- GFPS Fusionsproteine in direkter Fluoreszenzmikroskopie. Die NLS ähnliche Sequenz aus Rpt2 wird dabei nahezu so effizient wie die SV40 NLS in den Zellkern transportiert, während die Kernfärbung in Zellen, die das Rpn2 NLS Fusionsprotein exprimieren etwas schwächer erscheint. Die Arginin- und Lysinreiche Sequenz im Rpt1 C- terminalen Bereich führt im Gegensatz zur mutierten SV40 NLS zu einer erkennbaren Lokalisation der Fusionsproteine im Zellkern, ist darin aber sehr viel ineffizienter als die anderen 19S Sequenzen.

Da die ausgewählten 19S Sequenzen GFPS in den Zellkern leiten, sollte es möglich sein, die verantwortlichen Kerntransporter aus Lysaten der oben genannten Stämme über Strep- tag II Affinitätschromatographie in Bindung an die jeweilige cNLS zu präzipitieren. Dazu werden ca. 2×10^{10} Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase 6 Stunden in Galaktose Selektionsmedium induziert, in der French Press Zelle aufgeschlossen und über Strep- tag II Affinitätschromatographie gereinigt. Gleiche Proteinmengen aller Eluate werden in der SDS PAGE aufgetrennt und in der Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen Karyopherin α und β sowie GFP untersucht (Abb. 16 B). Die ECL Signale der GFP Fusionsproteine sind in allen Eluaten nahezu gleich intensiv, während sich die Signalstärken für die assoziierten Kerntransporter deutlich unterscheiden. So sind nur wenig Kara/ Kar β in den Eluaten der mutierten SV40 NLS- GFPS sowie der Rpt1 NLS- GFPS Konstrukte zu detektieren. Etwa gleiche Mengen Transporter sind dagegen mit den Fusionsproteinen aus SV40 NLS, Rpn2 NLS als auch Rpt2 NLS und GFP assoziiert.

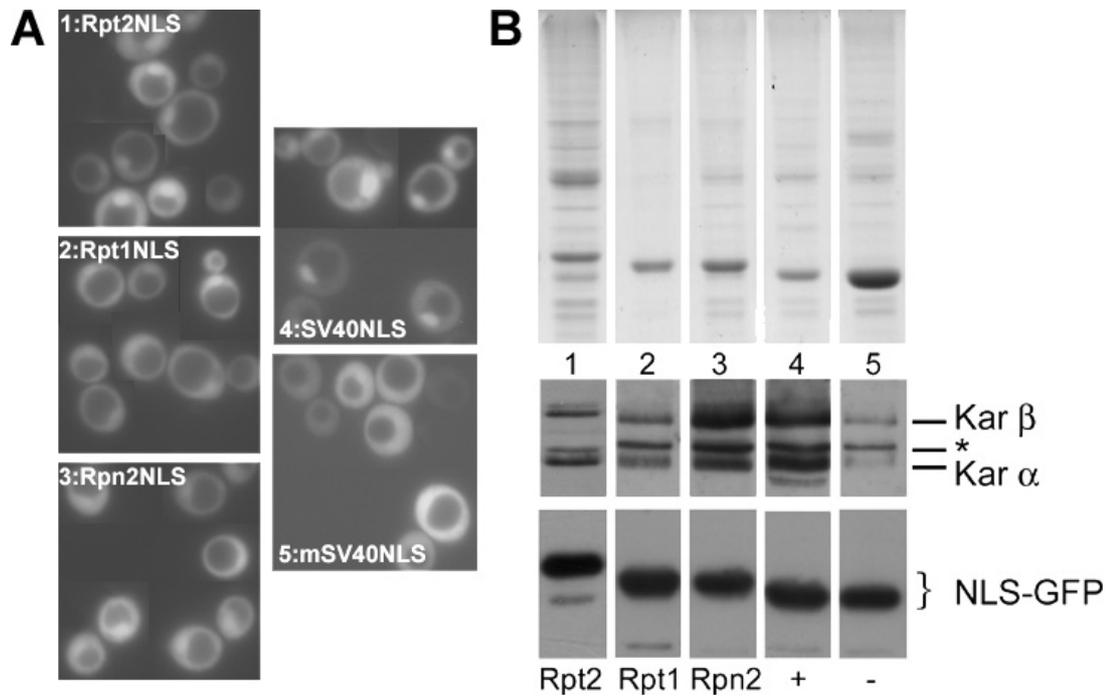


Abb. 16: (A) Die in Abb. 9 dargestellten Fusionsproteine aus potentiellen 19S Kernlokalisationssequenzen bzw. Kontrollsequenzen und GFP werden für 4 Stunden durch Galaktose Induktion der Stämme PWRpt2NLSG (1), PWRpt1NLSG (2), PWRpn2NLSG (3), PWNLSG (4) bzw. PWmNLSG (5) überexprimiert und die *in vivo* Lokalisation der fluoreszierenden Fusionsproteine durch direkte Fluoreszenzmikroskopie mit dem FITC Filterblock sichtbar gemacht. (B) Gleiche Mengen der NLS- GFPs Fusionsproteine, die mit Hilfe der StrepTactin Affinitätschromatographie aus den unter (A) beschriebenen Kultivierungsbedingungen und Stämmen isoliert sind, werden in der SDS PAGE aufgetrennt und einschließlich assoziierter Proteine mit Coomassie Lösung angefärbt (obere Abb.). In der parallel durchgeführten Western Blot Analyse werden Karyopherin α und Karyopherin β sowie die GFP Fusionsproteine mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (untere Abb.). Das mit einem * markierte Signal ist unspezifisch.

Die Bindung zwischen Transporter und NLS ist nur vorübergehend und der Komplex in der Affinitätschromatographie damit sehr instabil. Aus diesem Grund sollen diese Daten in einer Far Western Analyse abgesichert werden, deren Prinzip auf der *in vitro* Bindung des Transporters mit den auf einer Membran renaturierten Substraten beruht. In diesem Fall ist Protein A markiertes Karyopherin α der Bindungspartner der NLS Fusionsproteine und wird über Peroxidase gekoppelten Kaninchen- anti- Maus IgG Antikörper in der ECL Reaktion nachgewiesen. Karyopherin α - ProA wird dafür unter dem endogenen Promoter vom Centromer Plasmid pRS315 in einem Stamm exprimiert, in dem das chromosomale Karyopherin α Gen deletiert wurde (CEY1b, Enekel *et al.*, 1995) . Ca. 5×10^{10} Zellen werden unter Anwesenheit von EDTA freiem Protease Inhibitoren Cocktail (CompleteTM, Roche) in der French Press aufgeschlossen und Zellbruchstücke aus dem Lysat abzentrifugiert. Für die Far Western Analyse werden gleiche Proteinmengen Strep- tag II gereinigter Fusionsproteine in der SDS PAGE aufgetrennt, auf PVDF- Membran transferiert und über Nacht renaturiert. Die Membran wird für vier Stunden in Blockierungslösung mit 20% CEY1b Lysat inkubiert, um Protein A markiertes Karyopherin α aus dem Lysat an die cNLS Fusionsproteine zu binden. Als Kontrolle dafür, dass keine unspezifische Bindung zwischen der Protein A Domäne und den NLS Substraten auftritt, wird eine zweite, gleich behandelte Membran für vier Stunden in Blockierungslösung mit

300mM Protein A (ICN) inkubiert. Abb. 17 zeigt die Amidoblack gefärbten Membranen sowie die Filme des Far Westerns und der Kontrolle. Protein A gekoppeltes Karyopherin α wird in der ECL Reaktion an Rpt2NLS-GFPS, Rpn2NLS-GFPS und SV40NLS-GFPS gebunden nachgewiesen. Die mutierte SV40NLS sowie die Rpt1NLS-GFPS zeigen in dieser Analyse keine Bindung an Karyopherin α und auch Protein A alleine kann keines der Fusionsproteine binden, um damit ein Signal in der ECL Reaktion hervorzurufen. Es ist zu beachten, dass die Proteinmenge von Rpt2NLS-GFPS in Spur 4 geringer ist als die der anderen Fusionsproteine, da sich die Gesamtproteinmenge in dieser Spur auf das vollständig exprimierte Produkt als auch verschiedene Degradationsprodukte aufteilt.

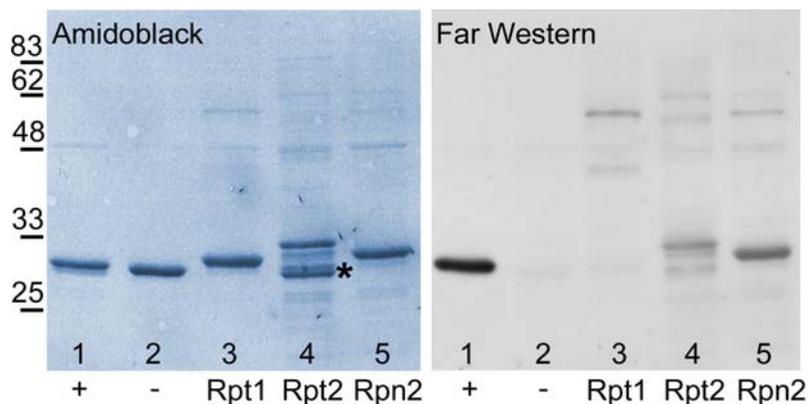


Abb. 17: Gleiche Proteinmengen der NLS- Fusionsproteine werden, wie zu Abb. 14B beschrieben, aufgearbeitet und mittels Far Western Analyse untersucht (+: SV40NLS; -: mutierte SV40NLS). Der Amidoblack gefärbte Blot (links) wird mit Lysaten von Zellen inkubiert, die anstatt des endogenen Karyopherin α Karyopherin α - ProA exprimieren. Die auf dem im Far Western erzeugten Film (rechts) ersichtlichen Signale, stammen von Karyopherin α - ProA, das an Kernlokalisationssequenzen gebunden ist und von anti- IgG Antikörpern erkannt wird. Bei der mit einem * markierten Proteinbande handelt es sich um ein Degradationsprodukt des Rpt2NLS-GFP Fusionsproteins.

3.5 Charakterisierung der Δ NLS Mutation in Rpt2

Ob die *in vitro* gezeigte Bindung der Rpt2 NLS an Karyopherin α *in vivo* bedeutsam ist, lässt sich klären, indem der N- terminale, NLS tragende Bereich von Rpt2/ Yta5 in *S. cerevisiae* deletiert wird. In einem Stamm, dessen chromosomale *RPT2* Kopie deletiert ist, wird mit Hilfe der Plasmid- shuffling (5'FOA) Methode das *RPT2* Gen gegen das Δ 1-43 *rpt2HA* Allel ausgetauscht (vgl. Abb. 6; Materialien und Methoden). Zunächst wird der shuffle Stamm PWt2H16 generiert, indem Dp42 aus DY62 (Rubin et al., 1998) durch mehrfache Selektion auf Minimalmedium, das 60 μ g/ml Leucin und kein Uracil enthält, gegen pRpt2H-16 verdrängt wird. Die Zellen, die nach Selektion auf das *URA3* tragende Plasmid nicht mehr auf Minimalmedium ohne Leucin Zusatz wachsen können, stellen den gewünschten shuffle Stamm dar. Die Verdrängung wird neben dem Einsatz einer Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen humanes Rpt2 (PW8305; Affiniti) sowie den HA tag überprüft, indem die Plasmide aus *S. cerevisiae* isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen werden. Unveröffentlichte Daten von B. Braun zeigen, dass der Antikörper gegen humanes Rpt2 (hRpt2) *S. cerevisiae* Rpt2 erkennt. Da kein Antikörper gegen *S. cerevisiae* Rpt2 verfügbar ist, soll nicht markiertes Rpt2 mit dem anti- hRpt2 Antikörper

nachgewiesen werden. Die aus der Western Blot Analyse resultierenden Filme sind in Abb. 18 dargestellt.

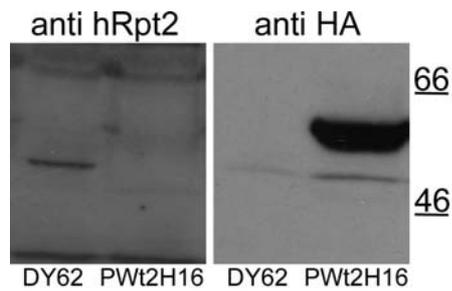


Abb. 18: Zellextrakte von DY62 und Pwt2H16 werden im SDS PAGE aufgetrennt und in der Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen humanes Rpt2 (links) sowie gegen die HA Markierung (rechts) untersucht. Größenmarker in kDa sind angegeben.

Der anti- hRpt2 Antikörper erkennt das nicht markierte *S. cerevisiae* Rpt2 ungefähr in der Größe des erwarteten Molekulargewichts (48,8 kDa) in DY62, nicht aber Rpt2-HA in Pwt2H16. Unmarkiertes Rpt2, wie es im Ausgangsstamm zu detektieren ist, wird in Pwt2H16 durch den humanen Rpt2 Antikörper nicht nachgewiesen. Der Antikörper gegen das HA Epitop erkennt lediglich das im SDS PAGE langsamer migrierende Rpt2-HA Fusionsprotein (erwartetes MW: 51,5 kDa). In der Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide wird pRpt2H-16 aus Pwt2H16 und Dp42 in DY62 nachgewiesen. Pwt2H16 dient nun als Ausgangsstamm für Mutationen und Markierungen des *RPT2* Gens. Dazu werden Plasmide, die das *RPT2* Gen, das $\Delta 1-43$ *rpt2HA* Allel oder deren GFPHA markierte Varianten sowie das *LEU2* Gen tragen, in Pwt2H16 eingeführt (Abb. 6; Materialien und Methoden). Mit Hilfe der 5'FOA- shuffling Methode entstehen die Stämme Pwt2H, Pwt2G, PW Δ Nt2H und PW Δ Nt2G, in denen die chromosomale Rpt2 Deletion allein durch das *LEU2* tragende Plasmid ersetzt ist. *LEU2* tragende Plasmide, von denen die HA bzw. GFP-HA markierte wt oder mutierte Untereinheit exprimiert wird, können nur dann die chromosomale Deletion der Untereinheit komplementieren, wenn die exprimierten Untereinheiten funktionell sind.

Auch hier wird der Austausch des *URA3* tragenden Plasmids gegen das *LEU2* tragende Plasmid mittels Western Blot Analyse der Lysate gegen den HA Antikörper (Abb. 19) sowie Restriktionsanalyse der aus Pwt2H, Pwt2G, PW Δ Nt2H und PW Δ Nt2G isolierten Plasmide bestätigt. Das um 43 Aminosäuren (ca. 5 kDa) verkürzte Rpt2 wird in beiden Deletionsstämmen, soweit die aus der ECL Reaktion hervorgegangenen Filme eine Quantifizierung der detektierten Proteine zulassen, mit dem gleichen Expressionslevel wie die wt Variante gebildet.

Die generierten Stämme werden zunächst näher charakterisiert, indem sie auf Temperatur- und Canavanin- Sensitivität untersucht werden; denn sollte die NLS Deletion in Rpt2 einen Effekt auf die Lokalisation bzw. das Zusammenfinden der 19S Untereinheiten haben, müsste dies Auswirkungen auf die proteasomale Aktivität und damit auf die Überlebensrate der Zellen unter Stressbedingungen haben.

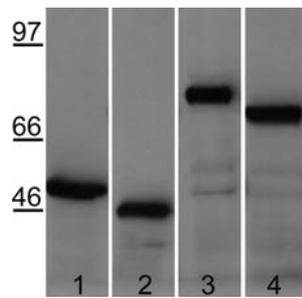


Abb. 19: Identische Proteinmengen der Zellextrakte aus PWt2H (1), PW Δ Nt2H (2), PWt2G (3) und PW Δ Nt2G (4) werden im SDS PAGE aufgetrennt und in der Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen das HA Epitop untersucht. Molekulargewichtsgrößen in kDa sind angegeben.

Der Test auf Canavanin- Sensitivität wird nur mit PWt2H und PW Δ Nt2H durchgeführt, der Test auf Temperatursensitivität auch mit PWt2G und PW Δ Nt2G (Abb. 20). Es zeigt sich, dass die Rpt2 NLS Deletionsstämme gegenüber den entsprechenden wt Stämmen eindeutig temperatursensitiv sind. Das Wachstum von PWt2H bei restriktiver Temperatur (37°C) unterscheidet sich nur geringfügig von dem bei permissiver Temperatur (28°C), während PW Δ Nt2H bei restriktiver Temperatur völlig im Wachstum gestoppt wird. Auch PWt2G Zellen, die wt Rpt2 mit einer C- terminalen GFP-HA Markierung exprimieren, sind temperatursensitiv. Nur eine von tausend Zellen überlebt die Temperaturumstellung von 28°C auf 37°. Ist zusätzlich zur GFP-HA Fusion die NLS von Rpt2 deletiert, sind auch diese Zellen (PW Δ Nt2G) nicht mehr fähig zu wachsen. Eine Sensitivität auf das Arginin Analog Canavanin kann weder bei PWt2H noch bei PW Δ Nt2H festgestellt werden.

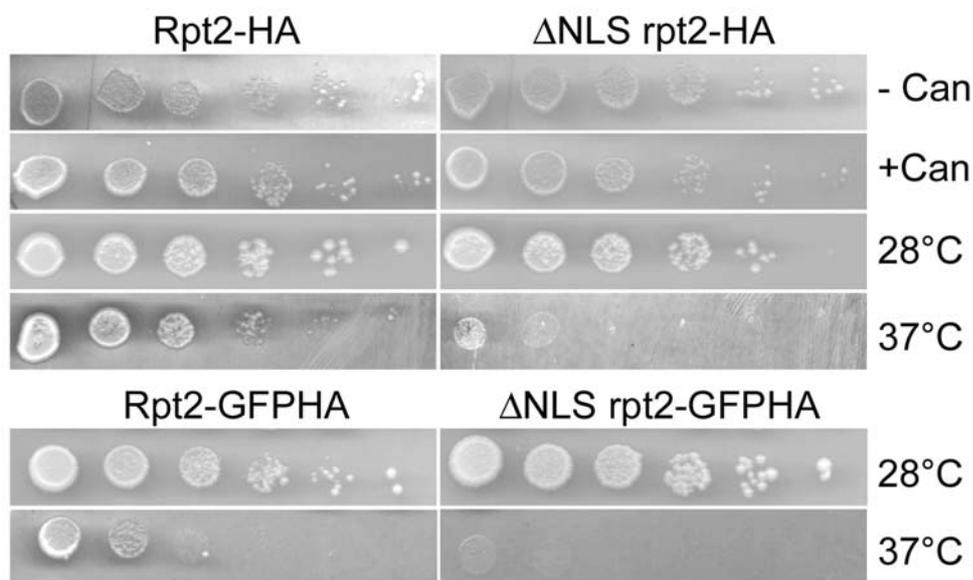


Abb. 20: Stämme, die Rpt2-HA (PWt2H), Δ NLS rpt2-HA (PW Δ Nt2H), Rpt2-GFPHA (PWt2G) oder Δ NLS rpt2-GFPHA (PW Δ Nt2G) anstatt des endogenen Rpt2 exprimieren werden auf Temperatursensitivität und Canavanin Sensitivität (nur PWt2H und PW Δ Nt2H) untersucht. Die für die Canavanin- Sensitivitätsbestimmungen verwendeten CM Agar- Platten ohne Arginin enthalten 0,6 μ l/ml Canavanin, die Referenzplatten ohne Canavanin 20 mg/ml Arginin. Die Platten werden für 3 Tage bei 28°C bzw. bei 37°C inkubiert.

Um den Effekt der NLS Deletion in Rpt2 auf die Verteilung der 19S Untereinheit in der Zelle zu betrachten, werden PWt2G und PW Δ Nt2G aus der logarithmischen Wachstumsphase für drei Stunden bei 37° sowie 28°C angezogen und die Lokalisation

der GFP markierten Untereinheit mit direkter Fluoreszenzmikroskopie betrachtet (Abb. 21A). Alle Zellen zeigen sowohl bei restriktiver als auch permissiver Temperatur eine außerordentlich starke Kernlokalisierung von Rpt2 bzw. Δ NLS rpt2. Ein Anstieg der cytoplasmatischen Färbung in PW Δ Nt2G im Vergleich zu PWt2G lässt sich nicht beobachten. Auffällig ist, dass bei einem Großteil der PW Δ Nt2G Zellen die Tochterzellen nach dem Sprossen mit den Mutterzellen verbunden bleiben und damit Zellzyklusdefekte zeigen (Abb. 21B).

Welchen Effekt die Deletion der Rpt2 NLS auf die Lokalisation anderer 19S Untereinheiten zeigt, wird untersucht, indem die endogenen Kopien von Rpn1 sowie Rpn11 durch GFPS markierten Varianten in PW Δ Nt2H ersetzt werden und die *in vivo* Lokalisation dieser Untereinheiten in den resultierenden Stämmen PW Δ Nt2H11GS und PW Δ Nt2H1GS geprüft wird. Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase werden dazu für 3 Stunden bei 28°C sowie 37°C inkubiert und die GFP Fluoreszenz mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (Abb. 21C). Die Lokalisation der 19S Base Untereinheit Rpn1- GFPS ist sowohl bei 28°C als auch bei 37°C nukleär und unterscheidet sich damit nicht von der der ATPase. Auch die 19S Lid Untereinheit Rpn11- GFPS ist unter den beobachteten Bedingungen nukleär lokalisiert, wird aber im Vergleich zu Rpn1-GFPS in PW Δ Nt2H, als auch im Vergleich zu PWn11GH nur schwach exprimiert.

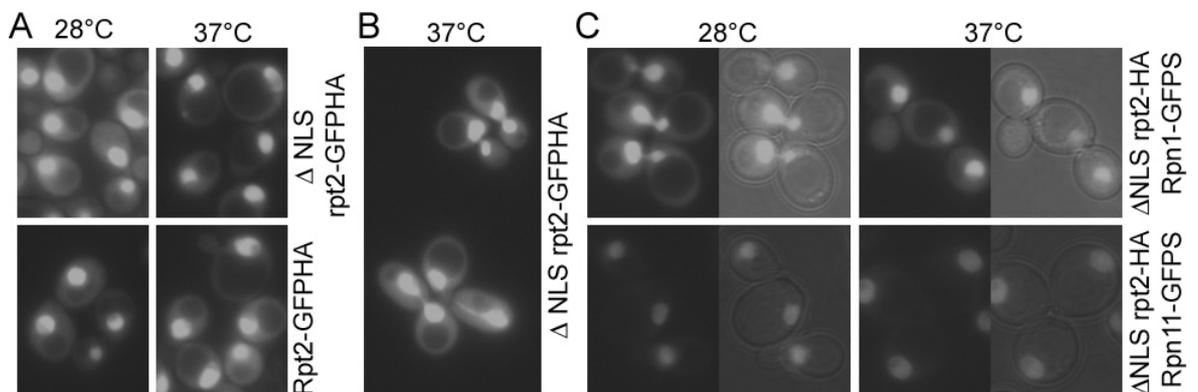


Abb. 21: (A) *In vivo* Lokalisation von Δ NLS rpt2- GFPHA bzw. Rpt2- GFPHA in PW Δ Nt2GH bzw. PWt2GH Zellen nach Inkubation für drei Stunden bei 28°C bzw. 37°C. (B) Zellteilungsdefekt der PW Δ Nt2GH Zellen. Das Fluoreszenzsignal stammt von Δ NLS rpt2- GFPHA nach Inkubation der Zellen für eine Stunde bei 37°C. (C) *In vivo* Lokalisation von Rpn1- GFPS (oben) bzw. Rpn11- GFPS (unten) in PW Δ Nt2H Zellen nach Inkubation für drei Stunden bei 28°C bzw. 37°C. Die Zellen sind jeweils mit dem FITC Filterblock (links) und FITC sowie Normarski Filterblock simultan (rechts) aufgenommen.

Die Deletion der NLS in Rpt2 könnte dazu führen, dass das gebildete Rpt2 nicht vollständig in den 19S regulatorischen Komplex eingebaut wird, oder dass der Komplex an sich bzw. in Verbindung mit dem 20S Proteasom an Stabilität verliert. Der vollständige, funktionelle Einbau der verkürzten Rpt2 Untereinheit in den 19S Komplex wird mit Hilfe des Glycerol- Dichtegradienten gezeigt. PWt2H und PW Δ Nt2H werden in der logarithmischen Wachstumsphase für eine Stunde bei restriktiver Temperatur inkubiert, die Lysate mit Zusatz von ATP sowie MgCl₂ in der 10-40% igen Glycerol-

Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und aus jeder Fraktion eine Bestimmung der prozentualen chymotrypsin ähnlichen Aktivität pro mg Protein durchgeführt. Die Proteine aller Fraktionen werden gefällt und der SDS PAGE mit anschließender Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen das HA Epitop, Rpt6/ Cim3 sowie Pre2/ $\beta 5$ zugeführt (Abb. 22). Proteasomale Aktivität kann in den Fraktionen 11- 18 gemessen werden, wobei die höchste Aktivität bei beiden Stämmen in der Fraktion Nummer 13 erreicht wird und damit 20S Proteasomen zugeordnet werden kann. Entsprechend der Aktivität gegen fluorogenes Substrat kann reifes Pre2/ $\beta 5$ in der Western Blot Analyse in den Fraktionen 11-18 nachgewiesen werden. Unprozessiertes pro-Pre2 lässt sich in diesen Stämmen nicht detektieren. Die 19S Base Untereinheit Rpt6/ Cim3 ist in beiden Stämmen von Fraktion 10- 17 nachweisbar und sowohl Rpt2 als auch Δ NLS rpt2 comigrieren im wesentlichen mit dieser ATPase in Fraktionen 9-18. Freie, nicht in den Komplex eingebaute Δ NLS rpt2 Untereinheiten, die in den langsam migrierenden Fraktionen 1-3 auftreten sollten, sind nicht zu detektieren.

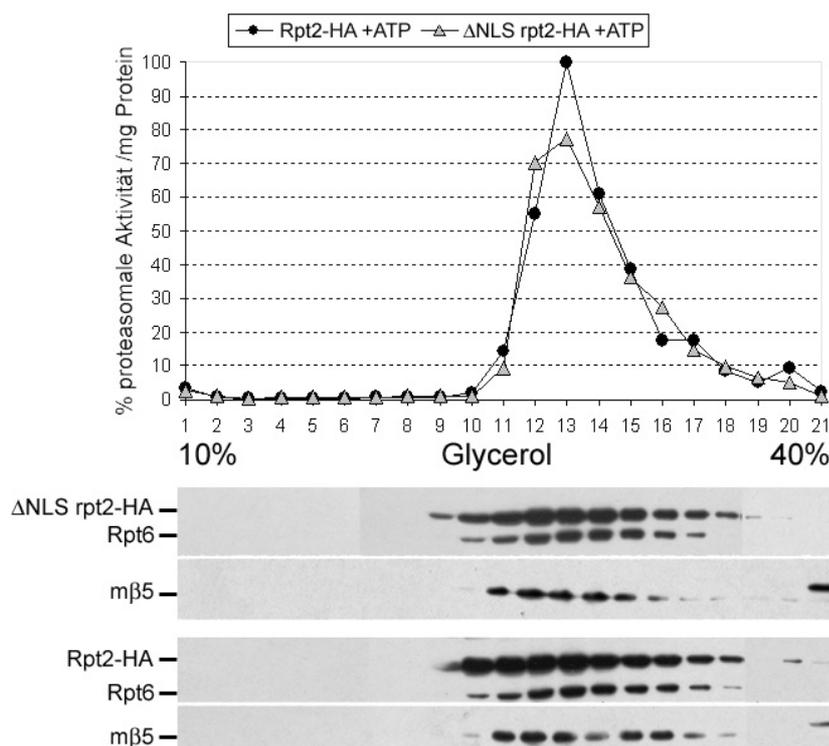


Abb. 22: PWt2H und PW Δ Nt2H Zellen werden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Lysate im Puffersystem mit Zusatz von ATP und MgCl in der 10- 40% igen Glycerolgradientenzentrifugation aufgetrennt. Aus allen Fraktionen wird der Proteingehalt sowie die Protease- Aktivität gegen Suc- Leu- Leu- Val- Tyr- 7- Amino- 4- Methyl- Coumarin bestimmt und die relative proteasomale Aktivität pro mg Protein als prozentualer Wert des Maximalwerts errechnet. In der Western Blot Analyse aller Fraktionen werden die HA markierten Proteine, Rpt6 und $\beta 5$ mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen. Das Signal der prozessierten $\beta 5$ Untereinheiten deckt sich mit der proteasomalen Aktivität und zeigt damit die 20S enthaltenden Fraktionen an.

Die Stabilität des Komplexes wird überprüft, indem wt bzw. mutierte 26S Proteasomen, die über Rpn11ProA an eine IgG Sepharose Matrix gebunden sind, einer 600mM Natrium- Chlorid (NaCl) Lösung ausgesetzt und anschließend im 10-40% igen Glycerol-Dichtegradienten aufgetrennt werden. Die für diesen Versuch benötigten Stämme werden

erzeugt, indem PWt2H und PW Δ Nt2H mit dem *RPN11-HA-TEV-ProA::URA3::HIS3* Konstrukt transformiert werden und nach homologer Rekombination des linearen DNA Fragments in den Genlocus von *RPN11* die Stämme PWt2Hn11HTP sowie PW Δ Nt2Hn11HTP entstehen. Die Protein A Markierung umfasst in diesem Fall zwei IgG bindende Domänen und lässt sich von Rpn11-HA an der TEV Protease Schnittstelle abtrennen (vgl. Abb. 8; Materialien und Methoden).

Mit Hilfe der abspaltbaren Protein A Markierung lassen sich 26S Proteasomen in der sequenziellen IgG Sepharose Affinitätschromatographie in die nativen Subkomplexe 20S, 19S Base und 19S Lid zerlegen (Abb. 23). Das Prinzip dieser sequenziellen Affinitätschromatographie ist, die Bindung der einzelnen Subkomplexe zueinander anhand steigender NaCl Konzentrationen zu lösen und lediglich die an die IgG Sepharose verankerten 19S Lid Komplexe zurückzubehalten, um sie durch eine TEV Protease Spaltung nativ zu eluieren. Die 20S- 19S Base Bindung wird dabei bei 300mM NaCl getrennt und die 19S Base- 19S Lid Bindung bei 600mM NaCl. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration auf 1M NaCl führt zu keiner stärkeren Auftrennung des IgG gebundenen Komplexes.

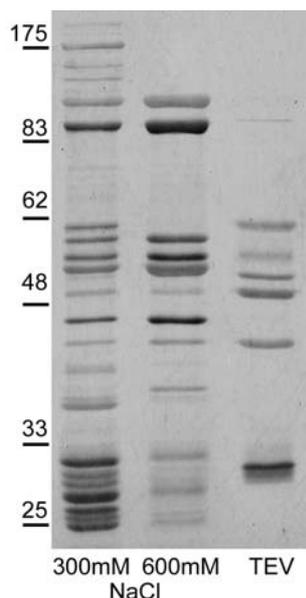


Abb. 23: Elution proteasomaler Subkomplexe aus PWN11HTP Lysaten in der sequenziellen Affinitätschromatographie durch Bindung von Rpn11-HA-TEV-ProA an IgG Sepharose. Die 300mM NaCl Fraktion enthält 20 S Proteasom und geringe Mengen an 19S Base Komplex sowie assoziierten Proteinen. Mit 600mM NaCl werden 19S Base Komplexe eluiert und in der TEV Protease Abspaltung werden die noch an die Matrix gebundenen 19S Lid Komponenten freigesetzt. Der Größenmarker in kDa ist angegeben.

In einer geringfügig abgewandelten Aufarbeitung wird die Stabilität der proteasomalen Komplexe aus PWt2Hn11HTP sowie PW Δ Nt2Hn11HTP überprüft. 26S Proteasomen aus Zellysaten werden über Rpn11-HA-TEV-ProA an IgG Sepharose gebunden, 19S Base sowie 20S Komplex mit 600mM NaCl eluiert und in der 10-40% igen Glycerol-Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Verteilung der Subkomplexe beider Stämme kann bereits anhand der Amidoschwarz gefärbten PVDF Membran verglichen

werden. Die Verteilung von Rpt6/ Cim3, Pre6/ $\alpha 4$ sowie Rpt2-HA bzw. Δ NLS rpt2-HA wird in der Western Blot Analyse mit entsprechenden Antikörpern aufgeklärt (Abb. 24). Freier 19S Base Komplex sedimentiert danach vor allem in Fraktion 9 und 10, ist in Spuren allerdings sogar bis in Fraktion 14 auf der Amidoschwarz gefärbten Membran zu erkennen. Anteile davon könnten noch mit dem 20S Proteasom assoziiert sein, das vor allem in Fraktion 11 bis 13 sedimentiert, aber auch bis in die Fraktion 15 zu erkennen ist. Werden die einzelnen Untereinheiten betrachtet, fällt auf, dass die beiden ATPase Untereinheiten Rpt6/ Cim3 und Rpt2-HA unabhängig von der Deletion der NLS in Rpt2 in den Fraktionen 8- 15 comigrieren, Rpt6/ Cim3 aber zusätzlich in den langsam sedimentierenden Fraktionen 2- 6 nachzuweisen ist. Pre6/ $\alpha 4$ ist in den Fraktionen 11- 17 zu detektieren, wobei das stärkste ECL- Signal in den Fraktionen 11- 13 auftritt.

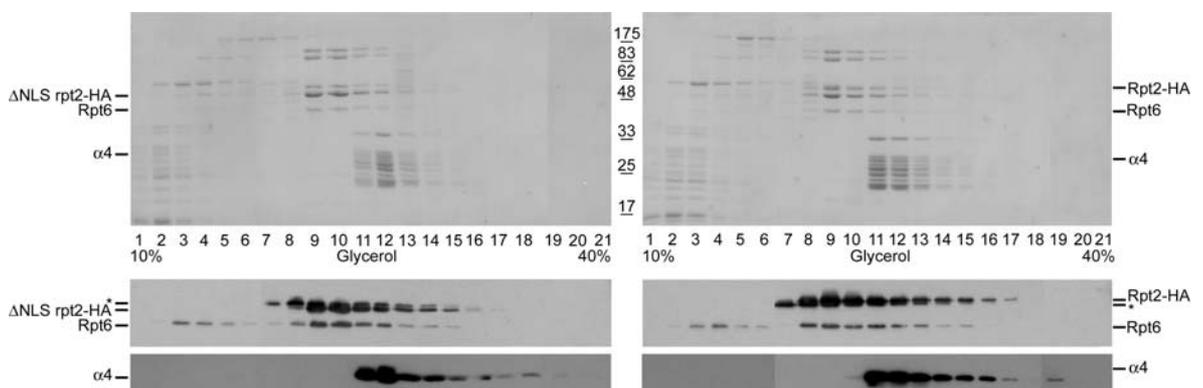


Abb. 24: 600mM NaCl Elution, die 19S Base und 20 S Komplexe aus PWt2Hn11HTP (rechts) sowie PW Δ Nt2Hn11HTP (links) enthalten, werden im 10- 40% igen Glycerolgradienten aufgetrennt, alle Fraktionen gefällt und in der Western Blot Analyse untersucht. Amidoblack gefärbte Membranen (oben) und ECL Signale (unten) aus der Immunreaktion mit Antikörpern gegen das HA Epitop, Rpt6/ Cim3 und $\alpha 4$ sind abgebildet. Die markierten Signale (*) stammen von Rpn11-ProA, das mit den 600mM NaCl Elutionen von der IgG Matrix abgelöst wird und im Glycerolgradienten in den Fraktionen 7-14 sedimentiert.

3.6 Charakterisierung der Δ NLS Mutation in Rpn2

Eine weitere potentielle NLS im 19S Base Komplex ist die *in vitro* mit Karyopherin α interagierende lysinreiche Sequenz im KEKE Motiv von Rpn2. Auch hier wird die *in vivo* Relevanz der *in vitro* erzielten Ergebnisse durch die Deletion der NLS in Rpn2 überprüft. Dazu werden WCGa wt Zellen mit den *Rpn2-HA::URA3::HIS3* bzw. *Rpn2 Δ C-HA::URA3::HIS3* Konstrukten transformiert und mittels homologer Rekombination im Rpn2 Genlocus die Stämme PWn2H und PW Δ Cn2H geschaffen. In PWn2H ist endogenes Rpn2 durch die HA markierte Variante ersetzt, während in PW Δ Cn2H ein C-terminal um 155 Aminosäuren (entspricht 465 Basenpaare bzw. ca. 17 kDa) verkürztes *RPN2* mit HA Markierung abgelesen wird. Der Austausch wird auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen das HA Epitop und auf DNA Ebene mittels PCR sowie Sequenzierung überprüft. Die Western Blot Analyse ergibt für Rpn2-HA sowie für Δ NLS rpn2-HA zwar Signale auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts (106 kDa bzw. 89 kDa), die Intensität bei gleicher Proteinmenge des Gesamtlysats ist jedoch für Rpn2-HA ca. fünfmal so stark wie für Δ NLS rpn2-HA (Abb. 25A). Die PCR Analyse der

aus PWn2H und PW Δ Cn2H isolierten chromosomalen DNA mit Primern, die gegen verschiedene Bereiche des 3'- Endes von *RPN2* gerichtet sind, ergibt, dass *RPN2* in PW Δ Cn2H mit verkürztem C- Terminus exprimiert wird (Abb. 25B).

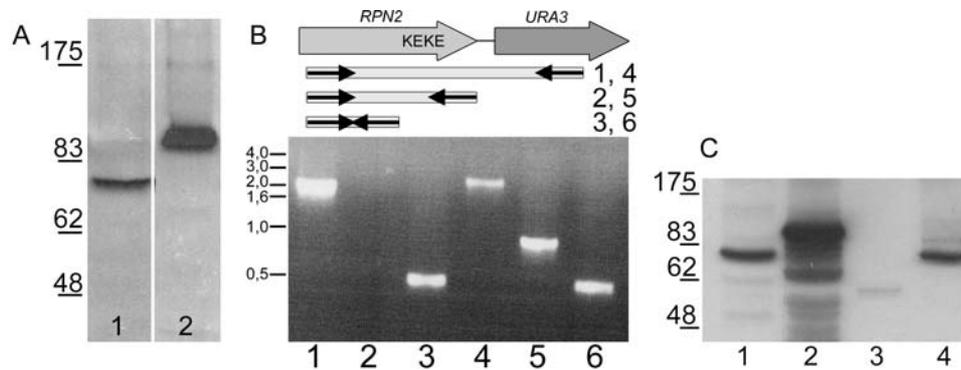


Abb. 25: (A) Zellextrakte aus PW Δ Cn2H (1) und PWn2H (2) werden im SDS PAGE aufgetrennt und in der Western Blot Analyse mit Antikörpern das HA Epitop untersucht. Größenmarker in kDa sind angegeben. (B) Ergebnisse der PCR Analyse aus PW Δ Cn2H (1-3) und PWn2H (4-6). Die für den jeweiligen Ansatz verwendeten Primer sind schematisch dargestellt. DNA Größenmarker in kbp ist angegeben. (C) Zellextrakte aus PW Δ Cn2H (1), PWn2H (2), PW Δ n2 Δ Cn2H (3) und PW Δ n2n2H (4) werden wie unter (A) beschrieben untersucht.

Eine nähere Charakterisierung der Mutanten in Bezug auf Temperatur- und Canavanin-Sensitivität ergibt, dass PW Δ Cn2H Zellen in beiden Tests starke Sensitivität zeigen, während PWn2H keinerlei Wachstumseinschränkungen aufweist (Abb. 26A). Nur eine von tausend PW Δ Cn2H Zellen überlebt Wachstumsbedingungen mit 0,6 μ g/ml Canavanin als Argininersatz, während unter restriktiven Temperaturbedingungen sogar nur eine von zehntausend Zellen zu wachsen vermag. Die Canavanin Sensitivität beruht auf einem Defekt im Abbau fehlgefalteter Proteine durch das Proteasom und deutet auf einen erhöhten Anteil ubiquitinerter Proteine in diesen Zellen hin (Heinemeyer *et al.*, 1991). Um zu belegen, dass die Deletion des C- terminalen Bereichs in Rpn2 tatsächlich zu einem Anstau ubiquitinerter Proteine führt, aber keinen Einfluss auf die Prozessierung der 20S β Untereinheiten β 5 und β 7 hat, werden Stämme auf Grundlage von WCGa, PWn2H und PW Δ Cn2H erzeugt, bei denen jeweils eine der beiden β Untereinheiten HA markiert ist. Dazu werden YIplac128 Pre2HA bzw. YIplac128Pre4HA genomisch in die o.g. Stämme integriert und die Stämme PW β 5H, PWn2H β 5H und PW Δ Cn2H β 5H bzw. PW β 7H, PWn2H β 7H und PW Δ Cn2H β 7H erzeugt. Alle Stämme werden aus der logarithmischen Wachstumsphase für eine Stunde bei 37°C inkubiert und gleiche Proteinmengen der Gesamtlysate in der SDS PAGE aufgetrennt. Im Immunoblot gegen Ubiquitin Antikörper zeigt sich in PW Δ Cn2H Lysaten im Vergleich mit den wt Lysaten eine deutliche Anreicherung des Ubiquitin Signals für Proteinmassen von 48 bis 200 kDa (Abb. 26B). Der Immunoblot gegen das HA Epitop zeigt nahezu äquivalente Mengen der unprozessierten β 5 sowie β 7 Untereinheit in allen Lysaten. Des weitern wird aus den Western Analysen gegen die Untereinheiten Rpt6 und Rpn2-HA bzw. Δ NLS rpn2-HA mit den entsprechenden Antikörpern ersichtlich, dass, trotzdem gleiche Mengen Rpt6 in allen

Stämmen detektiert werden, das Signal für Δ NLS rpn2-HA nach subjektiver Abschätzung ca. fünfmal schwächer ist, als für Rpn2-HA. Die Ergebnisse zur Anreicherung ubiquitiniertes Proteine in PW Δ Cn2H Lysaten werden durch dreimalige Wiederholung mit jeweils drei verschiedenen Proteinmengen in der SDS PAGE reproduziert.

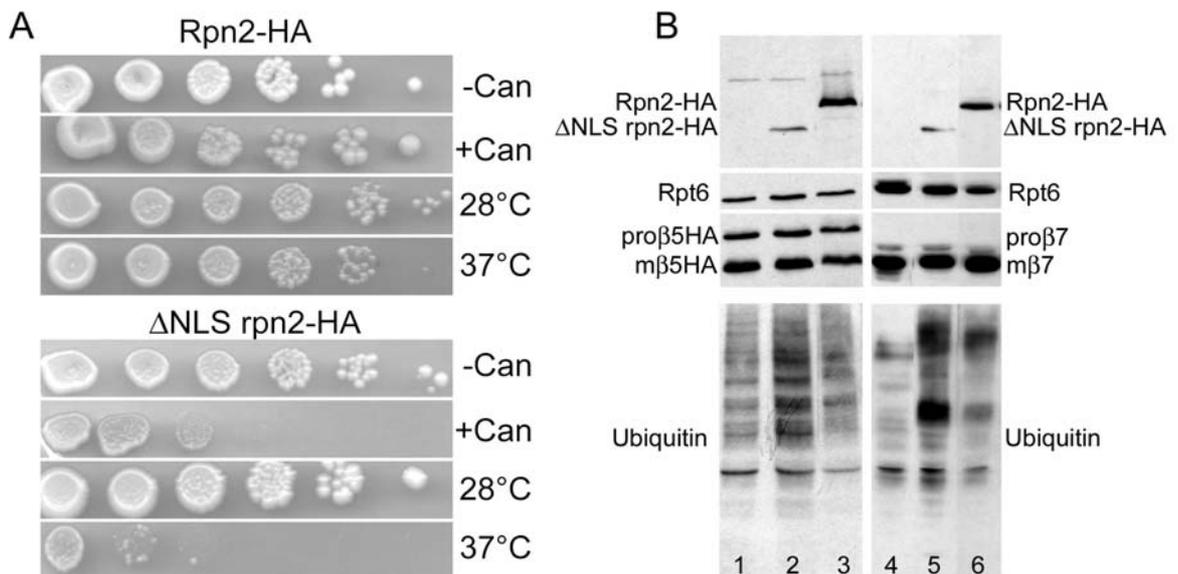


Abb. 26: (A) Stämme, die Rpn2-HA (PWn2H) und Δ NLS rpn2-HA (PW Δ Cn2H) anstatt des endogenen Rpn2 exprimieren, werden auf Temperatursensitivität und Canavanin Sensitivität untersucht. Die für die Canavanin- Sensitivitätsbestimmungen verwendeten CM Agar- Agar Platten ohne Arginin enthalten 0,6 μ l/ml Canavanin, die Referenzplatten ohne Canavanin 20 mg/ml Arginin. (B) PW β 5H (1), PWn2H β 5H (2) und PW Δ Cn2H β 5H (3) bzw. PW β 7H (4), PWn2H β 7H (5) und PW Δ Cn2H β 7H (6) werden aus der logarithmischen Wachstumsphase für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Lysate der Zellen werden in der SDS PAGE aufgetrennt und in der Western Blot Analyse gegen die HA markierten Untereinheiten Rpn2, Δ NLS rpn2, β 5 sowie β 7 und gegen Rpt6 mit den entsprechenden Antikörpern untersucht (oben). Ubiquitinierte Proteine werden parallel in der Western Blot Analyse mit einem gegen Ubiquitin gerichteten Antikörper detektiert (unten).

Da keine Transformanten erzeugt werden konnten, die funktionelles Rpn2-GFPHA oder Δ NLS rpn2-GFPHA exprimieren, wird die Lokalisation von Rpn2-HA und Δ NLS rpn2-HA in der indirekten Immunfluoreszenz betrachtet. PW Δ Cn2H und PWn2H Zellen werden aus der logarithmischen Wachstumsphase für eine Stunde bei restriktiver Temperatur gehalten, fixiert und die Lokalisation der HA markierten Proteine mit Antikörpern gegen das HA- Epitop visualisiert (Abb. 27). Parallel wird die DNA in diesen Zellen mit DAPI angefärbt, um die Lage des Zellkerns anzuzeigen. Die Lokalisation von Rpn2-HA ist sowohl unter permissiven als auch unter restriktiven Temperaturbedingungen nukleär, während Δ NLS rpn2-HA lediglich bei 28°C im Zellkern lokalisiert ist. Wenn die Zellen eine Stunde bei 37°C inkubiert werden, ist das Δ NLS rpn2-HA Signal deutlich verringert und in punktartiger Struktur über die Zelle verteilt. Als Kontrolle dafür, dass die Zellstrukturen unter den Fixierungsbedingungen nicht zerstört wurden, werden Zellen beider Stämme nach der Fixierung mit Antikörpern gegen Kernporenproteine immungefärbt. Die ring- und punktartigen „Nuclear Pore Complex“ (NPC) Signale an der Kernmembran sind in allen Zellen deutlich zu erkennen und weisen auf die intakte Kompartimentierung des Zellkerns

hin.

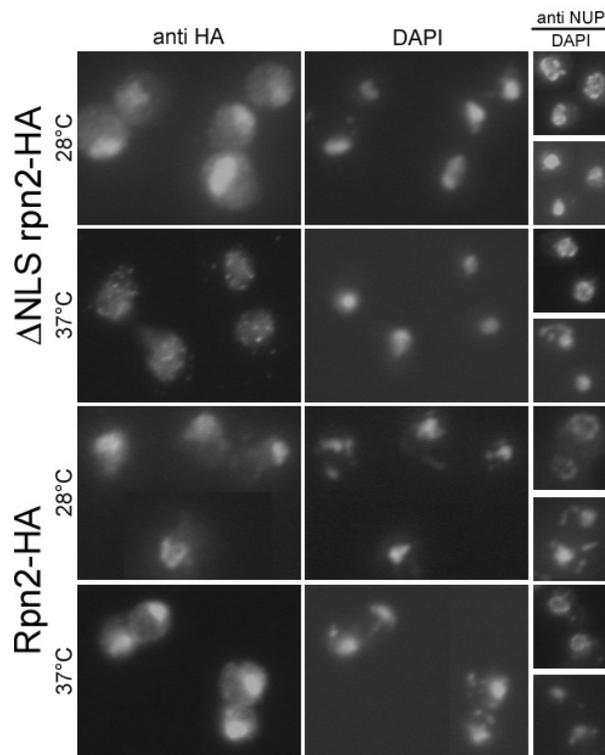


Abb. 27: HA markiertes Rpn2 und Δ NLS rpn2 aus PWn2H bzw. PW Δ Cn2H Stämmen, die bei 28°C oder 37°C für eine Stunde gewachsen sind, werden mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung des mAB12CA5 Antikörpers lokalisiert. Kontrollzellen werden mit dem Antikörper mAb414 gegen Kernporenproteine behandelt. Nukleäre und mitochondriale DNA aller Ansätze wird mit DAPI angefärbt.

Die cytoplasmatische Lokalisation von Δ NLS rpn2-HA in PW Δ Cn2H nach Inkubation des Stamms bei 37°C, könnte darauf hindeuten, dass Rpn2 unter diesen Bedingungen nicht korrekt in den 19S Komplex eingebaut wird. Unter der Annahme, dass Rpn2 kein essentielles Protein in *S. cerevisiae* ist (Yokota *et al.*, 1996), scheint diese Hypothese sehr wahrscheinlich. Da widersprüchliche Veröffentlichungen über die Letalität der Rpn2 Deletion publiziert sind, wird die Disruption des *RPN2* Gens in dem von Yokota und Mitarbeitenden generierten Stamm überprüft, indem dieser Stamm mit dem *Rpn2-HA::URA3::HIS3* bzw. *Rpn2 Δ C-HA::URA3::HIS3* Konstrukt transformiert wird. Es entstehen die Stämme PW Δ n2 Δ Cn2H und PW Δ n2n2H. Lysate dieser Stämme zeigen in der Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen das HA Epitop Signale bei Molekulargewichtsgrößen von 60 kDa bzw. 80 kDa für Δ Rpn2 Δ NLS rpn2-HA bzw. Δ Rpn2 Rpn2-HA (Abb. 25C). Die Disruption von *RPN2*, die durch Integration des *LEU2* Gens in die *HindIII* Schnittstelle von Rpn2 (Bp 437 von 2838) durchgeführt wurde, führt demnach nicht wie von Yokota und Mitarbeitenden (1996) beschrieben zu einem vollständigen Verlust des Rpn2 Proteins. Die funktionelle Markierung des von diesem Gen- Locus entstehenden ca. 80 kDa Proteins, weist darauf hin, dass 4/5 des Rpn2 Gens abgelesen wird (vgl. Abb.25 C). Könnte das auf die *HindIII* Schnittstelle folgende ATG als Startcodon genutzt werden, würde ein 81kDA Protein gebildet werden. Der vollständige Verlust der Rpn2 Untereinheit ist demnach wie publiziert wurde lethal und diese Untereinheit

essentiell (DeMarini *et al.*, 1995).

Der korrekte Einbau der mutierten Rpn2 Untereinheit in 19S Komplexe unter restriktiven Temperaturbedingungen wird untersucht, indem PW Δ Cn2H β 5H und PWn2H β 5H Zellen für eine Stunde bei 37°C inkubiert werden und die Lysate der Stämme mit und ohne ATP Zusatz einer 10-40% igen Glycerol- Dichtegradienten Zentrifugation unterzogen werden. In allen Fraktionen der Gradienten wird der Proteingehalt und die proteasomale PGPH Aktivität gemessen, bevor die Verteilung von Rpn2, Rpt6/ Cim3 und β 5/ Pre2 im Immunoblot mit entsprechenden Antikörpern überprüft wird (Abb. 28).

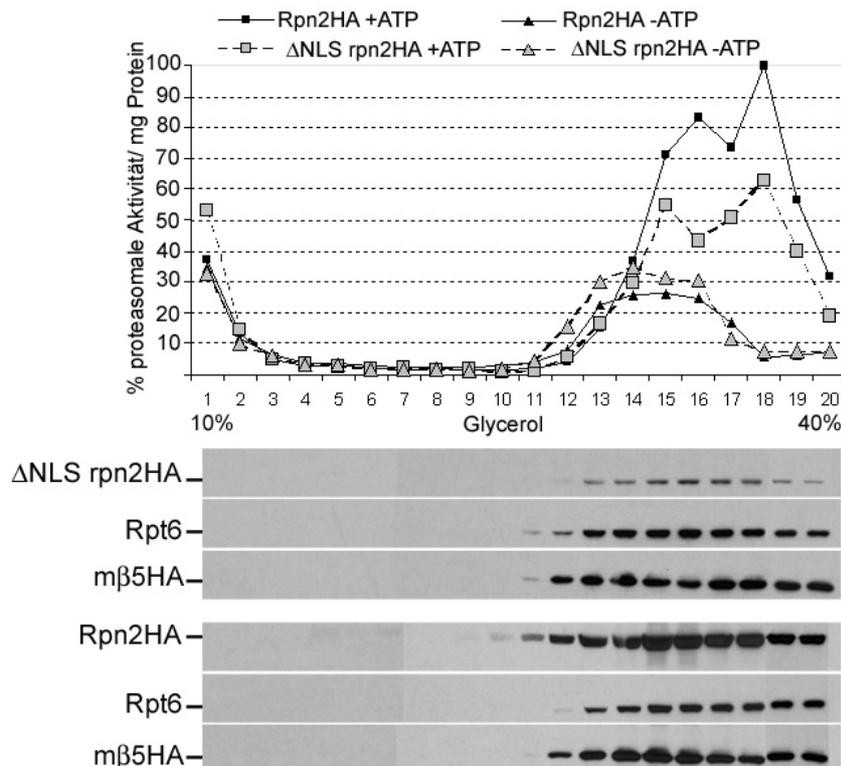


Abb. 28: PWn2H β 5H und PW Δ Cn2H β 5H Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase werden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Lysate mit und ohne ATP Zusatz werden einer 10-40 %igen Glycerolgradientenzentrifugation unterzogen. Alle Fraktionen werden mit dem Substrat Z-leu- leu- glu- β Naphthylamid auf proteasomale PGPH Aktivität untersucht. Die ATP enthaltenden Fraktionen werden gefällt, in der SDS PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit den Antikörpern gegen das HA Epitop und Rpt6 analysiert.

In den ATP enthaltenden Lysaten von PW Δ Cn2H β 5H und PWn2H β 5H sedimentiert reifes β 5/ Pre2 deckungsgleich in den Fraktionen 12 bis 20, in denen auch die Proteaseaktivität gegen fluorogenes Substrat festgestellt wird. In fünf unabhängigen Aufarbeitungen war der Anteil und die Verteilung von nicht prozessiertem Pro- β 5/ Pre2 in den Gradienten nicht reproduzierbar und es konnte kein Einfluss der Mutation in Δ NLS rpn2-HA auf die Prozessierung von β 5/ Pre2 beobachtet werden. Die Signale für Pro- β 5/ Pre2 werden deshalb nicht gezeigt. Rpt6 Signale finden sich in den ATP enthaltenden Lysaten für PWn2H in den Fraktionen 13- 20 während die ATPase in PW Δ Cn2H Lysaten bereits in Fraktion 11 und 12 nachgewiesen wird. Die Migration von Rpn2-HA sowie Δ NLS rpn2-HA im Glycerolgradienten lässt sich aufgrund der stark unterschiedlichen Erkennung der HA markierten Proteine durch den Antikörper nur schwer vergleichen. Rpn2-HA wird

in den Fraktionen 11-20 nachgewiesen und zeigt die intensivste ECL Färbung genau wie Rpt6 in den Fraktionen 15 und 16. Δ NLS rpn2-HA kann mit erheblich schwächerer Färbung von Fraktion 13 bis 20 detektiert werden. Die Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen korreliert dabei mit der von Rpt6 und ist der ECL Färbung nach zu urteilen in Fraktion 16 am höchsten. In beiden Stämmen sedimentiert keines der betrachteten Proteine in Fraktionen geringer Dichte, sondern scheint auch nach einer Stunde Wachstum der Stämme bei 37°C komplexiert vorzuliegen. Die PGPH Aktivität des 26S Proteasoms gegen fluorogenes Substrat teilt sich für die unter Anwesenheit von ATP durchgeführten Gradienten in jeweils zwei Maxima auf, die für PW Δ Cn2H Lysate bei Fraktion Nummer 15 sowie 18 und für PWn2H Lysate bei 16 sowie 18 zu unterscheiden sind. Die in den PW Δ Cn2H Lysaten erreichte Aktivität pro mg Protein beträgt jedoch für beide Maxima nur ca. 60% der im entsprechenden wt Stamm gemessenen Aktivität. Werden die 20S Aktivitäten in den Gradienten ohne ATP Zusatz betrachtet, befindet sich das Maximum für beide Stämme bei Fraktion 14 und beläuft sich auf 35% bzw. 25% der maximalen Aktivität für PW Δ Cn2H bzw. PWn2H Lysate.

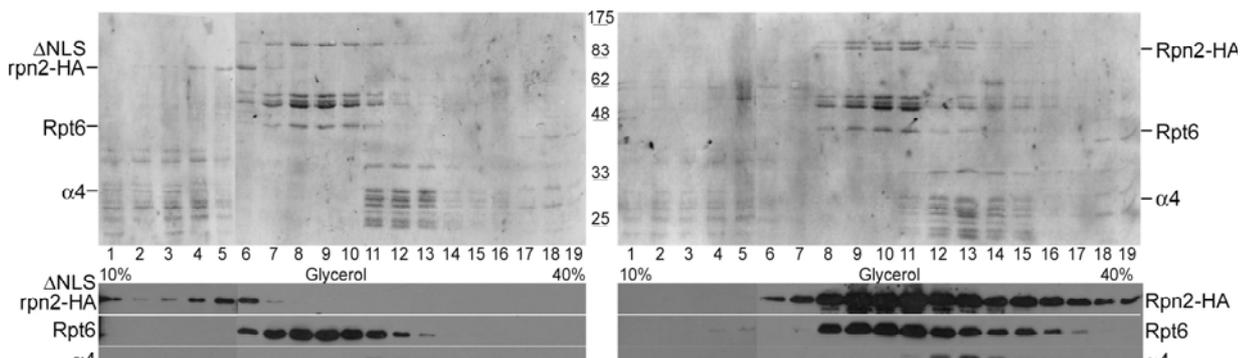


Abb. 29: 600mM NaCl Elution, die 19S Base und 20 S Komplexe aus PWn2Hn11P (rechts) sowie PW Δ Cn2Hn11P (links) enthalten, werden im 10- 40% igen Glycerolgradienten aufgetrennt, alle Fraktionen gefällt und in der Western Blot Analyse untersucht. Amidoblack gefärbte Membranen (oben) und ECL Signale (unten) aus der Immunreaktion mit Antikörpern gegen das HA Epitop, Rpt6/ Cim3 und α 4 sind abgebildet.

Die Stabilität der proteasomalen Komplexe wird auch hier überprüft, indem die 600mM NaCl Elutionen der sequentiellen Affinitätschromatographie aus PWn2Hn11P sowie PW Δ Cn2Hn11P Lysaten im 10- 40% igen Glycerolgradienten aufgetrennt werden. Um zunächst die erforderliche Protein A Markierung an Rpn11 in PWn2H sowie PW Δ Cn2H einzuführen, werden die Stämme mit *Rpn11-ProA::LEU2* Konstrukten transformiert und damit PWn2Hn11P und PW Δ Cn2Hn11P erzeugt. Ein Teil der 600mM NaCl Elution aus beiden Stämmen wird in der SDS PAGE aufgetrennt und das restliche Eluat im Glycerolgradienten analysiert. Die in der SDS PAGE separierten Proteine werden in Coomassie Lösung angefärbt und copräzipitiertes Δ NLS rpn2-HA massenspektrometrisch nachgewiesen. Aus allen Fraktionen des Glycerolgradienten werden die Proteine gefällt und in der Western Blot Analyse untersucht. Anhand der Amidoblack gefärbten Nylonmembran lässt sich bereits erkennen, dass Δ NLS rpn2-HA unter den beschriebenen

Bedingungen aus dem 19S Base Komplex herausgelöst wird und in Fraktionen geringerer Dichte (2-7) sedimentiert (Abb. 29). Die restlichen Untereinheiten des Subkomplexes sedimentieren geschlossen in den Fraktionen 8 bis 13, wobei der größte Proteingehalt in den Fraktionen 9 und 10 nachzuweisen ist. Der größte Anteil des 20S Proteasoms aus PW Δ Cn2Hn11P Lysaten ist in den Fraktionen 12-14 zu detektieren und nur geringe Mengen sedimentieren in den Fraktionen 15-17. Anhand der erkennbaren Proteinverteilung scheinen nur wenige 19S Base Komplexe mit dem 20S Proteasom assoziiert zu sein. Glycerolgradienten von Lysaten des korrespondierenden wt Stamms PWn2Hn11P zeigen keinen Zerfall des 19S Base Komplexes, der als vollständiger Komplex vor allem in den Fraktionen 11 und 12 sedimentiert, aber auch schon in Fraktionen 9 und 10 sowie in Spuren von Fraktion 13 bis 16 zu erkennen ist. Das 20S Proteasom ist in den Fraktionen 13 bis 16 nachzuweisen. Der größte Anteil sedimentiert allerdings in Fraktion 14. Interessanterweise ist auch der Anteil an 19S Base Komplex in dieser Fraktion im Vergleich zu den benachbarten Fraktionen leicht erhöht, was darauf hindeutet, dass hier assoziierte 19S- 20S Komplexe vorliegen. In der Western Blot Analyse werden Rpt6, β 5 sowie die HA Markierung an Rpn2 mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen. Dabei fällt zunächst auf, dass das vom HA Antikörper erkannte Δ NLS rpn2-HA ein höheres Molekulargewicht aufweist, als das auf der Amidoblack gefärbten Membran sichtbare und in der Massenanalytik untersuchte Protein, das vom Antikörper nicht erkannt wird. Im Immunoblot nachweisbares Δ NLS rpn2-HA sedimentiert jedoch in den gleichen Fraktionen geringer Dichte wie Δ NLS rpn2, das offensichtlich keine HA Markierung mehr trägt (Fraktionen 2-7). Das Signal für Rpn2-HA, dessen Molekulargewichtsgröße in ECL Reaktion und Amidoblack gefärbter Membran übereinstimmt, ist in den Fraktionen 7 bis 20 detektierbar. Da die ECL Signale für Rpn2-HA sowie Δ NLS rpn2-HA auf dem gleichen UV- Film festgehalten werden und damit gleichen Expositionszeiten entsprechen, wirken die Signale für Rpn2-HA überexponiert. In ihrer Intensitätsverteilung korrelieren sie aber mit der Rpn2-HA Verteilung auf der Amidoblack gefärbten Membran. Der Nachweis von Rpt6 sowie β 5 in der Western Blot Analyse stimmt überein mit der auf der Amidoblack gefärbten Membran beobachteten Verteilung der 19S Base sowie 20S Subkomplexe im Gradienten.

3.7 Far Western Untersuchungen zur Bindung von 19S proteasomalen Untereinheiten an Kar α/β

Die Funktionalität der lysinreichen Sequenzen aus Rpt2 und Rpn2 als Kernlokalisierungssignal wurde anhand von *in vivo* Lokalisation und Far Western Analyse unter 3.4 gezeigt. Die Sequenzen wurden für diese Untersuchungen aus ihrer Proteinumgebung isoliert. Das heißt sie unterliegen im Fusionskonstrukt mit GFPS keiner festen tertiären Struktur, sondern nehmen neben der räumlichen Struktur von GFP eine ungeordnete Form ein, die für die Transportrezeptoren leicht zugänglich ist. Ob die NLS in den nativ gefalteten Rpt2 und Rpn2 Proteinen ebenfalls für Karyopherin α/β zugänglich sind, und ob die um die NLS verkürzten Proteine noch von Karyopherin α/β erkannt

werden, soll in der Far Western Analyse abgeklärt werden. Dazu werden 19S Base Subkomplexe in der sequentiellen Affinitätschromatographie nativ aus PWn2Hn11P, PW Δ Cn2Hn11P, PWt2Hn11HTP sowie PW Δ Nt2Hn11HTP isoliert und gleiche Mengen dieser Komplexe in der Far Western Analyse mit Karyopherin α - ProA als Bindungspartner untersucht (Abb. 30). Karyopherin α Lysate werden für die Bindungsreaktion unter Anwesenheit von Protease- Inhibitoren unverdünnt für vier Stunden mit den Blotmembranen bei 4°C inkubiert. Als Kontrollen werden die Fusionsproteine von GFPS mit der SV40NLS und der mutierten SV40NLS sowie GFPS alleine auf jeder Blotmembran mitgeführt (Abb. 30D). Die Inkubation eines Kontrollblots in Blockierungslösung mit 300mM Protein A ergibt lediglich Signale für das eluierte Rpn11-ProA Protein, jedoch keine unspezifische Bindung von Protein A an eine der 19S Untereinheiten. Rpn2 zeigt in allen Far Western Analysen mit Karyopherin α - ProA sowohl als HA markierte als auch als endogene Variante ein starkes ECL Signal. Ohne die C-terminale NLS dagegen reagiert Δ NLS rpn2 nicht mehr mit Karyopherin α - ProA. Das gleiche lässt sich für Rpt2 beobachten. Das Protein gibt nur ein Signal in der Far Western Analyse, wenn die N- terminale NLS im Protein vorhanden ist. In diesen Analysen lässt sich mit Rpt6/ Cim3 eine weitere 19S Base Untereinheit ausmachen, die mit Karyopherin α - ProA interagiert und somit vermutlich eine Kernlokalisationssequenz trägt. 19S Lid Komplexe, die in der sequentiellen Affinitätschromatographie aus PWt2Hn11HTP mit TEV Protease von der IgG Sepharose abgespalten werden können, reagieren in der Far Western Analyse nicht mit Karyopherin α - ProA (Abb. 30C). Wie in allen anderen Fraktionen der sequentiellen Affinitätschromatographie eluiert auch hier ein geringer Anteil an Protein A gekoppeltem Rpn11 (54 kDa) von der Säule und ergibt im Kaninchen anti Maus IgG Immunoblot der Far Western Analyse ein starkes Signal.

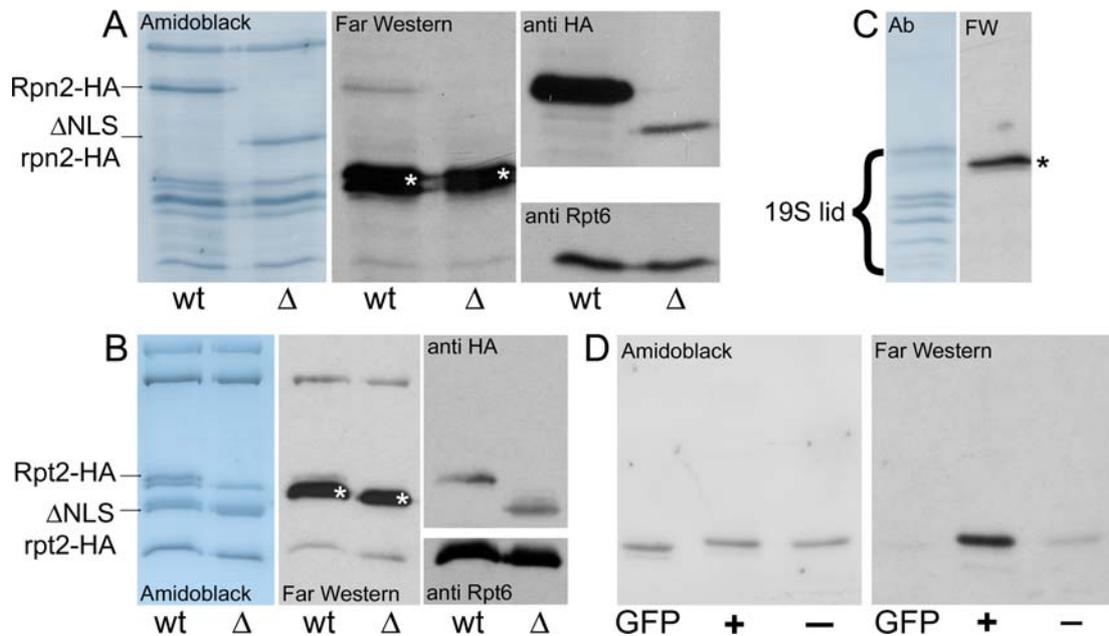


Abb. 30: (A) Nativ eluierte 19S Base Subkomplexe, die Rpn2-HA (wt) oder Δ NLS rpn2-HA (Δ) enthalten, werden in der SDS PAGE aufgetrennt, auf PVDF Membran übertragen und der Far Western Analyse unterzogen. Signale, die im Far Western (FW) zu erkennen sind, stammen aus der Immunreaktion des Protein A markierten Karyopherin α mit NLS tragenden Proteinen. Die * markierten Signale werden von Rpn11ProA Fusionsproteinen hervorgerufen, die in den 600mM NaCl Elutionen von der Matrix abgelöst werden und mit den Peroxidase gekoppelten Kaninchen anti Maus IgG, die in der Far Western Analyse das Karyopherin α - ProA erkennt, interagieren. Nach der Far Western Analyse werden die Membranen mit pH 3,0 gewaschen, in Amidoblack (AB) gefärbt und in der Western Analyse mit Antikörpern gegen das HA Epitop und Rpt6 untersucht. (B) Nativ eluierte 19S Base Subkomplexe aus PWt2H (wt) und PW Δ Nt2H (Δ) werden den unter (A) beschriebenen Analysen unterzogen (C) Der 19S Lid Komplex wird aus PWn11HTP isoliert und wie unter (A) beschrieben untersucht (D) GFP markierte SV40 NLS, mutierte SV40 NLS sowie das GFP Reporterprotein allein werden als Kontrollen bei allen Far Western Analysen auf dem selben Blot mitgeführt.

4 Diskussion

4.1 19S Untereinheiten lokalisieren im Zellkern und präzipitieren 19S Komplexe, Ubp6 und Ecm29

Ziel der Arbeit ist die Aufklärung der Transportmechanismen zur nukleären Lokalisation des 19S regulatorischen Partikels des 26S Proteasoms in *Saccharomyces cerevisiae*. Hinweise darauf, dass 19S Komplexe während der logarithmischen Wachstumsphase in *S. cerevisiae* im/am Zellkern lokalisiert sind, stammen aus der Arbeit von Enekel und Mitarbeitenden (1998) mit der GFP markierten ATPase Cim5/ Rpt1. Die Lokalisation der 19S Lid Untereinheit Rpn11 sowie der 19S Base Untereinheit Rpn1 anhand einer funktionellen, C- terminalen Markierung mit GFP in dieser Arbeit bestätigen die früheren Ergebnisse. Rpn1-GFPHA und Rpn11-GFPHA sind in Zellen der logarithmischen Wachstumsphase hauptsächlich nukleär lokalisiert (vgl. Abb. 10). Es lässt sich durch die parallele Betrachtung der fluoreszenzmarkierten 19S Untereinheiten und den Zellkompartimentmarkern Nup49, Pdr5 und Pdr5* eine präzise Bestimmung der Fluoreszenzmarkierung im Zellkern treffen (vgl. Abb. 11), während eine Lokalisation am cytoplasmatischen ER weitestgehend ausgeschlossen werden kann (vgl. Pdr5*GFP und Rpn1/11-GFPHA Lokalisation). Gestützt werden diese Ergebnisse durch Daten von Wilkinson und Mitarbeitenden (1998), die zeigen, dass Immunogold markiertes Pad1/ Rpn11 in elektronenmikroskopischer Analyse an der inneren Kernmembran lokalisiert ist. Auch eine globale Analyse der Lokalisation von *S. cerevisiae* Proteinen zeigt, dass alle 19S Untereinheiten überwiegend im Zellkern vorliegen (Huh *et al.*, 2003). Zusätzlich lässt die Akkumulation der fluoreszenzmarkierten, proteasomalen Untereinheiten an den Kernporen/ der Kernmembran unter Hungerbedingungen, die einen niedrigen Energiestatus der Zelle zur Folge haben, die Schlussfolgerung zu, dass ein Anteil der Proteasomen ständig energieabhängigen Transportprozessen unterworfen ist (vgl. Abb 11B). Die Co- Sedimentation der GFP markierten 19S Untereinheiten mit der ATPase Rpt6 sowie der 20S Untereinheit $\alpha 1$ in 10- 40% igen Glycerolgradienten als auch die stöchiometrische Copräzipitation aller 19S proteasomalen Untereinheiten mittels der Protein A markierten Untereinheiten Rpn1 und Rpn11 an IgG Sepharose zeigt den vollständigen Einbau der C- terminal veränderten Proteine in 19S Komplexe (Abb. 12 und 13). Da der Austausch von Rpn1 und Rpn11 gegen die GFP-HA und ProA markierten Varianten der Proteine lebensfähige Zellen erbrachte, müssen die veränderten Proteine unter den erfassten Bedingungen funktionell sein. Die Wachstumsraten der Stämme unterscheiden sich bei 28°C und 37°C nicht von denen des entsprechenden Ausgangsstamms, so dass die Markierung der essentiellen Proteine in diesen Zellen auch unter temperaturbedingtem Stress keine phänotypische Ausprägung findet (vgl. Abb. 10). Allerdings ist zu bemerken, dass die Co- Sedimentation der markierten Untereinheiten lediglich zu einer 19S Base sowie zu einer 20S Untereinheit gezeigt wurde. Es ist nicht nachgewiesen, dass alle Untereinheiten des 19S Komplexes mit den markierten Untereinheiten in diesen Stämmen im 10-40% igen Glycerolgradienten cosedimentieren.

Wie in den Copräzipitationen mit den Protein A markierten Untereinheiten zu beobachten ist, destabilisiert die eingeführte, C-terminale Markierung bestimmte Interaktionen zwischen 19S Base und 19S Lid Untereinheiten. Rpn1- ProA präzipitiert kaum Ecm29 und in Präzipitationen mit Rpn11- ProA ist kein Rpn12 zu detektieren, so dass zwischen diesen Proteinen eine direkte Interaktion vermutet werden kann. Die mit 30 kDa relativ große Protein A Markierung könnte notwendige Bindungsstellen zwischen angrenzenden 19S Untereinheiten verdecken oder eine korrekte Assoziation sterisch behindern. Es sollte unterschieden werden, ob die Bindung, der in den Copräzipitationen fehlenden 19S Untereinheiten zum Komplex nur geschwächt ist und sich während der Aufarbeitung löst, oder ob es *in vivo* gar nicht zu einer funktionellen Assoziation der Proteine kommt. Letzteres lässt sich für nicht essentielle Untereinheiten nicht bestimmen. Die Abwesenheit essentieller Untereinheiten wie Rpn12 kann jedoch nur mit der Dissoziation während der Aufarbeitung erklärt werden. Inwieweit Interaktionen mit substöchiometrisch assoziierten Proteinen und Substraten beeinträchtigt werden, lässt sich nicht aussagen. Unter den in dieser Arbeit experimentell erfassten Bedingungen kommt es jedoch durch die verwendeten Markierungen zu keiner erkennbaren funktionellen Beeinträchtigungen der proteasomalen Untereinheiten.

Die nicht essentiellen Proteine Ecm29 und Ubp6 werden nahezu stöchiometrisch in Affinitätschromatografischen Aufarbeitungen des 19S Komplexes sowie des 26S Proteasoms detektiert. Das mit naszierenden 20S Proteasomen assoziierte Blm3 konnte in Aufarbeitungen von 19S Komplexen nicht nachgewiesen werden. Für die Assoziation des nicht essentiellen, deubiquitinierenden Enzyms Ubp6 mit 19S Partikeln gibt es bereits Belege, die eine Bindung des Proteins an den 19S Base zeigen (Leggett *et al.*, 2002; Guterman und Glickman, 2004). Copräzipitationen von Ecm29 mit dem 26S Proteasomen wurden ebenfalls schon beschrieben (Leggett *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002; Gavin *et al.*, 2002). Untersuchungen der Arbeitsgruppe von D. Finley zufolge ist Ecm29 jedoch mit dem 20S Proteasom assoziiert und verbindet dieses mit dem 19S Komplex zum aktiven 26S Proteasom (Leggett *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse lassen sich nur mit der in dieser Arbeit gefundenen Assoziation von Ecm29 mit 19S Komplexen in Einklang bringen, wenn Ecm29 sowohl an den 20S als auch an den 19S Komplex binden kann und die Bindung an den ein oder anderen 26S Subkomplex von den in der Aufarbeitung verwendeten Salz- sowie ATP Konzentrationen abhängig ist.

Eine BLASTP 2.2.8 Proteindatenbank Recherche mit der Aminosäuresequenz von Ecm29 ergibt, dass sequenzhomologe Proteine auch in *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* und *Drosophila melanogaster* existieren. Das *Homo sapiens* Homolog von Ecm29, KIAA0368, besitzt 29% Sequenzidentität zu der Aminosäure Sequenz von Ecm29 und hat mit 1441 Aminosäuren ein Molekulargewicht von ca. 160 kDa. Über die Funktion dieses Proteins ist nichts bekannt. Die Homologie zwischen Ecm29 und Proteinen höherer Species könnte auf eine evolutionär konservierte Funktion des Proteins innerhalb des Ubiquitin-

Proteasomen Systems hindeuten.

4.2 Kernimport von 19S Partikeln ist abhängig von Karyopherin α/β

Nachdem verifiziert wurde, dass 19S regulatorische Untereinheiten vorwiegend im Zellkern lokalisieren, wurde anhand von Mutationsstämmen überprüft, welche Transportfunktionen für den Kernimport von 19S Partikeln verantwortlich sind. Die verwendeten Mutationsstämme tragen einen beschriebenen Defekt in Genen, deren Proteinprodukte essentielle Funktionen im Kernimportweg ausüben und ermöglichen in Kombination mit den GFP markierten 19S Untereinheiten das Auslesen der verantwortlichen Transportfunktionen. Unter Betrachtung der beiden essentiellen Kernimportrezeptoren Pse1/ Kap121 und Kap95 zeigt sich die nukleäre Lokalisation der 19S Partikel lediglich abhängig vom Srp1/ Kap60- Kap95 vermittelten Import. In der von Seedorf und Silver (1997) generierten *pse1-1* Mutante sind Rpn1-GFP und Rpn11-GFP unter restriktiven Bedingungen nicht cytoplasmatisch lokalisiert. Da in dieser Mutante bisher nur für Transkriptionsfaktoren, wie Pdr1 und Spo12, eine cytoplasmatische Delokalisation gefunden wurde und in weiteren Untersuchungen direkte Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren Pho4 bzw. Ste12 und Pse1 gezeigt werden konnten, könnten Transkriptionsfaktoren die bevorzugten Importssubstrate von Pse1/ Kap121 darstellen (Chaves und Blobel, 2001; Delahodde *et al.*, 2001; Kaffman *et al.*, 1998; Leslie *et al.*, 2002). Der nukleäre Import von 20S Proteasomen (Lehmann *et al.*, 2002) sowie 19S regulatorischen Komplexen ist dagegen Karyopherin α/β abhängig. Sowohl die 20S proteasomalen Precursorkomplexen als auch die GFP markierten 19S Untereinheiten Rpn1 und Rpn11 delokalisieren nur in *srp1-49* Zellen unter restriktiven Bedingungen ins Cytoplasma. Die von Loeb und Mitarbeitenden (1995) in der NLS Bindung und im Protein Import in den Zellkern als defekt beschriebene Mutante *srp1-31* zeigt dagegen unter restriktiven Bedingungen keine abweichende Lokalisation der 19S Untereinheiten. Bezüglich der phänotypischen Merkmale dieser beiden Mutanten gibt es in der Literatur widersprüchliche Aussagen (siehe Tab. 8). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm trägt, wie ursprünglich von Yano und Mitarbeitenden (1994) beschrieben, eine Glu145→ Lys Mutation und zeigt nach 8 stündiger Inkubation unter restriktiven Temperaturbedingungen verlangsamtes Wachstum sowie einen Zellteilungsdefekt beim Übergang von G2 zu M Phase während der Mitose. Weiterhin delokalisieren in diesem Stamm SV40NLS-GFP Fusionsproteine und 20S proteasomale Precursor Komplexe *in vivo* unter restriktiven Bedingungen aus dem Zellkern ins Cytoplasma, was auf schwere Defekte im cNLS abhängigen Import von Proteinen in den Zellkern hindeutet (Lehmann *et al.*, 2002). Die gleichen Bedingungen, die zur Anreicherung von proteasomalen Precursor Komplexen im Cytoplasma der *srp1-49* Mutante führen, bewirken im Vergleich zu permissiven Bedingungen eine quantifizierbare Verstärkung der cytoplasmatischen Pixelintensität von Rpn1-GFPHA und Rpn11-GFPHA in dieser Mutante (vgl. Abb. 14), so dass 19S regulatorische Partikel vermutlich vorwiegend über den cNLS und Karyopherin α/β

abhängigen Importweg in den Zellkern gelangen. Es ist nicht auszuschließen, dass Proteasomen in Analogie zum Import von Histonen und ribosomalen Proteinen neben Karyopherin α/β durch mehrere alternative Karyopherine transportiert werden können (Mossammaparast *et al.*, 2001; Rout *et al.*, 1997). 26S Proteasomen Multiproteinkomplexe, die mit der TAP- (*tandem- affinity purification*) Methode in systematischen Analysen des Hefe Proteoms isoliert wurden, enthalten neben Karyopherin α/β auch Pse1, wodurch die oben genannte These unterstützt wird (Gavin *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002). Es sollte erwartet werden, dass die alternative Nutzung von Pse1 als Importrezeptor anhand einer cytoplasmatischen Lokalisation der GFP markierten 19S Untereinheiten in *pse1-1* Stämmen erkennbar ist. Wie die Untersuchungen von Mossammaparast und Mitarbeitenden (2001) zeigen, werden Fusionsproteine aus Histon NLS und GFP in dieser Mutante nicht delokalisiert, sondern lediglich weniger stark im Kern angereichert. Ist ein Protein in der Lage neben Pse1 mehrere Transportrezeptoren für den Kernimport zu nutzen, kommt es demnach in der *pse1-1* Mutante unter restriktiven Bedingungen nicht zur cytoplasmatischen Delokalisation dieses Proteins. Die deutliche cytoplasmatische Lokalisation von Rpn1-GFP und Rpn11-GFP in *srp1-49* Zellen unter restriktiven Bedingungen, lässt den Schluss zu, dass 19S regulatorische Komplexe vorwiegend über den Karyopherin α/β abhängigen Importweg transportiert werden und potentielle, alternative Importrouten nicht in der Lage sind den *srp1-49* Defekt komplett zu kompensieren.

Die Unterbindung des 19S Kerntransports in *srp1-49* Zellen scheint nicht vollständig zu sein. Aus Abb. 14B geht hervor, dass die nukleäre Pixelintensität in *srp1-49* Stämmen nach der Inkubation für 4 Stunden bei 37°C im Mittel nahezu den gleichen Wert erreicht, wie in den bei Raumtemperatur gewachsenen Kontrollzellen. Der selbe Wert nimmt während der Inkubation der wt Stämme bei 37°C in der Tendenz ab. Auch wenn die Fluoreszenzaufnahmen der einzelnen Stämme nicht vollständig miteinander vergleichbar sind, weil der Expressionslevel der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten in den verschiedenen Stämmen bei den untersuchten Temperaturen unterschiedlich sein kann, ist hier eine Tendenz auszumachen: Die Intensität der nukleären Fluoreszenz nimmt unter restriktiven Bedingungen nicht ab. In Anbetracht dessen, dass sich die *S. cerevisiae* Zellen während der Inkubationszeit bei 37°C ein- bis zweimal teilen ohne dass sich die Kernmembran wie bei höheren Eukaryonten auflöst, sollten sich die im Kern vorhandenen, fluoreszierenden Untereinheiten erheblich verdünnen, wenn der Kernimport vollständig blockiert wäre. Da dies nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass die *srp1-49* Mutation lediglich zu einem verschlechterten Kernimport der aktiv transportierten Substrate führt. Entweder können - wie oben erwähnt - andere Karyopherine die *srp1-49* Mutation kompensieren oder die *srp1-49* Mutation bewirkt eine verminderte Karyopherin α Bindungseffizienz. In beiden Fällen wäre der Kernimport in *srp1-49* Zellen ineffizienter als in entsprechenden Zellen mit voll funktionsfähigem

Karyopherin α . Um den Level an nukleären Proteasomen bei verschlechtertem Kernimport aufrecht zu erhalten, sollte deshalb die cytoplasmatische Substratkonzentration ansteigen. Der beobachtete Anstieg der Pixelintensität der fluoreszenzmarkierten Untereinheiten im Cytoplasma und die Steigerung der absoluten Pixelintensität unter restriktiven Temperaturbedingungen in Abb. 14 könnte darauf hinweisen, dass der Level an generierten 19S bzw. 26S Proteasomen im Kern kontrolliert wird und danach die Expression der Untereinheiten gesteuert wird. Diese Konzentrationserhöhung wäre notwendig, um eine ausreichende Translokation der NLS tragenden Substrate in den Zellkern sicherzustellen und spiegelt den Grad der Beeinträchtigung des Importapparats durch die Mutation wieder. Der proteasomale Transkriptionslevel kann durch die Bindung von Rpn4 an die im Promotorbereich der proteasomalen Gene liegenden PACE Motive gesteigert werden. Da Rpn4 eine NLS besitzt und Karyopherin α/β abhängig in den Zellkern transportiert wird (Mannhaupt *et al.*, 1999), sollte diese Möglichkeit der transkriptionellen Regulation der Proteinexpression proteasomaler Untereinheiten in *srp1-49* Zellen ebenfalls beeinträchtigt sein. Die Frage wie es zu der hier beobachteten Fluoreszenzzunahme in *srp1-49* Zellen kommt und ob der Level an nukleären Proteasomen tatsächlich Einfluss auf den Transkriptionslevel proteasomaler Untereinheiten hat, bleibt zu untersuchen.

Werden Lysate der *srp1-49* und *wt* Stämme, deren endogenes Rpn11 gegen das GFPHA markierte Protein ausgetauscht ist, nach Wachstum unter restriktiven Bedingungen im Glycerolgradienten aufgetrennt, sedimentieren Anteile der 19S Untereinheiten Rpt6 und Rpn11 aus *srp1-49* vor allem im Vergleich zum Laufverhalten des 20S Proteasoms in Fraktionen geringerer Dichte (7-9) als im *wt* Stamm (vgl. Abb. 14C). Native 19S Komplexe sedimentieren gewöhnlich in den Fraktionen 10- 12 (vgl. Abb. 14D). Daraus kann geschlossen werden, dass das im Cytoplasma des *srp1-49* Stamms unter restriktiven Bedingungen angereicherte GFP markierte Rpn11 nicht in freier Form vorliegt, sondern in Komplexe eingebaut ist, die geringfügig langsamer in 10- 40 % igen Glycerolgradienten sedimentieren als 19S Komplexe. Das Sedimentationsverhalten dieser Komplexe entspricht in etwa denen der 19S Base und Lid Subkomplexe.

4.3 Kernlokalisationssequenzen in Rpn2 und Rpt2 binden an Karyopherin α

Die von Srp1/ Karyopherin α erkannten Signalsequenzen, sind im Vergleich zu denen anderer Transportrezeptoren relativ gut charakterisiert. Trotzdem ist eine Vorhersage über die Funktionalität NLS ähnlicher Sequenzen in Proteinen schwer, da vornehmlich die Interaktionen zwischen NLS und NLS- Bindungstasche anhand von kurzen ungefalteten Peptiden mit Srp1/ Karyopherin α untersucht sind (Fontes *et al.*, 2000). Die Struktur von Karyopherin α gebunden an ein Cargo Protein ist bisher nicht aufgeklärt und deshalb sind Protein- Protein Interaktionen, die nicht die NLS- Bindungstasche betreffen, unbekannt. Die Sequenzanalyse der 19S Untereinheiten ergibt, dass 8 der 17 Untereinheiten lysin-/ argininreiche Sequenzen tragen, die mit den Konsensussequenzen der klassischen NLS

übereinstimmen. Auffällig ist, dass sich im 19S Base Subkomplex eine höhere Dichte an NLS ähnlichen Sequenzen findet als im 19S Lid Komplex. Daten von Yen und Mitarbeitenden (2003a) zeigen, dass die Lokalisation der 19S Lid Untereinheit Rpn5 in Stämmen, die einen Defekt im 19S Lid tragen, cytoplasmatisch ist, während sie in Stämmen, die einen Defekt im 19S Base tragen, nukleär ist. Die Abhängigkeit der Rpn5 Lokalisation von Mutationen in den 19S Subkomplexen, weist darauf hin, dass 19S Lid und Base unabhängig voneinander in den Zellkern transportiert werden. Ein unabhängiger Transport sollte für beide Subkomplexe mit gleicher Effizienz geschehen, was wiederum eine ähnliche Verteilung der NLS erfordern würde. Potentielle klassische NLS, die den Import über Karyopherin α/β vermitteln, sind jedoch im 19S Lid Komplex deutlich unterrepräsentiert. Möglicherweise assoziieren NLS vermittelnde Proteine für die Dauer des Kernimports mit diesem Subkomplex. Hinweise darauf gibt es in der Arbeit von Yen und Mitarbeitenden (2003b), die zeigt, dass Yin6/Int6 mit Rpn5 interagiert. Int6 wiederum trägt sowohl eine NES als auch eine potentielle bipartite NLS, mit deren Hilfe Rpn5 bzw. der gesamte 19S Lid Komplex in der Kern gelangen könnte (Guo und Sen, 2000). Außerdem konnten Tabb und Mitarbeitende (2000) eine *yeast two hybrid* Interaktion zwischen Rpn11 und Sts1, das wiederum direkt mit Karyopherin α interagiert, belegen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass 19S Lid Komplexe nicht direkt mit Karyopherin α interagieren. Der Fokus dieser Arbeit liegt jedoch auf Proteinen des 19S Komplexes, die direkt mit Karyopherin α interagieren und die Sequenzen tragen, die eine auffällige Übereinstimmung mit den NLS Konsensussequenzen zeigen. Das sind insbesondere die 19S Base Untereinheiten Rpn2, Rpt2 und Rpt4. Die potentielle NLS im N- Terminus von Rpt4 wurde von McDonald und Kollegen (2002) deletiert. Die resultierenden Stämme zeigten auch unter Stressbedingungen wt Wachstum, so dass für diese NLS eine essentielle Funktion auszuschließen ist. Da die C- terminalen Bereiche aller ATPase Untereinheiten reich an basischen Aminosäuren und evolutionär stark konserviert sind, wird der C- terminale Bereich von Rpt1 ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die Untersuchung, der aus dem Proteinzusammenhang isolierten NLS ähnlichen Sequenzen von Rpn2, Rpt2 und Rpt1 zeigt, dass die mit der NLS Konsensussequenz übereinstimmende Rpn2 sowie Rpt2 Sequenz in der Lage ist, das GFP Reporterprotein in den Zellkern zu leiten, während die lysinreiche Region im Rpt1 C- Terminus zu keiner deutlichen Kernfärbung führt. Die Immunpräzipitation der Kernimportrezeptoren Karyopherin α/β und die *in vitro* Bindung der Rezeptoren an die Rpn2 und Rpt2 Sequenz in der Far Western Analyse bestätigt die Funktion dieser Sequenzen als NLS. Die Rpt1 Sequenz zeigt unter diesen Versuchsbedingungen dagegen nur eine sehr schwache (Lokalisation von GFP; Präzipitation von Karyopherin α/β) bzw. keine (Far Western) Qualität als NLS.

4.4 Mehrere NLS im 19S Komplex sind am effizienten Kernimport beteiligt

Um die Relevanz der identifizierten NLS *in vivo* zu untersuchen, werden sie aus den

essentiellen, einmalig im Genom vorkommenden *RPT2* und *RPN2* Genen deletiert. In beiden Fällen führt dies zu lebensfähigen Zellen, in denen sowohl die veränderten Untereinheiten als auch Rpn1 und Rpn11 unter Standardbedingungen korrekt im Zellkern lokalisiert sind. Das heißt, dass diese NLS weder für das Überleben der Hefen noch für die Lokalisation der entsprechenden Untereinheit essentiell sind. Die Auswirkungen dieser Deletion sind in beiden Stämmen erst unter Stressbedingungen zu beobachten und in Δ NLS *rpn2HA* exprimierenden Stämmen deutlich stärker als in Δ NLS *rpt2-HA* exprimierenden. Letztere zeigen eine eindeutige Temperatursensitivität unter Wachstum bei 37°C, die vermutlich auf die mit der Deletion einhergehenden Zellzyklusdefekte zurückzuführen ist. Da gezeigt werden konnte, dass die stark positiv geladenen NLS in DNA bindenden Proteinen mit DNA/ RNA bindenden Domänen überlappen (LaCasse und Lefebvre, 1995) und die Einbindung der ATPasen Rpt4 und Rpt6 in Transkriptionsprozesse bereits gezeigt wurde (Ferdous *et al.*, 2002), überlagern sich in der lysinreichen Sequenz in Rpt2 möglicherweise NLS und DNA/ RNA bindende Strukturen. In der Far Western Analyse der 19S Base Komplexe aus PWt2Hn11HTP sowie PW Δ Nt2Hn11HTP kann gezeigt werden, dass diese Sequenz an die Kerntransportrezeptoren Karyopherin α/β bindet und damit als NLS im Proteinzusammenhang dienen kann (vgl. Abb. 30). Die nukleäre Lokalisation von Δ NLS *rpt2* in PW Δ Nt2GH Zellen auch unter Temperaturstress bedeutet, dass die identifizierte Karyopherin α bindende Sequenz *in vivo* nicht als NLS funktioniert oder die Deletion durch die Anwesenheit multipler NLS im 19S Komplex kompensiert werden kann. Da die Sequenz *in vitro* eine starke Bindung an Karyopherin α zeigt und GFP Reporterproteine effizient in den Zellkern transferiert, scheint es unwahrscheinlich, dass sie *in vivo* nicht funktionell ist. Da zusätzlich mehrere 19S Base Untereinheiten NLS tragen, von denen zumindest die NLS in Rpt4 ebenfalls nicht essentiell ist (McDonald *et al.*, 2002), sind vermutlich mehrere NLS am effizienten Transport des 19S Komplexes in den Zellkern beteiligt. In PW Δ Nt2GH Zellen kann die Deletion der Rpt2 NLS aufgewogen werden, so dass der Stamm betreffs proteasomaler Lokalisation und Funktion nur eine schwache phänotypische Ausprägung zeigt. Die Verwendung mehrerer NLS wurde bereits für den Kernimport des Nucleoplasmin Homoheptamers beschrieben. Erst wenn vier der fünf klassischen Kernlokalisationssequenzen deletiert sind, ist der Kernimport von Nucleoplasmin beeinträchtigt (Dingwall und Laskey, 1991).

Rpt2 ist in der ATP Bindungsdomäne die mutationssensibelste ATPase und der C-terminale Bereich des Proteins wird für die ATP abhängige Öffnung des Translokationskanals im 20S Proteasom verantwortlich gemacht (Rubin *et al.*, 1998; Köhler *et al.*, 2001). Dementsprechend sind die in dieser Arbeit verwendeten C-terminalen HA bzw. GFPHA Markierungen kritisch zu betrachten. Wie in den Untersuchungen zur Temperatursensibilität erkennbar ist, führt schon das Anhängen des zweifachen HA Epitops (22 Aminosäuren) an Rpt2 zu leichter Temperatursensitivität des

wt Stamms. Mit der wesentlich größeren GFPHA Markierung an dieser Stelle sind die Zellen schon stark temperatursensitiv. Interessanterweise zeigt keiner der HA markierten Stämme einen Defekt in der Degradation ubiquitinerter Proteine (Can^S), so dass die Funktion dieser ATPase auch unter Stressbedingungen im Ubiquitin- Proteasom System gegeben scheint. Schon die Markierung der ATPase mit 2x HA scheint vielmehr zu einer Destabilisierung des ATPase Rings zu führen, wie unter Behandlung des 19S Base Komplex aus Pwt2H und PWΔNt2H mit 600mM NaCl im Glycerolgradienten ersichtlich ist. Mindestens die ATPase Rpt6 löst sich hier zu gewissem Anteil aus dem Komplex und sedimentiert in Fraktionen geringerer Dichte. Werden die Komplexe unter schonenderen Bedingungen aufgetrennt (vgl. Abb. 22) oder ist die HA Markierung nicht vorhanden (vgl. Abb. 29) geschieht das nicht. Untersuchungen zur quaternären Struktur des ATPase Komplexes durch chemisches *Cross-linking* ergaben, dass Rpt6 und Rpt2 im ATPase Ring benachbart sind (Hartmann- Petersen et al., 2001). Die Einführung der HA Markierung an Rpt2 beeinträchtigt deshalb möglicherweise nur die Bindung zwischen diesen beiden Untereinheiten. Der Vergleich der proteasomalen Aktivitäten in den 10-40% igen Glycerolgradienten mit Rpt2/ ΔNLS rpt2 (Abb. 22) bzw. Rpn2/ ΔNLS rpn2 (Abb. 28) enthaltenden Lysaten verdeutlicht einen weiteren Effekt der HA Markierung. Trotz mehrfacher Wiederholung der Gradienten gelingt es nicht 26S proteasomale Aktivität zu detektieren, sondern es wird die Aktivität, der in den Fraktionen 10- 16 sedimentierenden, 20S Proteasomen gemessen. Das heißt die HA Markierung destabilisiert die Assoziation des 19S Komplex mit dem 20S Komplex insofern, dass 26S Proteasomen schon während der Aufarbeitung zerfallen können. Diese Daten sind konsistent mit Ergebnissen, die zeigen, dass der C- Terminus von Rpt2 den Kontakt zur α3 Untereinheiten des 20S Proteasoms herstellt und Ergebnissen, wonach die Phosphorylierung der ATPase Rpt6, deren Assoziation mit Rpt2 durch die Markierung beeinträchtigt wird, die Assemblierung von 19S Regulator und 20S Proteasomen reguliert (Köhler et al., 2001; Satoh et al., 2001). Diese Destabilisierung der 26S Proteasomen aufgrund der Rpt2 Markierung könnte die Ursache der beobachteten Temperatursensitivität sein, scheint aber wie oben erwähnt keine Auswirkung auf die proteasomale Proteindegradation unter Stressbedingungen zu besitzen.

Zellen, die eine Deletion der NLS in *RPN2* tragen, sind drastisch temperatur- sowie canavaninsensitiv und reichern im Vergleich zu isogenen wt Stämmen ubiquitinierte Proteine an. Da Mutationen in den Untereinheiten des 19S Komplexes häufig zu Defekten in der proteasomalen Degradation führen (zusammengefasst in Voges *et al.*, 1999; Hilt und Wolf, 2000), lässt sich nicht zwangsläufig schlussfolgern, dass die phänotypischen Merkmale der Mutante auf einen Verlust der NLS Funktion in Rpn2 zurückzuführen sind. Die untersuchte Rpn2 NLS ist in eine KEKE Region (Lysin-/ Glutamat reiche Sequenzen) eingebettet. Realini und Mitarbeitende (1994) postulieren, dass KEKE Motive in verschiedenen Multiproteinkomplexen (Proteasomen, Chaperonen) Protein-Protein

Interaktionsflächen bieten, so dass neben der Funktion als NLS an einer disponierten Position für Proteininteraktionen wie den Untereinheiten des 19S Komplex eine Vielzahl von Interaktionspartnern denkbar sind. Strukturvorhersagen zufolge ist die lysinreiche KEKE Region in Rpn2 nicht in die torroidartige Struktur des Proteins eingebunden, sondern könnte als herausragende Domäne eine Interaktionsfläche für verschiedene Proteine bilden (Kajava, 2002). Die untersuchte Sequenz könnte somit sowohl für die Funktion des 19S Regulators als auch als NLS bedeutsam sein.

Es könnten mehrere, durch die Deletion der Rpn2 NLS hervorgerufene Funktionsverluste zu den beobachteten Merkmalsausprägungen führen. Dass Rpn2 für das Überleben der Zellen essentiell ist und Mutationen in diesem Protein die proteasomale Degradation beeinträchtigen, wurde bereits von DeMarini und Mitarbeitenden (1995) gezeigt. Für den Nachweis der Assoziation von Rpn2 mit dem 26S Proteasom haben DeMarini und Kollegen (1995) eine N- terminale Markierung an Rpn2 verwendet und fanden, dass bei dem Großteil des in den Zellen entstandenen Rpn2 diese HA Markierung proteolytisch abgespalten wurde. Auch die in dieser Arbeit verwendete C- terminale Markierung von Δ NLS rpn2 mit dem HA Epitop lässt sich in Zelllysaten nur in geringem Maß nachweisen (vgl. Abb. 25A und 26B). Vielmehr geht aus der Aufreinigung proteasomaler Komplexe in Coimmunpräzipitationen hervor, dass der größte Anteil des in die Proteasomen eingebauten Δ NLS rpn2-HA die HA Markierung nicht mehr trägt, sondern ein einheitliches Molekulargewicht von ca. 75 kDa besitzt (vgl. Abb. 29). Offenbar wird jedoch nur Δ NLS rpn2-HA partiell degradiert, denn in Stämmen, die Rpn2-HA exprimieren, konnte keine verkürzte Form des Proteins nachgewiesen werden. Die Struktur des Rpn2 Proteins scheint für die reibungslose Funktion des 19S Partikels äußerst wichtig zu sein und die durch die Deletion der KEKE Region bzw. durch eine N- terminale HA Markierung hervorgerufenen strukturellen Veränderungen in dem essentiellen Protein können durch partielle Degradation teilweise kompensiert werden. Die in dieser Arbeit verwendete C-terminale HA Markierung an Rpn2 dagegen ist strukturell und funktionell nicht hinderlich.

Aus Abbildung 28 geht hervor, dass Δ NLS rpn2-HA trotz der Deletion in proteolytisch aktive 26S Proteasomen eingebaut wird. Diese 26S Proteasomen zeigen jedoch im Vergleich zu wt Proteasomen eine um 40% verringerte Aktivität gegenüber fluorogenen Substraten. Da die 20S proteasomale Aktivität in wt Zellen und Δ NLS rpn2-HA exprimierenden Zellen nahezu identisch ist, scheint die 19S Regulator Aktivität in den Δ NLS rpn2-HA exprimierenden Zellen beeinträchtigt zu sein. Genauer gesagt muss die Effizienz der Proteintranslokation (*gating*) in das katalytisch aktive 20S Proteasom gestört sein, da bei einer Hydrolyse von fluorogenen Peptiden keine Ubiquitin abhängige Erkennung, Entfaltung oder Deubiquitinierung des Substrats vonnöten ist. Eine geringere Effizienz der Translokation von Substraten ins 20S Proteasom könnte auf eine strukturelle Destabilisation des 19S Base Komplexes durch die Deletion der KEKE Region in Rpn2 hindeuten. Dies zeigt sich tatsächlich bei Behandlungen des isolierten 26S Proteasoms

mit 600mM NaCl. Unter diesen Bedingungen wird das mutierte Rpn2 aus dem 19S Subkomplex herausgelöst (vgl. Abb. 29). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit der verringerten Aktivität ergibt sich aus der Überlegung, dass in diesen Zellen aufgrund der Deletion der NLS in Rpn2 der Kernimport der 19S Komplexe geschwächt sein könnte. Sollte nämlich in Analogie zu 20S Proteasomen die Biogenese des 19S Regulatorkomplexes an den Kernimport gekoppelt sein, könnte unter den in diesem Versuch geltenden restriktiven Bedingungen ein Mangel an funktionsfähigen 19S Komplexen entstehen und damit der Anteil an aktiven 26S Proteasomen abnehmen. Die in diesem Ansatz bestimmte relative proteolytische Aktivität der 26S Proteasomen lässt keine Aussage darüber zu, ob die generierten 26S Proteasomen aufgrund eines Defekts weniger aktiv sind oder ob der Anteil an aktiven Proteasomen in Bezug auf die Gesamtproteinmenge in den einzelnen Fraktionen der untersuchten Lysate unterschiedlich ist. Die Untersuchung der proteasomalen Untereinheiten in der Western Blot Analyse mit ECL Reagenz lässt sich nur sehr ungenau quantifizieren und eignet sich nicht zur Klärung dieser Fragestellung.

Die leichte Veränderung im Sedimentationsverhalten der ATPase Rpt6 in Glyceroldichtegradienten mit Lysaten von Δ NLS rpn2-HA exprimierenden Zellen im Vergleich zu Lysaten aus Rpn2- HA exprimierenden Zellen (Abb. 28) ist konsistent mit dem in den Glycerolgradienten mit *srp1-49/* Srp1 Lysaten beobachteten Effekt. Offenbar kommt es durch das Fehlen der NLS in Rpn2 unter restriktiven Bedingungen zu einem Anstau von Rpt6 enthaltenden Komplexen, die geringfügig langsamer sedimentieren als Rpt6 enthaltende Komplexe im vergleichbaren Experiment mit wt Lysaten. Unter Berücksichtigung der Lokalisation der Δ NLS rpn2 Untereinheit in der indirekten Immunfluoreszenz im Cytoplasma, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde wie der Glyceroldichtegradient, scheint die Rpn2 NLS zumindest unter restriktiven Bedingungen für die korrekte Lokalisation des 19S Base notwendig zu sein (vgl. Abb. 27). Die Deletion der Rpn2 NLS kann unter diesen Bedingungen nicht mehr durch die Anwesenheit anderer Kernlokalisationssequenzen kompensiert werden. Leider kann aufgrund der Instabilität der HA Markierung an Δ NLS rpn2-HA keine Aussage über ein verändertes Sedimentationsverhalten dieser Untereinheit getroffen werden, da die Signalstärke im Western Blot nicht mit der von Rpn2- HA vergleichbar ist. Die exakte Größe und Zusammensetzung des im Cytoplasma angereicherten Komplex lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht ableiten. Aufgrund der Verteilung der 19S Untereinheiten im Glycerolgradienten lässt sich jedoch aussagen, dass der cytoplasmatische Komplex nicht langsamer sedimentiert als 19S Base und Lid Komplexe.

Die Far Western Analyse der 19S Base Komplexe aus Stämmen deren NLS in Rpn2 oder Rpt2 deletiert sind, zeigt eindeutig, dass wenigstens in diesem Subkomplex mehrere Karyopherin α bindende Domänen vorhanden sind. In den 19S Lid Untereinheiten konnten mit dieser Methode allerdings keine Kernlokalisationssequenzen nachgewiesen

werden. Dies kann auf ungenügende Sensitivität der verwendeten Methode zurückzuführen sein oder aber heißen, dass der 19S Lid Komplex mit Hilfe von NLS vermittelnden Adapterproteinen oder mit Hilfe des 19S Base in den Zellkern gelangt. Ungeklärt ist leider auch, ob die gefundenen NLS in Rpn2, Rpt2 sowie Rpt6 alle *in vivo* funktionell sind. Es ist durchaus denkbar, dass einzelne Kernlokalisationssequenzen im Gesamtkomplex verdeckt sind und damit für Karyopherin α nicht zugänglich sind. Genauso ist vorstellbar, dass auch schwache Kernlokalisierungssignale, die nicht in der Far Western Analyse erfasst werden konnten, *in vivo* an der hohen Effizienz des 19S Imports in den Zellkern beteiligt sind. So präzipitiert auch die Rpt1 NLS Kernimportrezeptoren und vermag GFP zumindest in geringen Anteilen im Zellkern zu lokalisieren (vgl. Abb. 16). Fraglich bleibt welche Domäne in Rpt6 die in der Far Western Analyse detektierte Kernlokalisationssequenz kodiert. Eine Kernlokalisationssequenz in Übereinstimmung mit der NLS Konsensussequenz konnte hier nicht gefunden werden.

4.5 Die Biogenese des 20S Proteasomens ist unabhängig von der 19S Lokalisation

Eine Abhängigkeit der 20S Proteasomen Biogenese vom Kernimport der 19S regulatorischen Partikel konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Wie Abb. 26B zeigt, ist weder die Prozessierung von Pro $\beta 5$ noch von Pro $\beta 7$ unter Bedingungen, bei denen 19S Komplexe im Cytoplasma angereichert werden, beeinträchtigt. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass halbe Kernpartikel im Zellkern mit Blm3 assoziieren und unter Anwesenheit dieses Proteins koordiniert maturieren (Fehlker *et al.*, 2003). Der 19S Regulatorkomplex bindet erst an reifes 20S Proteasom, so dass die Biogenese des 20S Proteasoms aber nicht die Assoziation der im Kern lokalisierten 26S Proteasomen unabhängig von der Lokalisation der 19S Komplexe ist.

4.6 Ausblick

Die mit *srp1-49* durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass 19S Lid und Base unabhängig in den Kern transportiert werden. Im wesentlichen basieren diese Vermutungen jedoch auf dem im Glyceroldichtegradienten gezeigten Sedimentationsverhalten einzelner 19S Untereinheiten. Auch wenn die Abgrenzung zwischen aufgereinigtem 19S Base und 19S Regulatorkomplex im Glycerolgradienten gut ausgemacht werden kann, muss beachtet werden, dass in Glycerolgradienten aus Zellysaten alle in der Zelle vorhandenen, bekannten oder nicht bekannten Subpopulationen des 19S Komplexes aufgetrennt werden und sich auch überlagern können. Eine wirklich befriedigende Antwort auf die Frage der Zusammensetzung des Transportkomplexes kann im Prinzip nur erreicht werden, wenn eine Coimmunpräzipitation dieser 19S Subpopulation mit Karyopherin α/β gezeigt werden kann und dieser Komplex in ausreichenden Mengen vorhanden ist, um alle interagierenden Proteine zu charakterisieren. Da die Verbindung zwischen Kerntransportern und Substrat

nur transient ist, ist dieser Versuchsansatz auch in Hefezellen schwer zu verwirklichen. Ein sicher einfacherer Weg umfasst die Präzipitation der in den *srp1-49* Zellen angestauten, cytoplasmatischen Komplexe mit Hilfe von Rpn1- ProA bzw. Rpn11- ProA. Um hier eine erkennbare Trennung der Transportkomplexe von bereits bestehenden 19S Regulatoren zu erreichen, muss dieser Versuch im Pulse Chase Experiment durchgeführt werden. Wirklich erfolgreich kann dieses Experiment nur dann sein, wenn der *srp1-49* Mutationsstamm tatsächlich keinen Kerntransport der 19S Untereinheiten zulässt und die Zeitspanne in der die Biogenese von 19S regulatorischen Komplexen geschieht, in Pulse Chase Analysen erfassbar ist. Pulse Chase Untersuchungen mit wt Stämmen, aus denen 19S Untereinheiten mit Hilfe von Rpn11- ProA copräzipitiert wurden, ergaben allerdings, dass nahezu der gesamte 19S regulatorische Komplex nach 3 min Pulse copräzipitiert werden kann (nicht gezeigt).

Um zu klären, ob der 19S Regulator als gesamter Komplex oder nur in Subkomplexen an Karyopherin α/β binden kann, müssten *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt werden. Leider konnte während der Dauer dieser Arbeit kein funktionsfähiger Ansatz gefunden werden, der eine vertrauenswürdige Bindung der Transportrezeptoren Karyopherin α/β zum 19S Regulator bzw. zu dessen Subkomplexen *in vitro* rekonstituieren ließe. Alle Kontrollen, die zu den in der Literatur beschriebenen Kernimportuntersuchungen etabliert worden sind, stellten die Aussage der Rekonstitutionsversuche in Frage.

Die sehr interessante Frage, ob nur 19S regulatorische Komplexe in den Zellkern transportiert werden, die neu entstehen, oder ob 19S Komplexe generell zwischen Cytoplasma und Zellkern hin und her transportiert werden können, konnte bisher nicht geklärt werden. In Analogie zur Kernimport verknüpften Biogenese von 20S Proteasomen, scheint es naheliegend, dass lediglich neu entstehende 19S Komplexe in den Zellkern transportiert werden müssen. Ein Nachweis für diese These ist jedoch schwierig, da im 19S Komplex keine zu prozessierenden Untereinheiten existieren, die verschiedene Biogenesestadien kennzeichnen würden und da somit eine Trennung der neu synthetisierten Komplexe von bestehenden 19S Komplexen nahezu unmöglich ist. Insbesondere die Kopplung der Biogenese mit dem Kerntransport ist schwer nachweisbar, da möglicherweise nur strukturelle Umlagerungen im 19S Komplex zu einer Unterscheidung zwischen reifen und maturierenden 19S Regulatoren führen und zur Erkennung oder Maskierung der NLS beitragen. Für zukünftige Arbeiten wäre es deshalb sehr hilfreich eine verbesserte biochemische Trennung der einzelnen 19S Subkomplexe innerhalb der Gesamtpopulation zu erreichen sowie exakte strukturelle Daten über diesen Komplex zu erhalten. Die bei 20S Proteasomen und deren Vorläuferkomplexen erfolgreich angewendete Methode der nativen Elution der Komplexe mit Hilfe einer Strep-Tag II Markierung und deren Auftrennung in der Nativ- Gelelektrophorese ließ sich bei 19S Regulatoren nicht anwenden, da weder Rpn1-GFP-S noch Rpn11-GFP-S Untereinheiten des 19S Komplexes copräzipitieren (nicht gezeigt). Diese Markierung

konnte sowohl in der 19S Base als auch 19S Lid Untereinheit unter verschiedenen Pufferbedingungen keine Bindung der fluoreszierenden Untereinheit an die Streptactin Matrix herstellen, obwohl keine Probleme in Coimmunpräzipitationen mit HA oder ProA Markierungen in diesen Untereinheiten aufgetreten waren. Eine weitere Möglichkeit, die gesamte Population nativer 19S Komplexe aus *S. cerevisiae* zu isolieren, besteht, indem 19S Komplexe oder auch 26S Proteasomen aus Rpn11-HA-TEV-ProA exprimierenden Zellen an IgG Sepharose gebunden werden und nachfolgend mit Hilfe der TEV Protease nativ eluiert werden. Die Effizienz dieser Spaltung ist vermutlich aufgrund schlechter Zugänglichkeit der TEV- Protease Schnittstelle nur sehr gering. Lediglich die Abspaltung des 19S Lid Subkomplexes in der sequentiellen IgG Sepharose Affinitätschromatographie ergibt eine befriedigende Ausbeute.

4.7 Spekulationen über den biologischen Sinn der nukleären 19S Lokalisation

Über den biologischen Sinn der nukleären Lokalisation von 19S Komplexen sowie 20S Proteasomen kann nur spekuliert werden. Die naheliegenste Erklärung ist, dass im Zellkern funktionelle 26S Proteasomen benötigt werden, um die Vielzahl der dort vorhandenen proteasomalen Substrate, wie Transkriptionsfaktoren, Tumor Suppressor Proteine oder Cycline, abzubauen. Insbesondere Prozesse, die die Chromosomen Erhaltung (*chromosome maintenance*), die DNA Reparatur (*DNA repair*), die Transkriptionsaktivierung und den Zellzyklus steuern, werden vom Ubiquitin-Proteasomen System reguliert (zusammengefasst in McBride *et al.*, 2003). Da bereits mehrfach eine Assoziation von ribosomalen Protein und Ribosomen interagierenden Proteinen mit Proteasomen beschrieben wurde (Verma *et al.*, 2000; Nop1: Tone und Tohe (2002); Sum1: Dunand- Sauthier *et al.*, 2002) und durch Studien mit Mutationsstämmen eine genetische Verbindung zwischen Ribosomen und Proteasomen postuliert wurde (Gerlinger *et al.*, 1997), sind 26S Proteasomen im Zellkern möglicherweise für den Abbau einiger der ca. 60 *trans* aktiven Proteine in der Ribosomenbiogenese verantwortlich. Vornehmlich im Zellkern bietet sich ein breites Spektrum an kurzlebigen Proteinen, die sehr effizient vom Ubiquitin- Proteasomen System vernichtet werden müssen, um das Überleben der Zelle zu garantieren. Einige Komponenten des für die Markierung der Substrate benötigten Ubiquitin Systems, wie zum Beispiel das Ubiquitin aktivierende Enzym UBA1 oder das F-box Protein Cdc4, sind ähnlich in der Zelle verteilt wie 26S proteasomale Untereinheiten und damit auch im Zellkern lokalisiert (Huh *et al.*, 2003). Für das *S. cerevisiae* Zellzyklusprotein Far1 sowie die *Xenopus* Proteine p27 und MyoD konnte tatsächlich die Degradation im Zellkern bewiesen werden. Die Untersuchung des proteasomalen Abbaus von p53, β - Catenin und p27^{Kip1} in Mammalia Zellen hat allerdings erbracht, dass diese Proteine abhängig vom nukleären Export degradiert werden und demnach nicht im Zellkern abgebaut werden (zusammengefasst in Glickman und Ciechanover, 2002). Sowohl die Kernexport abhängige als auch die nukleäre Degradation von Proteinen scheint damit die Stabilität von proteasomalen Substraten zu regulieren.

Würden 26S Proteasomen mit ihrer interzellulären Lokalisation ihren Substraten folgen, müsste geschlussfolgert werden, dass die höchste proteolytische Aktivität in der Zelle im Zellkern zu messen wäre. Bisher gibt es für diese Annahme keinen Beleg in der Literatur, so dass die 26S Subkomplexe im Zellkern auch nicht proteolytische Aufgaben haben könnten oder inaktiv sein könnten. Für 19S regulatorische Base Partikel konnte gezeigt werden, dass sie neben der proteasomalen Aktivität eine Funktion in der effizienten Transkriptionselongation durch die RNA Polymerase II besitzen (Ferdous *et al.*, 2001). Wie hoch der Anteil des in Transkriptionsprozesse involvierten 19S Komplexes am gesamten 19S Pool in der Zelle ist, ist unklar, so dass unsicher ist, welchen Anteil diese Komplexe an der nukleären Lokalisation der 19S Partikel tragen. In logarithmisch wachsenden *S. cerevisiae* Zellen ist ein großer Anteil der nukleären 20S proteasomalen Untereinheiten in inaktive Vorläuferkomplexe eingebaut (Lehmann *et al.*, 2002; Fehlker *et al.*, 2003). In Anbetracht dessen, dass für die Assemblierung von 19S Komplexen 17 neu synthetisierte Proteine koordiniert zusammenfinden müssen, könnte die Translokation dieser Untereinheiten in den Zellkern garantieren, dass die Proteine durch die Assoziation der lysinreichen Proteininteraktionsdomänen mit Karyopherin α vor unerwünschten Interaktionen bewahrt werden und dass die lokale Konzentration der Proteine mit Erreichen des Zellkerns ihr Maximum erlangt und das Zusammenfinden der Untereinheiten erleichtert wird. Demnach könnten auch 19S regulatorische Partikel aus inaktiven Vorläuferkomplexen entstehen, die vorwiegend im Zellkern lokalisiert sind.

Eine vom 20S Proteasomen unabhängige Funktion des 19S Partikels im Zellkern kann nicht ausgeschlossen werden. Auch wenn die meisten biochemischen Nachweise auf eine weitgehende Assoziation von 19S und 20S Komplex schließen lassen, existiert bisher kein einfach handhabbarer Nachweis für die 19S Aktivität. Vom 20S Proteasomen unabhängige 19S Aktivität kann *in vivo* nicht gemessen werden. So ist denkbar, dass 19S Regulatoren *in vivo* Chaperon ähnliche Aktivität zeigen und - wie *in vitro* Daten belegen - denaturierte Proteine reaktivieren können (Braun *et al.*, 1999). Auch eine Kontrollfunktion für die Ubiquitinierung von Proteinen könnte insbesondere den bisher funktionell kaum charakterisierten 19S Lid Untereinheiten beigemessen werden. Die frappierende strukturelle Homologie dieses Subkomplexes zu COP9 Signalosomen könnte auf eine Ähnlichkeit in den regulatorischen Funktionen der Komplexe hindeuten (Kapelari *et al.*, 2000).

4.8 Importmodell für 19S regulatorische Partikel

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass 19S regulatorische Komplexe des 26S Proteasoms in *S. cerevisiae* durch Karyopherin α/β abhängigen Import in den Zellkern gelangen. Es sind drei 19S Base Untereinheiten identifiziert worden, die Karyopherin α bindende Kernlokalisationssequenzen tragen (Rpn2, Rpt2, Rpt6). Unterschiede in der Relevanz der einzelnen Kernlokalisationssequenzen für den Import von 19S Komplexen in den Zellkern konnten

ebenfalls gezeigt werden. So ist die Rpn2 NLS zumindest für die Lokalisation des 19S Base Komplex unter restriktiven Temperaturbedingungen entscheidend. Aufgrund des Sedimentationsverhaltens von 19S Lid sowie Base Untereinheiten in Glyceroldichtegradienten, die mit *srp1-49* oder *PW Δ Cn2H* Lysaten durchgeführt worden sind, kann vermutet werden, dass 19S Lid und Base Subkomplexe unabhängig in den Zellkern transportiert werden. In dem aus dieser Arbeit resultierenden Modell des 19S Importmechanismus in den Zellkern von *S. cerevisiae* werden demnach multiple Kernlokalisationssequenzen in 19S Base sowie Lid Komplexen von den Kerntransportrezeptoren Karyopherin α/β gebunden und die Subkomplexe aktiv durch die Kernporen geleitet (vgl. Abb. 31).

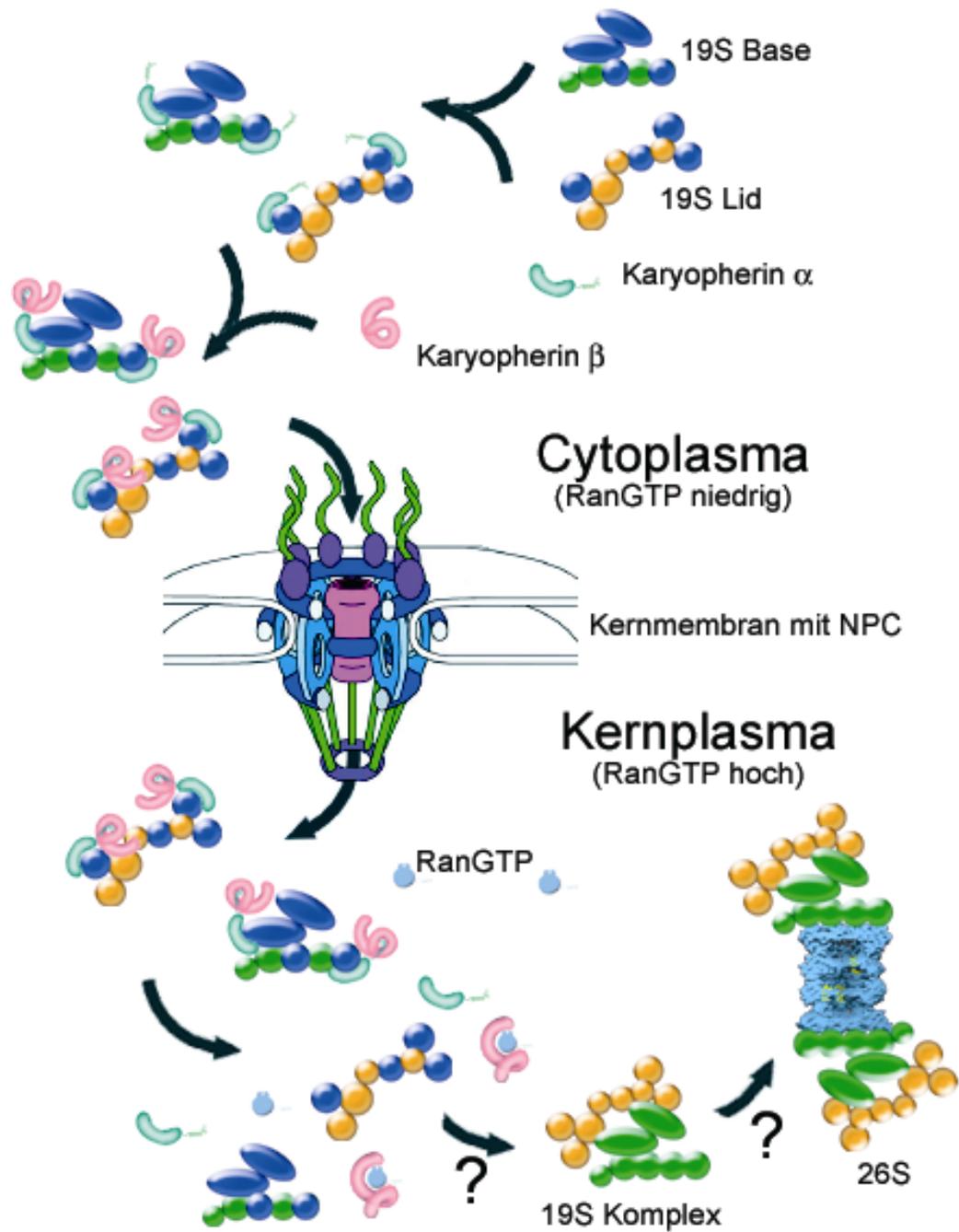


Abb. 31: Modell für den Karyopherin α/β abhängigen Import von 19S Komplexen. 19S Base Untereinheiten sind grün, 19S Lid Untereinheiten sind orange angefärbt. Die NLS tragenden Untereinheiten in 19S Base und Lid Komplex sind blau hervorgehoben. Das Größenverhältnis von proteasomalen Subkomplexen zum Kernporenenkomplex ist für eine bessere Übersichtlichkeit verzerrt dargestellt.

Literaturverzeichnis

- Adams, G.M., Falke, S., Goldberg, A.L., Slaughter, C.A., DeMartino, G.N. und Gogol, E.P.** (1997) Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes. *J Mol Biol*, **273**, 646-657.
- Bachmair, A. und Varshavsky, A.** (1989) The degradation signal in a short-lived protein. *Cell*, **56**, 1019-1032.
- Belgareh, N. und Doye, V.** (1997) Dynamics of nuclear pore distribution in nucleoporin mutant yeast cells. *J Cell Biol*, **136**, 747- 759
- Boeke, J.D., Trueheart, J., Natsoulis, G. und Fink, G.R.** (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol*, **154**, 164-175.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D. und Schmidt, M.** (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*, **1**, 221-226.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A. und Ciechanover, A.** (1998) A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *Embo J*, **17**, 5964-5973.
- Bucci, M. und Wenthe, S.R.** (1998) A novel fluorescence-based genetic strategy identifies mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear pore complex assembly. *Mol Biol Cell*, **9**, 2439-2461.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K. und Varshavsky, A.** (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, **243**, 1576-1583.
- Chaves, S.R. und Blobel, G.** (2001) Nuclear import of Spo12p, a protein essential for meiosis. *J Biol Chem*, **276**, 17712-17717.
- Chelsky, D., Ralph, R. und Jonak, G.** (1989) Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol*, **9**, 2487-2492.
- Chen, P. und Hochstrasser, M.** (1996) Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell*, **86**, 961-972.
- Chook, Y.M. und Blobel, G.** (1999) Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature*, **399**, 230-237.
- Ciechanover, A.** (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J*, **17**, 7151-7160.
- Ciechanover, A. und Brundin, P.** (2003) The Ubiquitin Proteasome System in Neurodegenerative Diseases: Sometimes the Chicken, Sometimes the Egg. *Neuron*, **40**, 427- 446
- Ciechanover, A., Orian, A. und Schwartz, A.L.** (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, **22**, 442-451.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. und Muller, C.W.** (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, **399**, 221-229.
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. und Kuriyan, J.** (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, **94**, 193-204.
- Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V. und Deshaies, R.J.** (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, **298**, 608-611.
- Delahodde, A., Pandjaitan, R., Corral-Debrinski, M. und Jacq, C.** (2001) Pse1/Kap121-dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1. *Mol Microbiol*, **39**, 304-312.

- DeMarini, D.J., Papa, F.R., Swaminathan, S., Ursic, D., Rasmussen, T.P., Culbertson, M.R. und Hochstrasser, M.** (1995) The yeast SEN3 gene encodes a regulatory subunit of the 26S proteasome complex required for ubiquitin-dependent protein degradation in vivo. *Mol Cell Biol*, **15**, 6311-6321.
- DeMartino, G.N., Proske, R.J., Moomaw, C.R., Strong, A.A., Song, X., Hisamatsu, H., Tanaka, K. und Slaughter, C.A.** (1996) Identification, purification, and characterization of a PA700-dependent activator of the proteasome. *J Biol Chem*, **271**, 3112-3118.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M.** (1994) A 26S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*, **269**, 7059-7061
- Dingwall, C. und Laskey, R.A.** (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, **16**, 478-481.
- Dubiel, W., Ferrell, K., Dumdey, R., Standera, S., Prehn, S. und Rechsteiner, M.** (1995) Molecular cloning and expression of subunit 12: a non-MCP and non-ATPase subunit of the 26S protease. *FEBS Lett*, **363**, 97-100
- Dunand-Sauthier, I., Walker, C., Wilkinson, C., Gordon, C., Crane, R., Norbury, C. und Humphrey, T.** (2002) Sum1, a Component of the Fission Yeast eIF3 Translation Initiation Complex, Is Rapidly Relocalized During Environmental Stress and Interacts with Components of the 26S Proteasome. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1626-1640.
- Egner, R., Mahe, Y., Pandjaitan, R. und Kuchler, K.** (1995) Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **11**, 5879-5887
- Elsasser, S., Gali, R.R., Schwickart, M., Larsen, C.N., Leggett, D.S., Muller, B., Feng, M.T., Tubing, F., Dittmar, G.A. und Finley, D.** (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol*, **4**, 725-730.
- Enenkel, C., Blobel, G. und Rexach, M.** (1995) Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem*, **270**, 16499-16502.
- Enenkel, C., Lehmann, A. und Kloetzel, P.M.** (1998) Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *Embo J*, **17**, 6144-6154.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakic, M. und Tollervey, D.** (2003) Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol Cell Biol*, **23**, 1798-1807.
- Fehlker, M., Wendler, P., Lehmann, A. und Enenkel, C.** (2003) Blm3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. *EMBO Rep*, **4**, 959-963.
- Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T. und Johnston, S.A.** (2001) The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, **7**, 981-991.
- Ferdous, A., Kodadek, T. und Johnston, S.A.** (2002) A nonproteolytic function of the 19S regulatory subunit of the 26S proteasome is required for efficient activated transcription by human RNA polymerase II. *Biochemistry*, **41**, 12798-12805.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. und Luhrmann, R.** (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, **82**, 475-483.
- Fontes, M.R., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R.I. und Kobe, B.** (2003) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *J Biol Chem*, **278**, 27981-27987.
- Fontes, M.R., Teh, T. und Kobe, B.** (2000) Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J Mol Biol*, **297**, 1183-1194.
- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A. und Kloetzel, P.M.** (1994) 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol*, **236**, 975-981.

- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M.H. und Vierstra, R.D.** (2001) Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *Embo J*, **20**, 7096-7107.
- Fu, H., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D. und Vierstra, R.D.** (1998) Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J Biol Chem*, **273**, 1970-1981.
- Fujimuro, M., Tanaka, K., Yokosawa, H. und Toh-e, A.** (1998) Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **423**, 149-154.
- Gaczynska, M., Rock, K.L. und Goldberg, A.L.** (1993) Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*, **365**, 264-267.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. und Superti-Furga, G.** (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**, 141-147.
- Gerlinger, U.-M., Guckel, R., Hoffmann, M., Wolf, D.H. and Hilt, W.** (1997) Yeast Cycloheximide-resistant *cri* Mutants Are Proteasome Mutants Defective in Protein Degradation. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 2487-2499.
- Ghislain, M., Udvardy, A. und Mann, C.** (1993) *S. cerevisiae* 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase. *Nature*, **366**, 358-362.
- Gilon, T., Chomsky, O. und Kulka, R.G.** (1998) Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **17**, 2759-2766.
- Girod, P.A., Fu, H., Zryd, J.P. und Vierstra, R.D.** (1999) Multiubiquitin chain binding subunit MCB1 (RPN10) of the 26S proteasome is essential for developmental progression in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, **11**, 1457-1472.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A. und Finley, D.** (1998a) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, **94**, 615-623.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A. und Finley, D.** (1998b) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol*, **18**, 3149-3162.
- Glickman, M.H. und Ciechanover, A.** (2002) The ubiquitin- proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction *Physiol Rev*, **82**, 373- 428.
- Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T. und Johnston, S.A.** (2002) Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science*, **296**, 548-550.
- Gordon, C.** (2002) The intracellular localization of the proteasome. *Curr Top Microbiol Immunol*, **268**, 175-184.
- Gorlich, D.** (1998) Transport into and out of the cell nucleus. *Embo J*, **17**, 2721-2727.
- Gorlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. und Izaurralde, E.** (1997) A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol*, **138**, 65-80.
- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A. und Hartmann, E.** (1996) A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *Embo J*, **15**, 1810-1817.
- Gorlich, D. und Kutay, U.** (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 607-660.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. und Huber, R.** (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.
- Groll, M. und Huber, R.** (2003) Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 606-616.

- Guo, J. und Sen, G.** (2000) Characterization of the interaction between the interferon- induced protein P56 and the Int6 protein encoded by the locus of insertion of the mouse mammary tumor virus. *J Virol.*, **74**, 1892- 1899
- Guterman, A. und Glickman, M.H.** (2004) Complementary roles for rpn11 and ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem*, **279**, 1729-1738.
- Haracska, L. und Udvardy, A.** (1995) Cloning and sequencing of a non- ATPase subunit of the regulatory complex of the Drosophila 26S protease. *Eur J Biochem*, **231**, 720- 725
- Harreman, M.T., Hodel, M.R., Fanara, P., Hodel, A.E. und Corbett, A.H.** (2003) The auto-inhibitory function of importin alpha is essential in vivo. *J Biol Chem*, **278**, 5854-5863.
- Hartmann-Petersen, R., Tanaka, K. und Hendil, K.B.** (2001) Quaternary structure of the ATPase complex of human 26S proteasomes determined by chemical cross- linking. *Arch Biochem Biophys*, **386**, 89- 94
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M. und Gordon, C.** (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci*, **28**, 26-31.
- Heath, C.V., Copeland, C.S., Amberg, D.C., Del Priore, V., Snyder, M. und Cole** (1995) Nuclear pore complex clustering and nuclear accumulation of poly(A)⁺ RNA associated with mutation of the *Saccharomyces cerevisiae* RAT2/NUP120 gene. *J Cell Biol*, **131**, 1677-1697
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. und Wolf, D.** (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/ multicatalytic- multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.*, **10**, 555- 562
- Heinemeyer, W., Trondle, N., Albrecht, G. und Wolf, D.H.** (1994) PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry*, **33**, 12229-12237.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. und Wolf, D.H.** (1997) The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*, **272**, 25200-25209.
- Henkel, T., Zabel, U., van Zee, K., Muller, J.M., Fanning, E. und Baeuerle, P.A.** (1992) Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell*, **68**, 1121-1133.
- Hershko, A., Leshinsky, E., Ganoth, D. und Heller, H.** (1984) ATP- dependent degradation of ubiquitin- protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA*, **81**, 1619- 1623
- Hershko, A. und Ciechanover, A.** (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hilt, W. und Wolf, D.H.** (2000) Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis. Eurekah.com
- Ho, J.H., Kallstrom, G. und Johnson, A.W.** (2000) Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol*, **151**, 1057-1066.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figeys, D. und Tyers, M.** (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, **415**, 180-183.
- Hofmann, K. und Bucher, P.** (1998) The PCI domain: a common theme in three multi- protein complexes. *Trends Biochem Sci*, **23**, 204-205.
- Hofmann, K. und Falquet, L.** (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci*, **26**, 347-350.
- Holz, H., Kapelari, B., Kellermann, J., Seemuller, E., Sumegi, M., Udvardy, A., Medalia, O., Sperling, J., Muller, S.A., Engel, A. und Baumeister, W.** (2000) The regulatory complex

of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *J Cell Biol*, **150**, 119-130.

- Hori, T., Kato, S., Saeki, M., DeMartino, G.N., Slaughter, C.A., Takeuchi, J., Toh-e, A. and Tanaka, K. (1998) cDNA cloning and functional analysis of p28 (Nas6p) and p40.5 (Nas7p), two novel regulatory subunits of the 26S proteasome. *Gene*, **216**, 113-122.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. und O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686- 691
- Iovine, M.K. und Wentz, S.R. (1997) A nuclear export signal in Kap95 is required for both recycling the import factor and interaction with the nucleoporin GLFG repeat regions of Nup116p and Nup100p. *J Cell Biol*, **137**, 797- 811
- Jakel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F.R., Schwamborn, K., Doenecke, D. und Gorlich, D. (1999) The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *Embo J*, **18**, 2411-2423.
- Jans, D.A., Xiao, C.Y. und Lam, M.H.C. (2000) Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays*, **22**, 532- 544
- Kaffman, A., Rank, N.M. und O'Shea, E.K. (1998) Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev*, **12**, 2673-2683.
- Kaiser, P., Moncollin, V., Clarke, D.J., Watson, M.H., Bertolaet, B.L., Reed, S.I. und Bailly, E. (1999) Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. *Genes Dev*, **13**, 1190-1202.
- Kaiser, C., Michaelis, S. und A., Mitchell (1994) Methods in yeast genetics. In. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Kajava, A.V. (2002) What curves alpha-solenoids? Evidence for an alpha-helical toroid structure of Rpn1 and Rpn2 proteins of the 26 S proteasome. *J Biol Chem*, **277**, 49791-49798.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F. und Smith, A.E. (1984a) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, **311**, 33-38.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. und Smith, A.E. (1984b) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**, 499-509.
- Kapelari, B., Bech-Otschir, D., Hegerl, R., Schade, R., Dumdey, R. und Dubiel, W. (2000). Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome. *J Mol Biol*, **300**, 1169-1178.
- Kehlenbach, R.H. und Gerace, L. (2000) Phosphorylation of the nuclear transport machinery down-regulates nuclear protein import in vitro. *J Biol Chem*, **275**, 17848-17856.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Castillo, V. und Goldberg, A.L. (1999) Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell*, **4**, 395-402.
- Kleijnen, M.F., Shih, A.H., Zhou, P., Kumar, S., Soccio, R.E., Kedersha, N.L., Gill, G. und Howley, P.M. (2000) The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol Cell*, **6**, 409-419.
- Kloetzel, P.M. (2001) Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 179-187.
- Kobe, B. (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol*, **6**, 388-397.
- Kobe, B. und Kemp, B.E. (1999) Active site-directed protein regulation. *Nature*, **402**, 373-376.
- Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L. und Finley, D. (2001) The axial channel of the proteasome core particle is gated by the rpt2 atpase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*, **7**, 1143-1152.
- Köhler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H. und Hartmann, E. (1997) Cloning of two novel human importin- alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin- alpha protein family. *FEBS Lett*, **417**, 104- 108
- Kominami, K., DeMartino, G. N., Moomaw, C. R., Slaughter, C. A., Shimbara, N., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Hisamatsu, H., Tanahashi, N. und Shimizu, Y. (1995). Nin1p, a

regulatory subunit of the 26S proteasome, is necessary for activation of Cdc28p kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **14**, 3105-3115.

- LaCasse, E.C. und Lefebvre, Y.A.** (1995) Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1647- 1656
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L. und Pickart, C.M.** (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*, **416**, 763-767.
- Lecker, S.H., Solomon, V., Mitch, W.E. und Goldberg, A.L.** (1999) Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, **129**, 227S-237S.
- Leggett, D.S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R.T., Walz, T., Ploegh, H. und Finley, D.** (2002) Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell*, **10**, 495-507.
- Lehmann, A., Janek, K., Braun, B., Kloetzel, P.M. und Enenkel, C.** (2002) 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol*, **317**, 401-413.
- Leslie, D.M., Grill, B., Rout, M.P., Wozniak, R.W. und Aitchison, J.D.** (2002) Kap121p-mediated nuclear import is required for mating and cellular differentiation in yeast. *Mol Cell Biol*, **22**, 2544-2555.
- Loeb, J.D., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P.A. und Fink, G.R.** (1995) The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7647-7651.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. und Huber, R.** (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, **268**, 533-539.
- Lupas, A., Baumeister, W. und Hofmann, K.** (1997) A repetitive sequence in subunits of the 26S proteasome and 20S cyclosome (anaphase-promoting complex). *Trends Biochem Sci*, **22**, 195-196.
- Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I. und Feldmann, H.** (1999) Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett*, **450**, 27-34.
- Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K. und Glickman, M.H.** (2002) MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem*, **3**, 28.
- McBride, W.H., Iwamoto, K.S., Syljuasen, R., Pervan, M. und Pajonk, F.** (2003) The role of the ubiquitin/ proteasome system in cellular responses to radiation. *Oncogene*, **22**, 5755- 5773.
- McDonald, H.B., Helfant, A.H., Mahony, E.M., Khosla, S.K. und Goetsch, L.** (2002) Mutational analysis reveals a role for the C Terminus of the proteasome subunit Rpt4 in spindle pole body. *Genetics*, **162**, 705- 720
- Moreland, R.B., Langevin, G.L., Singer, R.H., Garcea, R.L. und Hereford, L.M.** (1987) Amino acid sequences that determine the nuclear localization of yeast histone 2B. *Mol Cell Biol*, **7**, 4048-4057.
- Mosammamarast, N., Jackson, K.R., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. und Pemberton, L.F.** (2001) Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol*, **153**, 251-262.
- Nachury, M.V., Ryder, U.W., Lamond, A.I. und Weis, K.** (1998) Cloning and characterization of hSRP1 gamma, a tissue-specific nuclear transport factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 582-587.
- Nadler, S.G., Tritschler, D., Haffar, O.K., Blake, J., Bruce, A.G. und Cleaveland, J.S.** (1997) Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences. *J Biol Chem*, **272**, 4310-4315.
- Nisogi, H., Kominami, K., Tanaka, K. und Toh-e, A.** (1992). A new essential gene of

Saccharomyces cerevisiae, a defect in it may result in instability of nucleus. *Exp Cell Res*, **200**, 48-57.

- Orlowski, M.** (1990) The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*, **29**, 10289-10297.
- Özkaynak, E., Finley, D., Varshavsky, A.** (1989) The yeast *au* genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J*, **5**, 1429-1439
- Paine, P.L., Moore, L.C. und Horowitz, S.B.** (1975) Nuclear envelope permeability. *Nature*, **254**, 109-114.
- Palmeri, D. und Malim, M.H.** (1999) Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol*, **19**, 1218-1225.
- Pante, N. und Kann, M.** (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*, **13**, 425-434.
- Papa, F.R., Amerik, A.Y. und Hochstrasser, M.** (1999) Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell*, **10**, 741-756.
- Pemberton, L.F., Rosenblum, J.S. und Blobel, G.** (1999) Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J Cell Biol*, **145**, 1407-1417.
- Pries, R., Bomeke, K., Draht, O., Kunzler, M. und Braus, G.H.** (2003) Nuclear import of yeast Gcn4p requires karyopherins Srp1p and Kap95p. *Mol Genet Genomics*, **27**, 27.
- Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A. und Dohmen, R.J.** (1998) Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell*, **92**, 489-499.
- Realini, C., Rogers, S.W. und Rechsteiner, M.** (1994) KEKE motifs. Proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett*, **348**, 109-113
- Reits, E.A.J., Benham, A.M., Plougastel, B., Neefjes, J. und Trowsdale, J.** (1997) Dynamics of proteasome distribution in living cells. *Embo J*, **16**, 6087-6094.
- Rexach, M. und Blobel, G.** (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**, 683-692.
- Richmond, C., Gorbea, C. und Rechsteiner, M.** (1997) Specific Interactions between ATPase Subunits of the 26 S Protease. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13403-13411.
- Rinaldi, T., Ricci, C., Porro, D., Bolotin-Fukuhara, M. und Frontali, L.** (1998) A Mutation in a Novel Yeast Proteasomal Gene, RPN11/MPR1, Produces a Cell Cycle Arrest, Overreplication of Nuclear and Mitochondrial DNA, and an Altered Mitochondrial Morphology. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2917-2931.
- Rosenblum, J.S., Pemberton, L.F., Bonifaci, N. und Blobel, G.** (1998) Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. *J Cell Biol*, **143**, 887-899
- Rosenblum, J.S., Pemberton, L.F. und Blobel, G.** (1997) A nuclear import pathway for a protein involved in tRNA maturation. *J Cell Biol*, **139**, 1655-1661.
- Rout, M.P. und Aitchison, J.D.** (2000) Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange. *Essays Biochem*, **36**, 75-88.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Magnasco, M.O. und Chait, B.T.** (2003) Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol*, **13**, 622-628.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. und Chait, B.T.** (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, **148**, 635-651.
- Rout, M.P., Blobel, G. und Aitchison, J.D.** (1997) A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell*, **89**, 715-725.
- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S. und Finley, D.** (1998) Active site

mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *Embo J*, **17**, 4909-4919.

- Russell, S.J., Steger, K.A. und Johnston, S.A.** (1999) Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J Biol Chem*, **274**, 21943-21952.
- Saeki, Y., Toh-e, A. und Yokosawa, H.** (2000) Rapid isolation and characterization of the yeast proteasome regulatory complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 509-515.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning, a laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Santamaria, P.G., Finley, D., Ballesta, J.P.G. und Remacha, M.** (2003) Rpn6p, a Proteasome Subunit from *Saccharomyces cerevisiae*, is Essential for the Assembly and Activity of the 26S Proteasome. *J. Biol. Chem.*, **278**, 6687-6695.
- Satoh, K., Sasajima, H., Nyomura, K., Yokosawa, H. und Sawada, H.** (2001) Assembly of the 26S Proteasome Is Regulated by Phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase Subunit. *Biochemistry*, **40**, 314-319.
- Schafer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D. und Hurt, E.** (2003) The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *Embo J*, **22**, 1370-1380.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frömmel, C., Lowe, J., Huber, R., Kloetzel, P.M. und Schmidt, M.** (1996) Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta- subunits is an ordered two- step mechanism involving autocatalysis *EMBO J*, **15**, 6887- 6898
- Seedorf, M. und Silver, P.A.** (1997) Importin/ karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8590- 8595
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F.R., Podtelejnikov, A., Mann, M. und Hurt, E.** (1998) Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *Embo J*, **17**, 2196-2207.
- Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M.M., Nomura, M. und Goldfarb, D.S.** (1996) In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol*, **135**, 329-339.
- Stoffler, D., Feja, B., Fahrenkrog, B., Walz, J., Typke, D. und Aebi, U.** (2003) Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol*, **328**, 119-130.
- Strom, A.C. und Weis, K.** (2001) Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3008.
- Tabb, M.M., Tongaonkar, P., Vu, L. und Nomura, M.** (2000) Evidence for separable functions of Srp1p, the yeast homolog of importin alpha (Karyopherin alpha): role for Srp1p and Sts1p in protein degradation. *Mol Cell Biol*, **20**, 6062-6073.
- Takeuchi, J., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Tanaka, K. und Toh-e, A.** (1999) Rpn9 is required for efficient assembly of the yeast 26S proteasome. *Mol Cell Biol*, **19**, 6575-6584.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. und Pickart, C.M.** (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J*, **19**, 94-102.
- Tone, Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Fujimuro, M., Yokosawa, H. und Toh-e, A.** (2000) Nob1p, a new essential protein, associates with the 26S proteasome of growing *saccharomyces cerevisiae* cells. *Gene*, **243**, 37-45.
- Tone, Y. und Toh, E.A.** (2002) Nob1p is required for biogenesis of the 26S proteasome and degraded upon its maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **16**, 3142-3157.
- Traencker, E.B., Wilk, S. und Baeuerle, P.A.** (1994) A proteasom inhibitor prevents activation of NF- kappa B and stabilzes a newly phosphorylated form of I kappa B- alpha that is still bound to NF- kappa B. *EMBO J*, **13**, 5433- 5441
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. und Rothberg, J.M.** (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in

Saccharomyces cerevisiae. *Nature*, **403**, 623-627.

- Vale, R. D.** (2000) AAA Proteins: Lords of the Ring. *J Cell Biol*, **150**, F13- F19
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. and Vierstra, R.D.** (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol*, **16**, 6020-6028.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V. und Deshaies, R.J.** (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, **298**, 611-615.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J. und Deshaies, R.J.** (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell*, **11**, 3425-3439.
- Voges, D., Zwickl, P. und Baumeister, W.** (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 1015-1068.
- von Arnim, A.G.** (2001) A hitchhiker's guide to the proteasome. *Sci STKE*, **2001**, PE2.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J.** (1982) Distantly related sequences in the α - and β - subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP- requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, **1**, 945- 951
- Walz, J., Erdmann, A., Kania, M., Typke, D., Koster, A.J. und Baumeister, W.** (1998) 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol*, **121**, 19-29.
- Warner, J.R.** (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, **24**, 437- 440
- Weis, K., Ryder, U. und Lamond, A.I.** (1996) The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *Embo J*, **15**, 1818-1825.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y. und Taylor, S.S.** (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*, **82**, 463-473.
- Wilkinson, C.R., Ferrell, K., Penney, M., Wallace, M., Dubiel, W. und Gordon, C.** (2000) Analysis of a gene encoding Rpn10 of the fission yeast proteasome reveals that the polyubiquitin-binding site of this subunit is essential when Rpn12/Mts3 activity is compromised. *J Biol Chem*, **275**, 15182-15192.
- Wilkinson, C.R., Wallace, M., Seeger, M., Dubiel, W. und Gordon, C.** (1997) Mts4, a non-ATPase subunit of the 26 S protease in fission yeast is essential for mitosis and interacts directly with the ATPase subunit Mts2. *J Biol Chem*, **272**, 25768-25777.
- Wilkinson, C.R., Wallace, M., Morphew, M., Perry, P., Allshire, R., Javerzat, J.P., McIntosh, J.R. und Gordon, C.** (1998) Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. *Embo J*, **17**, 6465-6476.
- Winzler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R.W.** (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P.M. und Kruger, E.** (2000) Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol*, **301**, 1-9.
- Wojcik, C. und DeMartino, G.N.** (2003) Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 579-589.
- Wozniak, R.W., Rout, M.P. und Aitchison, J.D.** (1998) Karyopherins and kissing cousins. *Trends Cell Biol*, **8**, 184-188.
- Xiao, C.Y., Hubner, S. und Jans, D.A.** (1997) SV40 large tumor antigen nuclear import is

regulated by the double-stranded DNA-dependent protein kinase site (serine 120) flanking the nuclear localization sequence. *J Biol Chem*, **272**, 22191-22198.

- Xiao, C.Y., Jans, P. und Jans, D.A.** (1998) Negative charge at the protein kinase CK2 site enhances recognition of the SV40 large T-antigen NLS by importin: effect of conformation. *FEBS Lett*, **440**, 297-301.
- Xie, Y. und Varshavsky, A.** (2000) Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2497-2502.
- Xie, Y. und Varshavsky, A.** (2001) RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: A negative feedback circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3056-3061.
- Xie, Y. und Varshavsky, A.** (2002) UFD4 lacking the proteasome-binding region catalyses ubiquitination but is impaired in proteolysis. *Nat Cell Biol.*, **4**, 1003- 1007
- Yaffe, M.P. und Schatz, G.** (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 4819-4823.
- Yano, R., Oakes, M., Yamagishi, M., Dodd, J.A. und Nomura, M.** (1992) Cloning and characterization of SRP1, a suppressor of temperature-sensitive RNA polymerase I mutations, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **12**, 5640-5651.
- Yano, R., Oakes, M.L., Tabb, M.M. und Nomura, M.** (1994) Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6880-6884.
- Yao, T. und Cohen, R.E.** (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, **419**, 403-407.
- Yen, H.C., Espiritu, C. und Chang, E.C.** (2003a) Rpn5 is a conserved proteasome subunit and required for proper proteasome localization and assembly. *J Biol Chem*, **278**, 30669-30676
- Yen, H.C., Gordon, C. und Chang, E.C.** (2003b) *Schizosaccharomyces pombe* Int6 and Ras Homologs Regulate Cell Division and Mitotic Fidelity via the Proteasome. *Cell*, **112**, 207-217.
- Yokota, K., Kagawa, S., Shimizu, Y., Akioka, H., Tsurumi, C., Noda, C., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Fujiwara, T., Takahashi, E., Ohba, M., Yamasaki, M., DeMartino, G.N., Slaughter, C.A., Toh-e, A. und Tanaka, K.** (1996) CDNA cloning of p112, the largest regulatory subunit of the human 26s proteasome, and functional analysis of its yeast homologue, sen3p. *Mol Biol Cell*, **7**, 853-870.
- Yoshida, K. und Blobel, G.** (2001) The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol*, **152**, 729-740.

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F	Farad
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
IPTG	Isopropyl- β - D- Thiogalaktosid
L	Liter
M	mol/L
mRNA	Boten Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MW	Molekulargewicht
min	Minute
OD	Optische Dichte
PVDF	Polyvinylidenfluorid
POD	Peroxidase konjugiert
Psi	<i>pound per square inch</i> = 6894,75 Pascal
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
S	Svedberg
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SV40	<i>simian virus 40 large T-antigen</i>
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl) aminomethan
U	Units
ü/N	über Nacht
UV	Ultraviolet
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp
x g	mal Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo- 4- chloro- 3-indolyl- beta- D- galaktopyranosid
YPD	Vollmedium (<i>yeast peptone dextrose</i>)

Danksagung

Herrn Professor Dr. Peter- M. Kloetzel möchte ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Biochemie der HU Berlin/ Charite anzufertigen, danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Cordula Enenkel für die wissenschaftliche Betreuung.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe Kloetzel sowie an alle Mitarbeitenden des Instituts für Biochemie der HU Berlin/ Charite für die freundliche Aufnahme und Kooperation.

Andrea Lehmann danke ich für die exzellente technische und persönliche Beratung in vielen kniffligen Laborangelegenheiten sowie für den Spaß.....

Vielen Dank auch an Dr. Roland Beckmann und seine Mitarbeiter, die bei angenehmen und anregenden Frühstücksdiskussionsrunden meinen Horizont erweitert haben.

Ich danke auch ganz besonders den Menschen, die mir außerhalb des Instituts die nötige seelisch- moralische Unterstützung gegeben haben, um diese Arbeit zu Ende zu bringen. In erster Linie geht dieser Dank an Martina Meyer und Nicole Knobloch sowie an meine Familie und FreundInnen.

Dr. Ing. Thomas Polakowski gilt mein Dank für hilfreiche Diskussionen und das leidige Korrekturlesen der Arbeit.

Lebenslauf

P E R S Ö N L I C H E A N G A B E N

Geburtstag: 09. Mai 1972
Geburtsort: Gehrden (Hannover)

A U S B I L D U N G

Promotion Dr. rer. nat. seit 1.10.1999

Institut für Biochemie, Charité, HU Berlin

Dissertation im Rahmen des Forschungsprojektes „Adressierung von 26S Proteasomen“:

Nukleärer Import von 19S regulatorischen Komplexen in der Hefe *S. Cerevisiae*

BetreuerIn: Dr. Cordula Enekel, Prof. P.-M. Kloetzel

Studium Dipl. Ing. Biotechnologie 1991-1998

TU Berlin

Abschluß zur Diplom- Ingenieurin im August 1998, Note: gut. Diplomarbeit im Februar 1998 an der TU Berlin mit dem Thema: "Die Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* als Expressionssystem für Membranproteine am Beispiel des humanen Transferrinrezeptors". Abschlussnote: sehr gut.

BetreuerIn: PD Dr. Christine Lang, Prof. U. Stahl

Matthias-Claudius- Gymnasium 1984-1991

Gehrden

Abiturnote: 1,8

B E R U F S E R F A H R U N G

Institut f. Technische Biochemie 01.03.99- 31.09.99

TU Berlin

Wissenschaftliche Mitarbeiterin: „Mikrobiologie und Enzymatik der mikrobiellen Eliminierung von Dichlordiisopropylether“; Sonderforschungsbereich 193

Institut f. Ökologie der Mikroorganismen 21.03.96 - 30.09.98

TU Berlin

Tätigkeit als studentische Hilfskraft auf dem Gebiet der mikrobiellen, reduktiven Dechlorierung von Trichlorbenzolen in Abwasser; Ergebnisse gehen ein in:

Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke and H. Gorisch (2000). "Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes." *Nature* 408(6812): 580-3.

Erasmus- Stipendium 01.01.95 - 31.05.95

Wageningen Agricultural University, Niederlande

Studienarbeit im Mai 1995 mit dem Thema: "Ectopic Recombination in *Aspergillus nidulans*".

Abschlussnote: 1,7

Schering AG 04.10.94 - 23.12.94

Mikrobiologische Entwicklung Charlottenburg

Berlin

Industriepraktikum im Rahmen des Studiums

Publikationsliste

Wendler, P., Lehmann, A. Janek, K., Baumgart, S. und Enenkel, C. (2004). The bipartite nuclear localisation sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin $\alpha\beta$ and proteasome functions. *J Biol Chem* (in press).

Fehlker, M., Wendler, P., Lehmann, A. und Enenkel, C. (2003). Blm3 is part of nascent proteasomes and is involved in a late stage of nuclear proteasome assembly. *EMBO Rep* **4**(10): 959-63.

Hauck, R., Adrian, L., Wendler, P., Amidjojo, M., Hegemann, W. und Gorisch, H. (2001). Transformation of 2,2'-dichlorodiisopropyl ether in mixed and pure culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**(3-4): 491-5.

Auszeichnung der Diplomarbeit mit dem Biotechnica Preis 1999

**Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig
und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.**