

Regulation der Proteasombiogenese
in *Saccharomyces cerevisiae*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Markus Konrad Justin London

aus Neuss

Dormagen, 2004

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2004

Abstract

Selective ubiquitin (Ub)-mediated proteolysis is the dominating mechanism in the degradation of cytosolic and nuclear proteins in eukaryotic cells. Substrate proteins are recognized by enzymes of the Ub-system, and poly-Ub-chains are attached to internal lysine residues. These poly-Ub-chains mediate interaction with the 26S-proteasome, a ~2MDa complex that unfolds and degrades the substrate proteins. Expression of proteasome subunit genes is regulated by an autoregulatory mechanism in dependence of proteasome activity. In this work it is shown that the transcriptional activator Rpn4 controls basal as well as activity-dependent expression of proteasome subunit genes and of the polyubiquitin gene. Deletion of *RPN4* resulted in a reduction of proteasome activity by 50% and led to severe growth defects in combination with mutants interfering with proteasome activity or assembly. Analysis of Rpn4 stability in different proteasome deficient mutants revealed that Rpn4 itself is a substrate of the proteasome which directly links Rpn4 abundance to the activity of the proteasome. This enables the cell to correlate proteasome activity and Rpn4 dependent de novo synthesis of proteasome complexes. Rpn4 is an unusual substrate of the proteasome that is degraded by ubiquitin-dependent and -independent mechanisms.

A selection based screen for mutants stabilizing Rpn4 led to the isolation of *dor2* and *dor3* (degradation of Rpn4). The *dor2* mutation seems to affect the *FHL1* gene that encodes a transcription factor involved in ribosomal RNA processing. The identity of the gene affected by *dor3* is currently unknown, but it could be shown that the mutation results in an impaired ubiquitin-dependent degradation of Rpn4.

In addition to regulating proteasome subunit gene expression, Rpn4 is also part of a regulatory network controlling cellular responses to a variety of stresses including DNA-damage. In the present work the effects of two substances that induce such stresses were analyzed. It could be shown that addition of the DNA-damaging drug methyl methanesulfonate (MMS) leads to an increase in *RPN4* gene expression while addition of caffeine induces a more rapid turnover of Rpn4 protein. The deletion of Rpn4 resulted in a strong sensitivity against MMS and caffeine. Overexpression of the *YAP1* or *SSZ1* gene suppressed this hypersensitivity. Both genes are known to act in cellular responses to various stresses. Analysis of the mechanisms underlying the regulation of Rpn4 could reveal interesting insights into the interplay between the ubiquitin/proteasome-system and cellular responses to a variety of different stresses.

Abstract (in english)

1	Einleitung	1
1.1	Das Ubiquitin-System	2
1.1.1	Die Ubiquitylierungsmaschinerie.....	2
	Ubiquitin wird als Fusionsprotein exprimiert.....	2
	Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1).....	3
	Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2).....	4
	Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3).....	5
	Ubiquitinketten-verlängernde Enzyme (E4).....	7
1.1.2	Deubiquitylierende Enzyme (DUB).....	8
1.1.3	Abbausignale des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus.....	9
1.1.4	Funktionen des Ubiquitin-Systems.....	11
1.2	Das Proteasom	12
1.2.1	Struktur und Funktion des Proteasoms.....	13
	Das 20S-Proteasom.....	13
	Das 26S-Proteasom.....	15
1.2.2	Assemblierung und Reifung des Proteasoms.....	17
	Die Assemblierung des 20S-Proteasoms.....	17
	Die Funktion der Propeptide der β -Untereinheiten.....	20
	Die Reifung der aktiven β -Untereinheiten.....	20
1.2.3	Die Regulation der Menge aktiver Proteasomen.....	21
1.3	Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Materialien	24
2.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	24
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	25
2.1.3	<i>Escherichia coli</i> -Klonierungsvektoren.....	25
2.1.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Vektoren.....	25
2.1.5	Oligonukleotide.....	26

2.1.6	Enzyme und Antikörper.....	27
2.1.7	Chemikalien.....	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Medien zur Anzucht von Bakterien und Hefen.....	28
2.2.2	Molekularbiologische und genetische Methoden.....	29
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	29
2.2.2.2	Restriktion von DNA mit Endonukleasen.....	29
2.2.2.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel- Elektrophorese.....	29
2.2.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	30
2.2.2.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
2.2.2.6	DNA-Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion nach Mullis <i>et al.</i> (1986).....	30
2.2.2.7	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von <i>Escherichia coli</i>	31
2.2.2.8	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	32
2.2.2.9	Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von <i>S.cerevisiae</i>	32
2.2.2.10	Plasmid-Präparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nach Robzyk <i>et al.</i> (1992).....	33
2.2.2.11	Präparation genomischer DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.2.2.12	Sequenzierung von DNA nach Sanger <i>et al.</i> (1977).....	35
2.2.2.13	Nachweis spezifischer mRNA durch Northern-Blot.....	35
2.2.3	Biochemische Methoden.....	37
2.2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	37
2.2.3.2	Herstellung von zellfreien Proteinrohextrakten.....	38
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970).....	38
2.2.3.4	Nachweis von Proteinen durch Western-Blot.....	40
2.2.3.5	Fraktionierung von Proteinrohextrakten durch Gelfiltration nach Ramos <i>et al.</i> , (1998).....	40
2.2.3.6	Bestimmung der chymotryptischen Aktivität des Proteasoms.....	41
2.2.3.7	Untersuchung der Proteininstabilität durch „Cycloheximide chase“.....	42
2.2.4	Methoden der Hefegenetik.....	42
2.2.4.1	Kreuzung von haploiden Hefestämmen.....	42

2.2.4.2	Paarungstypanalyse von Hefezellen.....	42
2.2.4.3	Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse.....	43
2.2.4.4	Deletion und Manipulation von Genen in <i>S. cerevisiae</i> nach Longtine <i>et al.</i> (1998).....	43
2.2.4.5	Analyse des Wachstums von <i>S. cerevisiae</i> -Stämmen durch serielle Verdünnung.....	44
2.2.4.6	Anlage von Dauerkulturen von <i>E.coli</i> und <i>S.cerevisiae</i>	44
3	Ergebnisse.....	45
	3.1 Analyse der Autoregulation der Menge aktiver Proteasomen in Abhängigkeit von der proteasomalen Aktivität.....	45
3.1.1	Der Transkriptionsfaktor Rpn4 ist ein zentraler Regulator der Biogenese des Proteasoms.....	46
3.1.2	Phänotypische Charakterisierung von <i>RPN4</i>	49
	Die Deletion von <i>RPN4</i> in <i>ump</i> -Mutanten führt zu synthetischen Wachstumsdefekten.....	49
	Die Deletion von <i>RPN4</i> führt zu einer Verringerung der konstitutiven Menge aktiver Proteasomen.....	51
3.1.3	Die Expression von Ubiquitin wird von Rpn4 kontrolliert.....	53
3.1.4	Rpn4 ist ein Substrat des Proteasoms.....	56
3.1.5	Isolierung von Mutationen, die zur Stabilisierung von Rpn4 führen.....	59
3.1.6	Klonierung des durch <i>dor2</i> betroffenen Gens.....	64
3.1.7	Rpn4 ist Bestandteil eines Proteinkomplexes.....	65
3.1.8	Das Rpn4-Protein ist im Pilzreich konserviert.....	68
3.2	Rpn4 ist Teil eines Netzwerkes, das die Antwort auf verschiedene Stresssituationen kontrolliert.....	71
3.2.1	Die Deletion von <i>RPN4</i> führt zur Sensitivität gegen DNA-schädigende Substanzen und gegen Koffein.....	71
3.2.2	Die Expression von <i>RPN4</i> wird durch Zugabe von Methylmethansulfonat gesteigert.....	72

3.2.3	Die Zugabe von Koffein führt zu einem Verlust des Rpn4-Proteins.....	73
3.2.4	Isolierung von Suppressoren der Koffeinsensitivität der <i>rpn4Δ</i> -Mutante.....	75
4	Diskussion.....	80
4.1	Der Transkriptionsfaktor Rpn4 reguliert die Expression proteasomaler Gene und ist ein Substrat des Proteasoms.....	80
4.1.1	Rpn4 reguliert die Expression von Genen des Ubiquitin/Proteasom-Systems.....	81
4.1.2	Rpn4 kontrolliert die Biogenese von Ubiquitin.....	84
4.1.3	Rpn4 ist ein ungewöhnliches Substrat des Proteasoms.....	85
4.1.4	Rpn4 ist Bestandteil eines Proteinkomplexes.....	90
4.2	Rpn4 ist Teil eines Netzwerks, das verschiedene Stressantworten integriert.....	91
4.2.1	Die Deletion von <i>RPN4</i> bewirkt eine Sensitivität gegen die DNA-alkylierende Substanz Methylmethansulfonat und gegen Koffein.....	92
4.2.2	Die Überexpression von <i>YAPI</i> oder <i>SSZ1</i> supprimiert die MMS- und Koffeinsensitivität der <i>rpn4</i> -Deletionsmutante.....	96
4.2.3	<i>YAPI</i> kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in Stresssituationen aktiviert wird.....	97
4.2.4	<i>Ssz1</i> ist Bestandteil eines Ribosom-assoziierten Chaperonkomplexes, der die Aktivität von <i>Pdr1</i> beeinflusst.....	99
4.3	Ausblick.....	101
5	Zusammenfassung.....	103
6	Literatur.....	104
7	Abkürzungsverzeichnis.....	119
8	Anhang.....	121

Eidesstattliche Erklärung

Lebenslauf

1 Einleitung

Die selektive Proteolyse ist von essentieller Bedeutung für das Leben, das Wachstum und die Entwicklung von Organismen. Sie berührt nahezu alle Bereiche zellulären Lebens, z.B. Zellzyklusregulation, Signaltransduktion, Zelldifferenzierung, Proteintransport, DNA-Reparatur, Apoptose, Elimination abnormer Proteine, Qualitätskontrolle im endoplasmatischen Retikulum, Antigenpräsentation und Reaktion auf Stressbedingungen. Die Bedeutung der Kontrolle dieser Mechanismen wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass Störungen zu Krankheiten führen können, die bis hin zu neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs reichen (Weissman, 2001).

In eukaryotischen Zellen wird der größte Teil der Proteine im Zytosol und im Zellkern durch das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut. Kernstück dieser Maschinerie ist das 26S-Proteasom, ein multikatalytischer Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 2,5 MDa, der aus über 60 Untereinheiten zusammengesetzt ist. Dieser Komplex erkennt, entfaltet und lysiert Proteine, die vorher für die selektive Proteolyse markiert wurden (Bochtler *et al.*, 1999; Voges *et al.*, 1999). Die enzymatische Aktivität ist im Innern des zylindrischen 20S-Proteasoms verborgen, das den Kern des größeren 26S-Proteasoms darstellt. Diese als Selbstkompartimentierung bezeichnete Organisation des Proteasoms schützt Proteine, die nicht Substrat des Proteasoms sind, vor einer unselektiven Proteolyse (Baumeister, 1998). Die Ausbildung des 26S-Proteasoms erfolgt durch Anlagerung regulatorischer Komplexe (die sogenannten 19S-Komplexe), die die Bindung, Entfaltung und Einführung der Substratproteine in die enzymatisch aktive innere Kammer des 20S-Proteasoms katalysieren (Bochtler *et al.*, 1999; Voges *et al.*, 1999). Nur solche Proteine, die als Substrat erkannt worden sind, werden von den 19S-Komplexen entfaltet und so dem Abbau zugeführt.

Die hochspezifische Erkennung und Markierung von Substratproteinen des Proteasoms wird durch das Ubiquitinsystem ermöglicht. Eine Kaskade enzymatischer Reaktionen führt zur Konjugation des C-terminalen Glycinrestes eines Ubiquitinmoleküls mit der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysinrestes des Substratproteins (Chau *et al.*, 1989) Sommer, 2000). In weiteren Schritten werden dann Ubiquitinmoleküle auf eine ϵ -Aminogruppe eines bereits an das Substrat konjugierten Ubiquitins übertragen. Dies führt zum Aufbau von mit dem Substratprotein verknüpften Ubiquitinketten, die zu einer effizienten Erkennung durch

das Proteasom führen (Hochstrasser, 1996; Hershko und Ciechanover, 1998) Sommer, 2000). Die Konjugation mit Ubiquitin führt jedoch nicht immer zur Proteolyse durch das Proteasom, sondern kann auch andere Funktionen erfüllen. Hierbei werden die Substratproteine meist nicht mit einer Polyubiquitinkette, sondern mit einzelnen Ubiquitinmolekülen konjugiert (Hicke, 2001).

1.1 Das Ubiquitin-System

Der Begriff Ubiquitin-System umfasst die an der Konjugation des Ubiquitins mit anderen Proteinen beteiligten Enzyme und Mechanismen. Das Ubiquitin ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorkommendes, nur 76 Aminosäurereste umfassendes Polypeptid, das sowohl in seiner Sequenz als auch in seiner Tertiärstruktur hochkonserviert ist. Das Ubiquitin des Menschen und das der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unterscheiden sich z.B. nur in drei Aminosäureresten (Özkaynak *et al.*, 1987). Die Übertragung des Ubiquitins auf das Substratprotein erfolgt durch die aufeinander folgenden Aktivitäten dreier unterschiedlicher Enzymklassen, die aus historischen Gründen als E1-, E2- und E3-Enzyme bezeichnet werden (Abb. 1). Die E1- oder Ubiquitin-aktivierenden Enzyme aktivieren ein Ubiquitinmolekül unter Verbrauch von ATP und übertragen es auf ein E2-Enzym. Die E2-Enzyme, auch Ubiquitin-konjugierende Enzyme genannt, übertragen dann mit Hilfe der E3-Enzyme, den Ubiquitin-Protein-Ligasen, das Ubiquitin auf das Substratprotein (Sommer, 2000).

1.1.1 Die Ubiquitylierungsmaschinerie

Ubiquitin wird als Fusionsprotein exprimiert

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird Ubiquitin von vier verschiedenen Genen kodiert (Özkaynak *et al.*, 1987). Die Gene *UBI1* - *UBI3* kodieren für Fusionsproteine mit ribosomalen Untereinheiten, die noch kotranslational oder kurze Zeit nach Vollendung der Translation von Ubiquitin-spezifischen-Proteasen (Ubp) prozessiert werden (Finley *et al.*, 1989). Unter normalen Wachstumsbedingungen stellen sie die Hauptquelle des Ubiquitins dar. *UBI4* kodiert für ein Fusionsprotein, in dem fünf Ubiquitinmoleküle linear aneinander gefügt sind. Die Expression dieses Gens wird unter Stressbedingungen, z.B. bei hohen Temperaturen oder nach DNA-Schäden, induziert (Özkaynak *et al.*, 1984; Finley *et al.*, 1987).

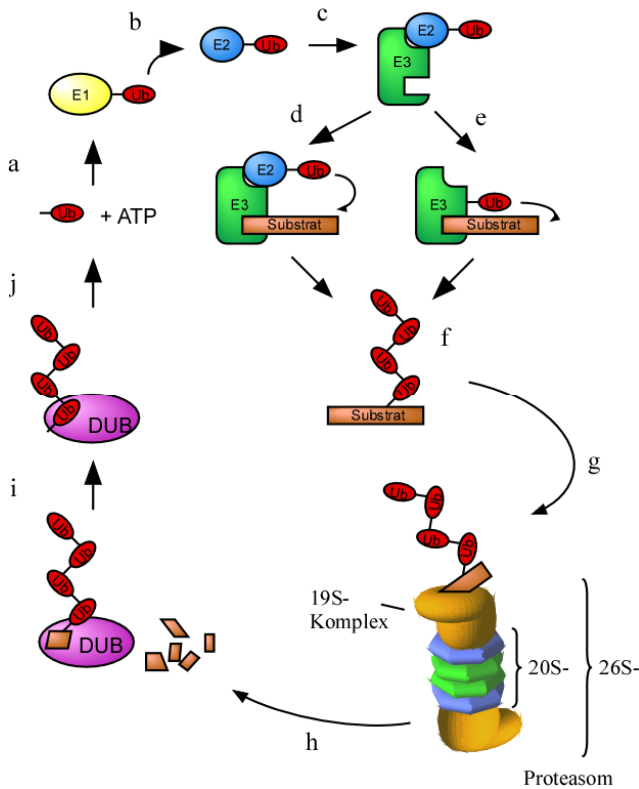


Abb. 1: Das Ubiquitin-System

Durch die aufeinander folgenden Aktivitäten von E1-, E2- und E3-Enzymen wird Ubiquitin (Ub) auf das Substratprotein übertragen. E1- (Ubiquitin-aktivierende) Enzyme binden das Ubiquitin in Form eines Thioesters unter ATP-Verbrauch (a). In einer Transesterifizierungsreaktion wird Ubiquitin auf ein E2-Enzym übertragen (b), das anschließend mit einem E3-Enzym interagiert (c). Unter Mitwirkung des E3-Enzyms (Ubiquitin-Protein-Ligase) wird das Ubiquitin auf ein Substratprotein übertragen. Dies kann direkt geschehen (d), oder durch vorherige Bindung des Ubiquitins an das E3-Enzym in Form einer Thioesterverbindung (e). Der Aufbau einer Polyubiquitinkette am Substratprotein (f) führt zu dessen Erkennung durch den 19S-Aktivator-Komplex am Proteasom (g). In einer ATP-abhängigen Reaktion wird das Substrat entfaltet und in das Innere des Proteasoms transloziert, wo es dann zu Peptiden abgebaut wird (h). Die Rückgewinnung von Ubiquitinmonomeren erfolgt durch Deubiquitylierende Enzyme, nachdem die Polyubiquitinkette während der Entfaltung vom Substrat abgespalten wurde (i und j).

Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1)

Der Prozess der Ubiquitylierung beginnt mit der Aktivierung des Ubiquitins durch ein Enzym aus der Familie der Ubiquitin-aktivierenden Enzyme (Uba - Ubiquitin activating). Unter Spaltung von ATP wird Ubiquitin zunächst am C-terminalen Glycinrest adenyliert und anschließend unter Ausbildung einer energiereichen Thioesterverbindung mit der Seitenkette des zentralen Cysteins des E1-Enzyms verknüpft. Durch eine Transesterifizierungsreaktion wird das Ubiquitin dann auf ein Enzym der E2-Klasse übertragen. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kodiert das essentielle *UBA1*-Gen für das E1-Enzym (McGrath *et al.*, 1991). In Säugerzellen kodiert ebenfalls nur ein Gen für das E1-Enzym. Die Entdeckung, dass eine temperatursensitive Mutation des E1-Enzyms in Säugerzellen zu einem Zellzyklusdefekt führt, stellte zum ersten Mal die besondere Bedeutung des Ubiquitinsystems für die Zelle heraus (Finley *et al.*, 1984).

Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2)

Die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (Ubc - Ubiquitin conjugating) binden das Ubiquitin ebenfalls über die Seitenkette eines zentralen Cysteinrestes in Form eines Thioesters. In der Bäckerhefe konnten 13 für E2-ähnliche Proteine kodierende Gene identifiziert werden (Weissman, 2001) Von diesen 13 Genen kodieren jedoch nur 11 tatsächlich für Ubiquitin-konjugierende Enzyme (*UBC1 - UBC8, UBC10, UBC11, UBC13*), während *UBC9* für ein SUMO-konjugierendes und *UBC12* für ein Rub1-konjugierendes Enzym kodierten. SUMO (small ubiquitin related modifier, in der Hefe durch das Gen *SMT3* kodiert) und Rub1 sind Vertreter der wachsenden Familie dem Ubiquitin ähnlicher Proteine, die analog zu diesem kovalent mit anderen Proteinen verknüpft werden (Johnson und Blobel, 1997; Johnson *et al.*, 1997; Liakopoulos *et al.*, 1998); Sommer, 2000).

Allen Ubc-Enzymen gemeinsam ist eine ca. 150 Aminosäurereste umfassende Ubc-Domäne. Diese enthält den aktiven Cysteinrest, an den das Ubiquitinmolekül gebunden wird. Außerhalb dieser Region zeigen die Ubc-Enzyme teilweise starke Sequenzunterschiede. Diese verschiedenen Extensionen sind wahrscheinlich an der beobachteten hohen Spezifität für die verschiedenen Proteinsubstrate beteiligt (Sommer, 2000). Einigen Ubc-Enzymen der Hefe konnten distinkte Funktionen zugewiesen werden. So sind z.B. die Enzyme Ubc1, 6 und 7 an der Erkennung und Ubiquitylierung falsch gefalteter Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum beteiligt, die durch den ERAD Mechanismus (ER associated degradation) aus dem Sekretionsweg der Zelle entfernt werden (Biederer *et al.*, 1997). Ubc2 (auch als Rad6 beschrieben) ist sowohl an der DNA-Reparatur als auch an der Erkennung von Substraten beteiligt, die nach der „N-end rule“ (siehe Kap. 1.1.3) abgebaut werden (Jentsch *et al.*, 1987; Dohmen *et al.*, 1991b). Das essentielle Ubc3 (Cdc34) ist verantwortlich für den Abbau von G1-Zyklinen und des CDK-Inhibitors Sic1 und kontrolliert somit wichtige Schritte des Zellzyklus (Blondel und Mann, 1996); Mann und Hilt, 2000). Außerdem vermittelt es den Abbau von Gcn4, einem zentralen Regulatorprotein der Aminosäurebiosynthese in der Hefe (Kornitzer *et al.*, 1994). Ubc4 und Ubc5 sind am Abbau abnormer Proteine unter normalen als auch unter Stressbedingungen beteiligt (Seufert und Jentsch, 1990) und zusammen mit Ubc6 und Ubc7 sind sie verantwortlich für die Ubiquitylierung des Mat- α 2-Repressors (Chen *et al.*, 1993).

Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3)

Die Ubiquitin-Protein-Ligasen stellen die heterogenste Klasse von Enzymen in der Übertragung von Ubiquitin auf Substratproteine dar. Ihnen kommt die wichtige Rolle der spezifischen Erkennung des Substrats und der Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat zu. Diese Aufgabe erfüllen sie entweder alleine oder in Kombination mit einem zugehörigen Ubiquitin-konjugierenden Enzym (Weissman, 2001). Generell können die E3-Enzyme in drei verschiedene Subtypen eingeteilt werden: HECT-Proteine, RING-Finger-E3-Enzyme und U-box-Proteine (Scheffner *et al.*, 1990; Huibregtse *et al.*, 1995; Deshaies, 1999; Hatakeyama und Nakayama, 2003).

Allen HECT-Proteinen ist eine C-terminal gelegene, ca. 350 Aminosäurereste lange sogenannte HECT-Domäne gemeinsam. Sie enthält einen aktiven Cysteinrest, der ein kovalentes Thioester-Intermediat mit dem zu übertragenden Ubiquitinmolekül eingeht (Huibregtse *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1995). Als erstes Mitglied der HECT-Familie wurde das Protein E6-AP identifiziert, aus dessen Bezeichnung sich auch der Name dieser Proteinfamilie herleitet (HECT = Homolog zum E6-AP C-Terminus). In Kombination mit dem viruskodierten E6-Protein des Humanen Papillomavirus (HPV) bewirkt es die Ubiquitylierung und den anschließenden Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 (Scheffner *et al.*, 1990). Ein natürliches Substrat von E6-AP ohne Mitwirkung von E6 ist das humane UDP (Ubiquitin-domain protein) HHR23A (Kumar *et al.*, 1999). In der Hefe konnten mehrere HECT-Proteine identifiziert werden, z.B. Rsp5 (Bregman *et al.*, 1995; Hoppe *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2003), Ufd4 (Johnson *et al.*, 1995) und Tom1 (Utsugi *et al.*, 1999; Tabb *et al.*, 2001).

Die zweite Klasse von E3-Enzymen bilden die sogenannten RING-Finger-Proteine. Die RING-Finger-Domäne dieser Proteine stellt eine Zink-bindende Strukturdomäne dar, die dem Zinkfingermotiv DNA-bindender Proteine ähnlich ist. Für diese Enzyme konnte keine kovalente Bindung von Ubiquitin gezeigt werden, so dass man vermutet, dass sie eine Adapterfunktion erfüllen, und so die direkte Übertragung von Ubiquitin vom E2-Enzym auf das Substrat vermitteln (Weissman, 2001). RING-Finger enthaltende E3-Enzyme treten sowohl als monomere als auch als multimere Proteinkomplexe auf. Tatsächlich wurde die Funktion der RING-Domäne in der Ubiquitylierung erst erkannt, als das Protein Rbx1 (RING box protein 1, auch als Roc1 oder Hrt1 bezeichnet) als Komponente des SCF-Komplexes (siehe unten) identifiziert wurde (Deshaies, 1999; Kamura *et al.*, 1999).

Vertreter monomerer RING-Finger-E3-Enzyme sind z.B. Mdm2, das für die Ubiquitylierung von p53 verantwortlich ist, sowie Parkin, das mit juvenilem Parkinson in Verbindung gebracht wird (Imai *et al.*, 2002), und die Inhibitoren der Apoptose (IAP's) (Weissman, 2001). In Hefe stellt das Protein Ubr1 einen gut untersuchten Vertreter dieser Klasse dar. Ubr1 ist zusammen mit Ubc2 am Abbau von Proteinen mit destabilisierendem N-Terminus (nach der „N-end-rule“) beteiligt (Bartel *et al.*, 1990; Dohmen *et al.*, 1991b).

Die bekanntesten Vertreter multimerer RING-Finger-E3-Enzyme sind der SCF-Komplex (Skp1/Cullin/F-box-Komplex) und der APC (Anaphase promoting complex). Beide sind zentrale Regulatoren des Zellzyklus (Mann und Hilt, 2000). Der SCF-Komplex besteht im Kern aus vier Untereinheiten: Skp1, Cdc53 (einem Cullin), Sgt1 und einem F-Box-Protein (Skowyra *et al.*, 1997); Mann und Hilt, 2000). Skp1, Rbx1 und Sgt1 binden an Cdc53/Cullin. Die F-Box-Proteine binden über die F-Box-Domäne an Skp1 und vermitteln die Substratspezifität, indem sie die Substrate binden und zum SCF-Komplex führen. Sie enthalten häufig Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie z.B. WD40-Wiederholungen oder leucinreiche Domänen. Zusammen mit Ubc3 (Cdc34) katalysieren sie die Ubiquitylierung von Sic1, einem Inhibitor der zyklinabhängigen Kinase Cdc28 (CDK), der G1-Zykline Cln1, Cln2 und Cln3 sowie einer Reihe weiterer Substrate (Mann und Hilt, 2000).

Strukturell ähnlich zum SCF-Komplex ist der von-Hippel-Lindau-Cul2/Elongin-C/Elongin-B (VHL-CBC)-Komplex. Die Substraterkennung erfolgt hier durch das VHL-Protein, das über eine sogenannte „SOCS (suppressor of cytokine signalling)-box“ mit dem Kern des Komplexes interagiert. Es wird vermutet, dass SOCS-box-Proteine, analog zu den F-Box-Proteinen in SCF-Komplexen, im ECS-Komplex (Elongin-C-Cullin-SOCS-Box) austauschbar sind, um die Erkennung verschiedener Substrate zu ermöglichen (Weissman, 2001; Kile *et al.*, 2002).

Der „Anaphase Promoting Complex“ (APC), auch Cyclosom genannt, ist das komplizierteste der multimeren E3-Enzyme. In Hefe sind mindestens 12 Untereinheiten bekannt (Zachariae *et al.*, 1996; Zachariae *et al.*, 1998a). Auch hier konnten Cullin-ähnliche (Apc2) und RING-Finger enthaltende Proteine (Apc11) identifiziert werden. Der APC wird benötigt, um in der Mitose verschiedene Substrate zu beseitigen, um so den Fortschritt des Zellzyklus zu ermöglichen. Zu diesen Substraten gehören unter anderem die mitotischen Zykline (Clb 1 - 4) und Proteine, die die Chromosomensegregation unterbinden, um eine vollständige Replikation zu ermöglichen (Pds1/Securin, Cut2). Ähnlich zu den

F-Box-Proteinen im SCF-Komplex benötigt der APC die Interaktion mit anderen Faktoren, die ihn aktivieren und die Substraterkennung durchführen. Diese Funktion wird von den Proteinen Cdc20 und Hct1 erfüllt (Zachariae *et al.*, 1998b; Mann und Hilt, 2000).

Die U-box-Proteine stellen eine weitere Klasse der Ubiquitin-Protein-Ligasen dar. Die bei diesen Proteinen vorkommende U-box-Domäne ist in ihrer dreidimensionalen Struktur der RING-Domäne ähnlich, jedoch fehlen ihr deren kennzeichnende, Metall bindende Aminosäurereste Histidin und Cystein (Hatakeyama und Nakayama, 2003). Der Prototyp des U-box Proteins ist das Ufd2-Protein der Bäckerhefe. Es wurde aufgrund seiner Funktion im Abbau von Modellsubstraten identifiziert (Johnson *et al.*, 1995). Weitere Untersuchungen wiesen ihm eine besondere Rolle als Ubiquitinketten-verlängerndes Enzym (E4) zu (Koegl *et al.*, 1999); siehe unten). Ufd2 konnte ohne zusätzliches E3-Enzym keine Ubiquitylierungsreaktion der untersuchten Substrate durchführen (Koegl *et al.*, 1999). Für andere Vertreter der U-box-Proteine konnte jedoch eine Funktion als Ubiquitin-Protein-Ligase gezeigt werden (Hatakeyama *et al.*, 2001). Für das Protein Uip5, das neben der U-box auch eine RING-Domäne besitzt, konnte gezeigt werden, dass die Ligaseaktivität auf der U-box-Domäne und nicht auf der RING-Domäne beruht. Ein weiterer bekannter Vertreter der Klasse der U-box-E3-Enzyme ist CHIP, ein Protein, das mit molekularen Chaperonen interagiert und am Abbau falsch gefalteter Proteine beteiligt ist (Connell *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2001).

Ubiquitinketten-verlängernde Enzyme (E4)

Untersuchungen zur Ubiquitylierung von Modellsubstraten ergaben, dass die sequentielle Aktivität von E1-, E2- und E3-Enzymen für die Ausbildung genügend langer Ketten mitunter nicht ausreicht. Dies führte zur Entdeckung eines weiteren Enzyms in der Ubiquitylierungskaskade, das als E4-Enzym bezeichnet wurde (Koegl *et al.*, 1999). In Hefe wird dieses Protein durch das Gen *UFD2* kodiert, das bereits in Verbindung mit dem ubiquitinabhängigen Abbau eines Modellsubstrates identifiziert wurde (Johnson *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass das Ufd2-Protein *in vivo* und *in vitro* benötigt wird, um das artifizielle Substrat Ub-Pro-β-Gal in ausreichender Weise zu ubiquitylieren. Daher wurde es auch als Ubiquitinketten-Assemblierungsfaktor bezeichnet (Koegl *et al.*, 1999). Ob diese Funktion auch für andere Substrate benötigt wird, ist gegenwärtig unklar.

1.1.2 Deubiquitylierende Enzyme (DUB)

Die Konjugation von Ubiquitin an Substratproteine ist eine reversible Modifikation. Die Abspaltung des Ubiquitins vom Substratprotein oder von anderen Ubiquitinmolekülen wird von Deubiquitylierenden Enzymen (DUB) katalysiert. DUB können in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden: Ubiquitin-carboxy-terminale-Hydrolasen (UCH) und Ubiquitin-spezifische-Proteasen (UBP) (Baker, 2000). Die Enzyme des UCH-Typs setzen Ubiquitin aus kurzen Amid- und Ester-Verbindungen und aus Verknüpfungen mit Peptid- und kurzen Proteinkonjugaten frei. In der Bäckerhefe kodiert lediglich das *YUHI*-Gen für ein Enzym dieser Gruppe. Demgegenüber besteht die Familie der UBPs in Hefe aus 16 Mitgliedern, die strukturell durch das Vorhandensein der konservierten „Cys“- und „His-Boxen“ gekennzeichnet sind. Diese enthalten einen konservierten Cystein- und zwei konservierte Histidinreste, die wahrscheinlich das aktive Zentrum des Enzyms bilden (Baker, 2000). Neben der Freisetzung von Ubiquitin aus den Vorläuferproteinen (siehe oben) spalten die UBPs Ubiquitin auch aus Polyubiquitinketten und von Substratproteinen. Nur für wenige UBPs ist eine spezifische Funktion bekannt. Für die Enzyme Ubp4/Doa4 und Ubp6 konnte eine Assoziation mit dem Proteasom gezeigt werden (Papa *et al.*, 1999; Leggett *et al.*, 2002). Sie katalysieren die Abspaltung von Ubiquitinketten von Substratproteinen am Proteasom und bewirken so ein „Recycling“ des Ubiquitins (Papa und Hochstrasser, 1993; Swaminathan *et al.*, 1999; Leggett *et al.*, 2002; Chernova *et al.*, 2003; Hanna *et al.*, 2003). Das Enzym Ubp14 ist ebenfalls am „Recycling“ des Ubiquitins beteiligt, indem es einzelne Ubiquitinmoleküle aus freien Polyubiquitinketten freisetzt (Amerik *et al.*, 1997); Sommer, 2000).

Eine weitere deubiquitylierende Aktivität, die mit dem Proteasom assoziiert ist, ist im Rpn11-Protein lokalisiert, einer Untereinheit des 19S-Komplexes. Im Gegensatz zu den 16 Ubp-Enzymen befindet sich in seinem aktiven Zentrum ein Zn^{2+} -Ion (Verma *et al.*, 2002; Yao und Cohen, 2002). Rpn11 hydrolysiert die Bindung zwischen dem Proteinsubstrat und dem proximalen Ubiquitinrest und bewirkt so die Freisetzung der Ubiquitinkette. Im Unterschied zu Ubp4/Doa4, Ubp14 und Ubp6 ist die Funktion von Rpn11 essentiell (Yao und Cohen, 2002).

Eine von der für die oben erwähnten, mit dem Proteasom assoziierten DUB, beschriebenen Funktion konnte für das bisher nur in Säugern identifizierte Protein Uch37 gezeigt werden. Es katalysiert die Abspaltung von Ubiquitinmolekülen vom distalen Ende der Ubiquitinkette der am Proteasom gebundenen Substratproteine. Bei Proteinen, die

fälschlicherweise als Substrat erkannt, aber nur mit kurzen Ubiquitinketten verknüpft wurden, schwächt diese Verkürzung der Ubiquitinketten die Bindung an das Proteasom und verhindert so deren Proteolyse (Lam *et al.*, 1997).

1.1.3 Abbausignale des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus

Als Abbausignale bezeichnet man die Eigenschaften eines Proteins, die zu dessen Destabilisierung beitragen. Hierbei bezeichnet man Sequenzmotive oder strukturelle Eigenschaften, aber auch posttranslationale Modifikationen als primäre Abbausignale, während die Polyubiquitinkette ein sekundäres Abbausignal darstellt, das ein Substratprotein zum Proteasom dirigiert. Trotz der großen Zahl bekannter Substrate, konnten bisher nur wenige primäre Abbausignale identifiziert werden. Eine Ursache könnte die große Zahl verschiedener Abbausignale sein, die durch die Vielfalt verschiedener Kombinationen von E2- und E3-Enzymen erkannt werden kann. Außerdem können Abbausignale sehr komplex sein, d.h., dass mehrere unabhängige Domänen eines Proteins oder die Abbausignale nur unter bestimmten Bedingungen oder in bestimmten Kompartimenten der Zelle erkannt werden können (Dohmen, 2000).

Ein sehr einfaches Abbausignal kann in der N-terminalen Aminosäure eines Proteins bestehen. Mit Hilfe artifizierender Substratproteine konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit eines Proteins direkt von der Art der N-terminalen Aminosäure abhängt (Bachmair *et al.*, 1986; Bachmair und Varshavsky, 1989). Dieser als „N-end rule“ bezeichnete Mechanismus ist sowohl in Bakterien (Tobias *et al.*, 1991) als auch in Eukaryoten von der Hefe bis zum Säuger konserviert (Gonda *et al.*, 1989). Die Substrate der „N-end rule“ werden vom E2-Enzym Ubc2 (Rad6 in Hefe) und vom E3-Enzym Ubr1 (auch N-Recognin genannt) erkannt (Bartel *et al.*, 1990; Dohmen *et al.*, 1991b; Madura *et al.*, 1993). Obwohl der Mechanismus des Proteinabbaus durch den „N-end rule“-Weg sehr gut untersucht ist, war die biologische Funktion lange Zeit unklar, da normalerweise die Entstehung von Proteinen mit destabilisierendem N-Terminus verhindert wird (Dohmen, 2000). Kürzlich konnten jedoch zwei natürliche Substrate identifiziert werden. Das Protein Scc1 in *S. cerevisiae*, eine Untereinheit des Cohesin-Komplexes, der den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden während der Zellteilung gewährleistet (Rao *et al.*, 2001), und das Protein DIAP1 aus *Drosophila melanogaster*, das an der Kontrolle der Apoptose beteiligt ist (Ditzel *et al.*, 2003).

In beiden Fällen wird das Substrat zunächst durch die Aktivität einer Protease (Esp1 im Falle von Scc1 bzw. Caspase im Falle von DIAP1) gespalten. Diese Spaltung der Polypeptidketten führt zur Generierung von Proteinfragmenten, die am N-Terminus destabilisierende Aminosäurereste tragen. Die Entfernung dieser Proteinfragmente durch den „N-end rule“-Weg ist wichtig für eine effiziente Trennung der Schwesterchromatiden in *S. cerevisiae* bzw. für die Auslösung der Apoptose in *D. melanogaster*.

Kurzlebige Proteine enthalten häufig Regionen, die eine hohe Zahl von Prolin (P)-, Glutaminsäure (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-Resten aufweisen. Diese Bereiche werden daher auch als PEST-Sequenzen bezeichnet (Rechsteiner und Rogers, 1996). Das Vorhandensein von Bereichen von mehr als 12 Aminosäuren Länge, die reich sind an PEST-Aminosäureresten, können einen Einfluss auf die Halbwertszeit ausüben. Dabei stellen sie häufig notwendige, aber nicht hinreichende Signale für die Proteolyse dar. In der Nähe müssen geeignete Lysinreste als Akzeptor für die Konjugation mit Ubiquitinketten zur Verfügung stehen. PEST-Sequenzen treten auch in Proteinen auf ohne zu deren Destabilisierung zu führen. So kann es auch sein, dass innerhalb der PEST-Sequenz Serin- oder Threoninreste phosphoryliert werden müssen, um zu einer Erkennung durch die Enzyme des Ubiquitinsystems zu führen. So werden z.B. die Zykline Cln2 und Cln3 vom Zyklin/CDK-Komplex (Cyclin dependent kinase) phosphoryliert und anschließend vom SCF-Komplex ubiquityliert (Tyers *et al.*, 1992; Skowyra *et al.*, 1997).

Im Unterschied zu den G1-Zyklinen besitzen die mitotischen Zykline eine sogenannte „Destruction-Box“ als Abbausignal (Glotzer *et al.*, 1991). Diese umfasst eine neun Aminosäurereste lange N-terminale Sequenz, die für den Abbau dieser Zykline essentiell ist. Die Destruction-Box tritt auch in Proteinen auf, die nicht zu den Zyklinen gehören, z.B. in Pds1. Alle diese Proteine werden vom APC-Komplex erkannt und ubiquityliert (Lim *et al.*, 1998; Hilioti *et al.*, 2001).

Falsch gefaltete Proteine sind ebenfalls Substrate des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus. Man geht davon aus, dass hydrophobe Bereiche, die normalerweise im Inneren des Proteins verborgen sind, erkannt und für den proteasomalen Abbau markiert werden (Goldberg, 2003). Ähnlich zu den falsch gefalteten Proteinen führt die Exposition hydrophober Aminosäurereste einer amphipathischen Helix des Maf2-Proteins zu einem Abbau durch das Proteasom (Hochstrasser und Varshavsky, 1990). In diploiden Zellen wird dieser hydrophobe Bereich durch Bindung an das Maf1-Protein maskiert (Johnson *et al.*,

1998). Amphipathische Helices konnten auch in einer Untersuchung zu synthetischen Abbausignalen für die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse als solche identifiziert werden (Sadis *et al.*, 1995).

1.1.4 Funktionen des Ubiquitin-Systems

Die Hauptfunktion des Ubiquitinsystems liegt in der Markierung von Proteinen für den Abbau durch das Proteasom, indem Ketten von Ubiquitinmolekülen mit einem internen Lysinrest des Substratproteins konjugiert werden. Neben dem Abbau von zytosolischen und nukleären Proteinen wird auch die Entfernung falsch gefalteter Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) vom Ubiquitinsystem durchgeführt (Hiller *et al.*, 1996; Biederer *et al.*, 1997; Kostova und Wolf, 2003). Die Konjugation eines Proteins mit Ubiquitinketten und die anschließende Assoziation mit dem Proteasom müssen jedoch nicht immer zu dessen vollständigem Abbau führen. Für bestimmte Proteine konnte gezeigt werden, dass eine limitierte Proteolyse einen wichtigen Prozessierungsschritt darstellt und in der Freisetzung einer aktivierten Domäne resultiert. So wird in Säugerzellen aus dem 105 kDa (p105) großen Vorläuferprotein des Transkriptionsfaktors NF- κ B1 (Nuclear Factor κ B1) durch limitierte Proteolyse des C-terminus die 50 kDa große reife Form freigesetzt (Lin *et al.*, 1998). In Hefe konnte ein ähnlicher Mechanismus für den Transkriptionsfaktor Spt23 gezeigt werden (Hoppe *et al.*, 2000; Rape *et al.*, 2001). Interessanterweise besitzt Spt23 Homologien zu NF- κ B1 (p105), was auf mechanistische Gemeinsamkeiten in der Prozessierung dieser beiden Proteine hindeutet (Hoppe *et al.*, 2000).

Ubiquitinketten, in denen die Ubiquitinmoleküle über den Lysinrest 48 aneinander gebunden sind, dirigieren das Substratprotein effizient zum Proteasom. Kürzlich konnte jedoch für den Transkriptionsfaktor Met4 gezeigt werden, dass eine Konjugation mit einer Lys₄₈-verknüpften Polyubiquitinkette zwar zur Inaktivierung, jedoch nicht zur Destabilisierung führt (Flick *et al.*, 2004). Die Ursache hierfür ist noch unklar. Es wird spekuliert, dass das Substrat trotz der Ubiquitinkette vom Proteasom nicht gebunden werden kann (Flick *et al.*, 2004; Hochstrasser, 2004).

Neben dem Lysinrest 48 können auch über die Lysinreste 11, 29 und 63 des Ubiquitins Ketten aufgebaut werden (Pickart, 2000; Weissman, 2001). Während Lys₂₉-verknüpfte Ketten das Substratprotein ebenfalls zum Proteasom dirigieren (Koegl *et al.*, 1999), erfüllen Lys₆₃-

verknüpfte Ketten andere, sehr unterschiedliche Funktionen (Pickart, 2000). So spielt die Konjugation mit Lys₆₃-verknüpften Polyubiquitinketten z.B. eine Rolle in der Reparatur von DNA-Schäden (Spence *et al.*, 1995; Ulrich und Jentsch, 2000; Hoegel *et al.*, 2002), in der Funktion der Ribosomen (Spence *et al.*, 2000) und in der Endozytose bestimmter Proteine der Plasmamembran (Galan und Haguenaer-Tsapis, 1997).

Neben der Konjugation mit Ubiquitinketten können Proteine auch mit einzelnen Ubiquitinmolekülen verbunden werden (Hicke, 2001). Auch diese Modifikation führt nicht zum Abbau durch das Proteasom, da nur Ketten mit mindestens vier Ubiquitineinheiten effizient an das Proteasom binden (Thrower *et al.*, 2000). Vielmehr findet hier eine Veränderung des Substratproteins statt, was Auswirkungen auf dessen Interaktion mit anderen zellulären Komponenten hat. Die Monoubiquitylierung beeinflusst z.B. die Genregulation durch Modifikation der Histone H2A und H2B (Robzyk *et al.*, 2000), ist beteiligt an der Endozytose von Membranproteinen und deren Zielsteuerung in die Lysosomen (Hicke und Riezman, 1996; Katzmann *et al.*, 2001) und spielt eine Rolle bei der Freisetzung von Viruspartikeln aus infizierten Zellen (Patnaik *et al.*, 2000).

1.2 Das Proteasom

Wie bereits zu Beginn geschildert, ist das Proteasom das Kernstück des gezielten Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus. Proteasomen können als Partikel mit den Sedimentationskoeffizienten 20S und 26S isoliert werden. Das kleinere Partikel wird daher als 20S-Proteasom bezeichnet, das größere als 26S-Proteasom. Das 20S-Proteasom stellt den katalytischen Kernkomplex dar. Durch Anlagerung von zwei regulatorischen, wegen ihrer Größe auch als 19S-Komplexe oder 19S-Kappen bezeichnete Partikel, wird das 26S-Proteasom gebildet. Die 19S-Komplexe katalysieren die Bindung, Entfaltung und Einführung der Substratproteine in die enzymatisch aktive innere Kammer des 20S-Proteasoms (Bochtler *et al.*, 1999; Voges *et al.*, 1999). Proteasomen wurden zunächst in Eukaryoten entdeckt, später konnten sie auch in Archae- und in Eubakterien nachgewiesen werden. In Eubakterien besitzen jedoch nur Vertreter Gram-positiver Bakterien aus der Gruppe der Actinomycetales ein 20S-Proteasom. Die einfacheren bakteriellen Proteasomen stellen evolutionäre Vorläufer der komplexeren eukaryotischen Formen dar. Die Abwesenheit von Ubiquitin in allen bisher untersuchten Bakterienspezies deutet darauf hin, dass das

Proteasom entwicklungsgeschichtlich älter ist als das erst in den Eukaryoten auftretende Ubiquitin-System. In Bakterien ist das Proteasom nicht überlebenswichtig, während in Eukaryoten von einer Ausnahme abgesehen alle Untereinheiten des 20S-Proteasoms essentiell sind (Knipfer und Shrader, 1997; Voges *et al.*, 1999; Velichutina *et al.*, 2004).

1.2.1 Struktur und Funktion des Proteasoms

Das 20S-Proteasom

Das 20S-Proteasom besitzt eine Masse von ca. 700kDa. Es besteht aus 28 Untereinheiten, die in 4 übereinander gestapelten Ringen mit jeweils 7 Untereinheiten angeordnet sind (Voges *et al.*, 1999). So entsteht eine fassähnliche Struktur von 10nm Durchmesser und 15nm Länge. Die Untereinheiten des α -Typs bilden die äußeren α -Ringe, während die Untereinheiten des β -Typs in den inneren β -Ringen lokalisiert sind. Es ergibt sich somit eine $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Struktur. Die vier Ringe bilden drei höhlenartige Räume aus, jeweils einen zwischen α - und β -Ring und einen zwischen den beiden β -Ringen. Diese 3 Räume sind miteinander und durch Öffnungen an den Enden des Proteasoms mit dem Zyto- oder Nukleoplasma verbunden. Der innere und zugleich größte Hohlraum beherbergt die aktiven Zentren des Proteasoms. Dieser als Selbstkompartimentierung bezeichnete Aufbau ermöglicht eine strikte Kontrolle des Proteinabbaus. Nur Proteine, die zuvor als Substrat erkannt, entfaltet und in das Proteasom eingeführt wurden, werden zu Peptiden gespalten (Baumeister *et al.*, 1998). Archae- und Eubakterien besitzen nur eine oder zwei verschiedene Untereinheiten des α - oder β -Typs. Im Lauf der Evolution entstanden durch Genduplikation und Mutation aus diesen ursprünglichen α - und β -Untereinheiten in Eukaryoten 7 verschiedene α - und 7 verschiedene β -Untereinheiten (Groll *et al.*, 1997; Voges *et al.*, 1999; Gille *et al.*, 2003). Die α - und β -Untereinheiten ähneln sich stark in ihrer Tertiärstruktur. Variable Bereiche finden sich vor allem in N- und C-terminalen Extensionen und in Regionen zwischen konservierten α -Helices und β -Faltblattstrukturen. Diese Unterschiede zwischen den einzelnen Untereinheiten bewirken, dass jede Untereinheit ihren spezifischen Platz im 20S-Proteasom einnehmen kann (Groll *et al.*, 1997). Die N-terminalen Extensionen der α -Untereinheiten besitzen außerdem eine wichtige Funktion in der Regulation der Proteasomaktivität. Im 20S-Proteasom verschließen sie die Öffnungen an den Enden des Komplexes, wobei hier der N-Terminus der

α 3-Untereinheit eine besonders wichtige Rolle spielt. Durch Bindung des 19S-Komplexes werden die N-Termini delokalisiert und geben den Weg in das Innere des Proteasoms frei (Groll *et al.*, 2000).

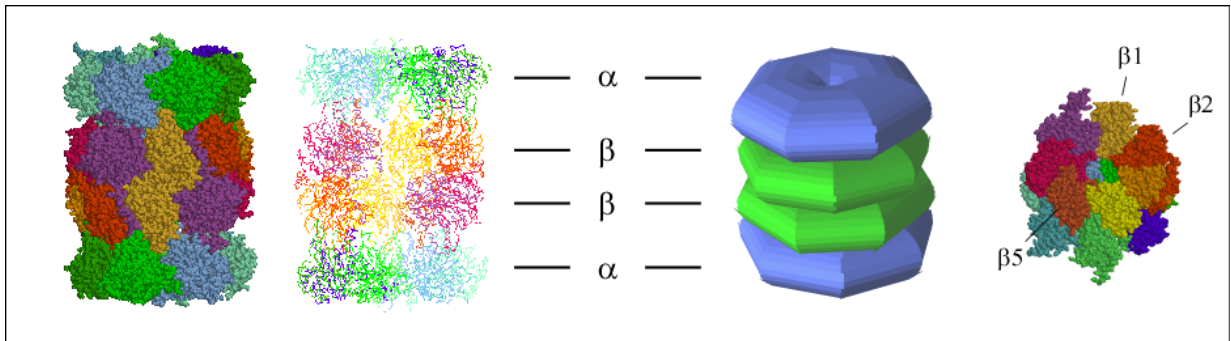


Abb. 2: Das 20S-Proteasom Die Abbildung links zeigt die Kristallstruktur des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae* als raumfüllendes Modell sowie in einer Darstellung, die nur das Peptidrückgrat der Untereinheiten wiedergibt. Rechts daneben ist schematisch der Aufbau des 20S-Komplexes aus α - und β -Ring dargestellt. Die Abbildung ganz rechts zeigt einen Querschnitt durch den inneren Hohlraum des Proteasoms. Die Lage der aktiven β -Untereinheiten ist angegeben und man erkennt die Pore zwischen α - und β -Ring. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Programms RasMol erstellt.

Mutationsanalysen und Röntgenstrukturuntersuchungen zeigten, dass es sich beim Proteasom um einen neuen Typ von Protease handelt. Das katalytische Zentrum wird aus der N-terminalen Aminogruppe und den Seitenketten der Aminosäurereste Thr1, Lys33 und Glu17 (Asp17 in Eukaryoten) gebildet (die Zahlen beziehen sich auf die Reihenfolge der Aminosäurereste in den reifen Formen der aktiven Untereinheiten). Die Hydroxylgruppe des N-terminalen Threoninrestes führt einen nukleophilen Angriff auf das C-Atom einer Peptidbindung des Substratproteins aus, weshalb das Proteasom den sogenannten Ntn (N-terminal nucleophile)-Hydrolasen zugeordnet wird (Voges *et al.*, 1999). Das Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* besitzt 14 aktive β -Untereinheiten, die Peptidbindungen bevorzugt hinter hydrophoben Aminosäureresten spalten. Diese Aktivität wird daher als chymotrypsinähnliche oder chymotryptische Aktivität bezeichnet. In eukaryotischen Proteasomen besitzen insgesamt 6 der 14 β -Untereinheiten katalytische Aktivität (je 3 in einem β -Ring). Neben der chymotryptischen Aktivität, die in der β 5-Untereinheit lokalisiert ist, finden sich in eukaryotischen Proteasomen außerdem eine post-azidische und eine trypsinähnliche (trypische) Aktivität. Sie hydrolysieren Peptidbindungen hinter sauren bzw. basischen Aminosäuren und sind in der β 1- bzw. β 2-Untereinheit

lokalisiert. Eukaryotische Proteasomen werden daher auch als multikatalytische Proteasen bezeichnet (Bochtler *et al.*, 1999; Voges *et al.*, 1999).

Eine Besonderheit weisen die Proteasomen der Vertebraten auf. Als Antwort auf das Zytokin γ -Interferon ($\text{IFN}\gamma$) wird die Synthese zusätzlicher, von Genen im MHC II (Major Histocompatibility Complex class II)-Cluster kodierten, β -Untereinheiten induziert. Der Austausch der Untereinheiten $\beta 1$ (Y/δ), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ ($\text{X}/\text{MB1}$) gegen die induzierten Untereinheiten $\beta 1\text{i}/\text{LMP2}$, $\beta 2\text{i}/\text{MECL1}$ und $\beta 5\text{i}/\text{LMP7}$ führt so zur Bildung der sogenannten Immunoproteasomen, die eine veränderte Spezifität in der Spaltung der Substratproteine aufweisen (Frentzel *et al.*, 1993; Groettrup *et al.*, 1996). Die Bildung von Immunoproteasomen ermöglicht die verstärkte Produktion von Peptiden, die in ihrer Länge und in der Art ihrer endständigen Aminosäurereste für den Transport in das ER durch den Tap-Komplex (Transporter associated with antigen processing) und zur Bindung an MHC I-Moleküle optimiert sind (Kuckelkorn *et al.*, 1995; Rock und Goldberg, 1999). Zusätzlich zu den Immuno-Untereinheiten wird durch $\text{IFN}\gamma$ auch die Bildung von $\text{PA28}\alpha$ und $\text{PA28}\beta$ stimuliert, die sich im PA28-Komplex oder 11S-Regulator zu einem heterohexameren Ring zusammenlagern. Ähnlich dem 19S-Komplex lagert sich der 11S-Komplex an die Enden des Proteasoms an. Er ist allerdings nicht in der Lage, polyubiquitylierte Substratproteine zu binden oder zu entfalten. Seine Funktion besteht vielmehr darin, das Proteasom für Peptide zu öffnen, die dann prozessiert und so für die Antigenpräsentation optimiert werden können.

Das 26S-Proteasom

Das 26S-Proteasom entsteht durch Anlagerung von 19S-Komplexen an die Enden des 20S-Proteasoms. Durch Assoziation mit zwei 19S-Komplexen ergibt sich so eine Gesamtmasse von ca. 2,5MDa. Diese 19S-Regulatorkomplexe, die auch als PA700 bezeichnet werden, sind in ihrer Struktur und Zusammensetzung in allen Eukaryoten konserviert. Sie bestehen aus 18-20 Untereinheiten mit Molekulargewichten zwischen 18 und 110kDa. Jeder 19S-Komplex besitzt insgesamt ein Molekulargewicht von ca. 900kDa. Untersuchungen des 19S-Komplexes von *S. cerevisiae* ergaben, dass er aus zwei funktionellen Subkomplexen aufgebaut ist, die als „Base“ und „Lid“ (engl. für Basis und Deckel) bezeichnet werden. Der „Base“-Komplex, der einen direkten Kontakt zum α -Ring des 20S-Proteasoms besitzt, enthält neun Untereinheiten, wovon sechs ihrer Sequenz nach der Familie der AAA-Proteine

(ATPases associated with various cellular activities) zugeordnet werden. Diese als Rpt1 - Rpt6 (Regulatory particle ATPase) bezeichneten Untereinheiten bilden vermutlich einen ringförmigen Komplex wie er z.B. bei Chaperoninen wie GroEL in *E. coli* oder dem eukaryotischen Cct-Chaperonin bekannt ist. Da die Entfaltung der Substratproteine eine ATP-verbrauchende Reaktion darstellt, wird dies als Hauptfunktion der AAA-Proteine des „Base“-Komplexes angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass der „Base“-Komplex tatsächlich Chaperonaktivität besitzt (Braun *et al.*, 1999). Untersuchungen am homologen archaebakteriellen PAN-Komplex (Proteasom-aktivierende Nukleotidase) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Entfaltung von Proteinen an der Oberfläche dieses ATPase-Komplexes stattfindet (Navon und Goldberg, 2001), und dass neben der Entfaltung auch die Translokation des Substrats in das 20S-Proteasom unter ATP-Verbrauch stattfindet (Benaroudj *et al.*, 2003). Zusätzlich zu den Untereinheiten Rpt1 - Rpt6 enthält der „Base“-Komplex noch die Proteine Rpn1, Rpn2 und Rpn10 (Rpn = Regulatory particle non-ATPase). Rpn10 wird für die Interaktion zwischen „Base“- und „Lid“-Komplex benötigt. Das Fehlen von Rpn10 führt dazu, dass „Base“ und „Lid“ des 19S-Komplexes nur noch sehr schwach mit einander assoziiert sind (Glickman *et al.*, 1998b). Für die Untereinheiten Rpt5 und Rpn10 konnte gezeigt werden, dass sie für die Bindung von Ubiquitinketten benötigt werden (Deveraux *et al.*, 1994; Lam *et al.*, 2002). Sie sind bisher die einzigen Untereinheiten, denen eine solche Funktion zugewiesen werden konnte und stellen somit womöglich die spezifischen Rezeptoren für polyubiquitylierte Substratproteine dar. Die Deletion von *RPN10* ist in *S. cerevisiae* allerdings nicht letal, und der Großteil kurzlebiger Proteine wird unverändert abgebaut (van Nocker *et al.*, 1996; Rubin *et al.*, 1997). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Proteine Rad23 und Dsk2 eine Funktion im Transport polyubiquitylierter Substratproteine zum Proteasom besitzen könnten (Verma *et al.*, 2004). Beide Proteine besitzen Ubl-Domänen (Ubiquitin like), die von Rpn1 gebunden werden (Elsasser *et al.*, 2002). Rad23 und Rpn10 zeigten teilweise redundante Funktionen im Abbau polyubiquitylierter Substratproteine, wobei die Funktionsfähigkeit von Rad23 von der Anwesenheit der N-terminalen VWA (von Willebrand A)-Domäne des Rpn10-Proteins abhängig war. Es zeigten sich jedoch auch deutliche Unterschiede in der Abhängigkeit des Abbaus bestimmter natürlicher Substrate von diesen beiden Proteinen. Die Autoren vermuten, dass Proteine wie Rad23 oder Dsk2, die eine Ubl-Domäne tragen, für die Rekrutierung von Substratproteinen verantwortlich sind, während Rpn10 - neben der direkten Bindung

bestimmter Substrate - generell eine vermittelnde Rolle in der Prozessierung der über Rad23 und Dsk2 zum Proteasom transportierten Substrate zukommt (Verma *et al.*, 2004). Die genaue Rolle der Substraterkennung durch Rpt5 ist noch ungeklärt, es könnte jedoch sein, dass Rpt5 Substrate von Rpn10 oder Rad23 übernimmt, um deren weiteren Transport in das Innere des Proteasoms zu vermitteln.

Die molekulare Funktion des „Lid“-Subkomplexes des 19S-Regulators ist weniger gut verstanden als die des „Base“-Komplexes. In *S. cerevisiae* besteht der „Lid“-Komplex aus den Untereinheiten Rpn3, Rpn5 - Rpn9 und Rpn11 - Rpn13. Die Untereinheiten besitzen starke Homologien zu Untereinheiten des Cop9-Signalosoms, eines Komplexes, der in allen Eukaryoten vorkommt und essentielle Funktion besitzt (Glickman *et al.*, 1998a). Für die Untereinheit Rpn11 des 19S-Komplexes konnte eine Funktion als Ubp nachgewiesen werden (Kap. 1.1.2), während die homologe Untereinheit des Signalosoms, Jab1, eine Funktion in der Abspaltung des Ubiquitin ähnlichen Proteins Nedd8 von der Cullin-Untereinheit des SCF-Komplexes besitzt (Verma *et al.*, 2002; Yao und Cohen, 2002). Die molekularen Funktionen der anderen Untereinheiten sind bisher unklar.

1.2.2 Assemblierung und Reifung des Proteasoms

Die Assemblierung des 20S-Proteasoms

Die Assemblierung und Reifung eukaryotischer Proteasomen ist ein äußerst komplexer Prozess, der aus einer Vielzahl präzise geordneter Einzelschritte besteht. Hierdurch wird sichergestellt, dass jede der 28 Untereinheiten des 20S-Proteasoms ihren definierten Platz einnimmt, und dass durch Anlagerung der regulatorischen 19S-Komplexe ein funktionelles 26S-Proteasom gebildet werden kann.

Auf der Grundlage von Untersuchungen zur Assemblierung und Reifung des Proteasoms aus Archae- und Eubakterien konnten grundsätzlich zwei verschiedene Mechanismen beschrieben werden. Für Proteasomen aus *Rhodococcus spec.*, die zwei verschiedene α - und zwei verschiedene β -Untereinheiten aufweisen, wurde ein Mechanismus beschrieben, wonach zunächst eine Dimerisierung zwischen je einer α - und einer β -Untereinheit stattfindet. Dabei kann jede Kombination der verschiedenen Untereinheiten miteinander auftreten und das Proteasom daher aus unterschiedlichen Zusammensetzungen der α - und β -Untereinheiten aufgebaut sein (Tamura *et al.*, 1995; Zuhl *et al.*, 1997). Die Anlagerung von sieben solcher

Dimere führt zur Bildung von sogenannten Halbproteasomkomplexen, die durch Fusion das Preholoproteasom ausbilden. In diesem sind die β -Untereinheiten noch unprozessiert. Die Propeptide der β -Untereinheiten füllen die innere Kammer des Proteasoms aus. Nach Abspaltung der Propeptide liegt das funktionelle 20S-Proteasom vor (Tamura *et al.*, 1995; Zuhl *et al.*, 1997; Mayr *et al.*, 1998). Für die Assemblierung des Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* konnte gezeigt werden, dass isolierte α -Untereinheiten zur Bildung heptamerer Ringe in der Lage sind, während isolierte β -Untereinheiten dies nicht vermögen (Zwickl *et al.*, 1994). Daraus wurde geschlossen, dass der erste Schritt in der Assemblierung die Bildung dieser α -Ringe ist, an die sich dann die β -Untereinheiten anlagern. Die daraus resultierenden Halbproteasomkomplexe fusionieren anschließend wieder zu Preholoproteasomen, die durch Reifung der β -Untereinheiten die Bildung aktiver Proteasomen abschließen.

Die Assemblierung eukaryotischer Proteasomen scheint analog zur Assemblierung der Proteasomen aus *Thermoplasma* zu verlaufen. Wurde die humane α -Untereinheit C8 (HsC8) heterolog in *E. coli* exprimiert, so konnte die Bildung heptamerer Ringe beobachtet werden. In Anwesenheit benachbarter α -Untereinheiten kam es zur Bildung hetero-oligomerer Ringe (Gerards *et al.*, 1998). Andere Studien zeigten außerdem das Auftreten distinkter Vorläuferkomplexe, die die Hypothese stützen, dass die ersten Assemblierungsschritte durch Bildung von α -Ringen und anschließender Anlagerung der β -Untereinheiten vonstatten gehen (Frentzel *et al.*, 1994; Schmidt und Kloetzel, 1997; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997). In Säugern wurden 13S-Vorläuferkomplexe isoliert, die alle α - und einige β -Untereinheiten beinhalten (Frentzel *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1997). Der Einbau weiterer β -Untereinheiten führt zur Vervollständigung des β -Rings und somit zur Ausbildung von 15S-16S schweren Halbproteasomkomplexen (Nandi *et al.*, 1997; Schmidtke *et al.*, 1997). In 13S- und 15/16S-Komplexen liegen die β -Untereinheiten weitgehend in der Propeptidtragenden Form vor. Erste Prozessierungsschritte finden jedoch bereits im 16S-Komplex statt (Schmidtke *et al.*, 1997). Andere Proteine, die an der Assemblierung beteiligt, jedoch nicht Bestandteil des reifen 20S-Proteasoms sind, sind z.B. Chaperone der Hsp70-Klasse (Schmidtke *et al.*, 1997) oder der Hsp90-Klasse (Imai *et al.*, 2003). Ihre genaue Funktion ist derzeit noch unklar.

Eine besondere Rolle spielt der für das Proteasom spezifische Reifungsfaktor Ump1, der mit unprozessierten β -Untereinheiten interagiert und Bestandteil der 15S-Halbproteasomenkomplexe ist (Ramos *et al.*, 1998; Burri *et al.*, 2000). Er besitzt eine wichtige Funktion in der Reifung der β -Untereinheiten (siehe unten) und beeinflusst die Fusion zweier Halbproteasomen zu Preholoproteasomen.

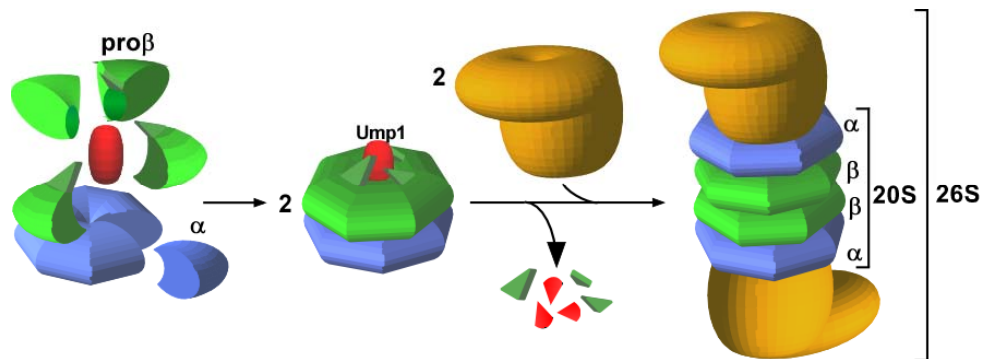


Abb. 3: Modell der Assemblierung des 20S-Proteasoms Neusynthetisierte α -Untereinheiten lagern sich zu einem Ring zusammen, der die Basis für die Anlagerung der β -Untereinheiten darstellt. Die Assoziation aller 7 β -Untereinheiten sowie des Ump1-Proteins mit dem α -Ring führt zur Bildung des 15S- oder Halbproteasomkomplexes. Zwei solcher 15S-Komplexe fusionieren zum 20S-Proteasom, das zusammen mit zwei regulatorischen 19S-Komplexen das 26S-Proteasom ausbildet.

Wie oben beschrieben, besteht der 19S-Komplex aus zwei Subkomplexen, dem „Base“- und dem „Lid“-Komplex (siehe Kap. 1.2.1). Der „Base“-Komplex beinhaltet die sechs ATPasen des AAA-Typs und zusätzlich die Untereinheiten Rpn1, Rpn2 und Rpn10. Der „Lid“-Komplex umfasst die Untereinheiten Rpn3, Rpn5 - Rpn9 und Rpn11 - Rpn13. Über die Schritte, die zur Assemblierung dieser Komplexe führen, und darüber, wie diese reguliert sind, ist zur Zeit nur sehr wenig bekannt. Für die Untereinheit Rpn10 konnte eine Funktion in der Stabilisierung der Interaktion zwischen „Base“- und „Lid“-Subkomplex nachgewiesen werden (Glickman *et al.*, 1998b); siehe Kap. 1.2.1). Kürzlich konnte für die Untereinheiten Rpn5, Rpn6 und Rpn7 gezeigt werden, dass sie für die Assemblierung bzw. die Stabilität des „Lid“-Komplexes von Bedeutung sind (Santamaria *et al.*, 2003; Yen *et al.*, 2003; Isono *et al.*, 2004). In Abwesenheit von Rpn6 häufen sich Komplexe an, die aus dem 20S-Proteasom und dem „Base“-Komplex bestehen (Santamaria *et al.*, 2003). Ähnliches wurde für die Untereinheit Rpn7 beobachtet. Hier konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass in

Abwesenheit von Rpn7 ein Komplex aus Rpn5, 6, 8, 9 und 11 auftritt, der nicht mit dem Proteasom assoziiert ist (Isono *et al.*, 2004).

Die Funktion der Propeptide der β -Untereinheiten

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Hauptfunktion der Propeptide der aktiven Untereinheiten darin besteht, zelluläre Proteine vor der Proteolyse durch vorzeitig aktivierte Proteasomen zu schützen. Obwohl dies möglicherweise eine wichtige Funktion der Propeptide ist, konnten weitergehende Untersuchungen zeigen, dass sie daneben verschiedene Aufgaben in der Assemblierung der Proteasomen übernehmen. So erfüllen die Propeptide im Proteasom aus *Rhodococcus spec.* eine wichtige Funktion in der Faltung und Assemblierung der β -Untereinheiten (Zwickl *et al.*, 1994; Zuhl *et al.*, 1997). Auch für eukaryotische Proteasomen konnte gezeigt werden, dass die Propeptide für den Einbau der β -Untereinheiten in die Halbproteasomvorläuferkomplexe wichtig sind (Chen und Hochstrasser, 1996; Schmidt *et al.*, 1999). Dabei können sie analog zu den Chaperonen auch getrennt vom reifen Teil der Untereinheit (in trans) exprimiert werden und erfüllen auch dann ihre Funktion (Chen und Hochstrasser, 1996). Es bestehen durchaus Unterschiede in der Bedeutung der Propeptide der verschiedenen β -Untereinheiten. Die Deletion des Pre2(β 5)-Propeptids ist normalerweise in der Hefezelle letal, während die Deletion des Pup1(β 2)-Propeptids nur zu verlangsamtem Wachstum und die Deletion des Pre3(β 1)-Propeptids zu keinem detektierbaren Phänotyp führt (Chen und Hochstrasser, 1996; Arendt und Hochstrasser, 1999).

Eine weitere wichtige Funktion der Propeptide ist es, den aktiven Threoninrest vor einer Acetylierung durch die Nat1-Ard1-N ^{α} -Acetyltransferase zu schützen, die zum Verlust der proteolytischen Aktivität führen würde (Arendt und Hochstrasser, 1999; Jager *et al.*, 1999). Die Deletion des *NAT1*-Gens verhindert diese Acetylierung, bewirkt jedoch trotzdem keine Suppression der Defekte der Propeptid-Deletion von Pup1 und Pre2 (Arendt und Hochstrasser, 1999). Dies unterstreicht noch einmal deren Rolle als molekulare Chaperone.

Die Reifung der aktiven β -Untereinheiten

Die Fusion zweier Halbproteasomkomplexe zum Preholoproteasom führt zum Einschluss der Propeptide in der inneren Kammer des Proteasoms. Ein Modell der Proteasomreifung

postuliert, dass hierdurch eine Konformationsänderung der Propeptide bewirkt wird, die letztlich zu deren autokatalytischer Prozessierung führt (Seemuller *et al.*, 1996; Zuhl *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass das Ump1-Protein dabei eine entscheidende Rolle spielt (Ramos *et al.*, 1998). Zusammen mit den Propeptiden der unprozessierten β -Untereinheiten, mit denen es interagiert, wird es im Innern des Preholoproteasoms eingeschlossen. Man nimmt an, dass es hierbei zu einer Veränderung der Struktur oder der Lage des Ump1-Proteins kommt, was wiederum eine Konformationsänderung der Propeptide auslöst (Ramos *et al.*, 1998). Fehlt das Ump1-Protein, so wird nur noch ein geringer Teil der Propeptide prozessiert. Das Ump1-Protein konnte in humanen und murinen Zellen sowie in verschiedenen anderen Organismen wie z.B. dem Zebrafisch (*Danio rerio*), der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) und der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) nachgewiesen werden (Burri *et al.*, 2000; Griffin *et al.*, 2000; Witt *et al.*, 2000; Kruger *et al.*, 2001).

Untersuchungen an ausgewählten Untereinheiten führten zu einem Modell, wonach die Prozessierung dieser Untereinheiten in mehreren Schritten verläuft. Erst kommt es durch benachbarte aktive Untereinheiten zu einer Verkürzung des Propeptids (Schmidtke *et al.*, 1996; Heinemeyer *et al.*, 1997). Anschließend erfolgt dann die „cis“-autokatalytische Abspaltung des verbliebenen Propeptidrestes, die in Analogie zu der von der Untereinheit katalysierten proteolytischen Reaktion verläuft (Schmidtke *et al.*, 1996; Seemuller *et al.*, 1996; Ditzel *et al.*, 1998).

1.2.3 Die Regulation der Menge aktiver Proteasomen

Trotz der Fülle an Informationen über die Struktur und Funktion des Proteasoms, den Weg seiner Assemblierung und die Erkennung und Ubiquitylierung von Substratproteinen, ist die Kontrolle der Menge an Proteasomen bzw. die Steuerung der Expression proteasomaler Gene weitgehend unverstanden. Untersuchungen an Hefezellen, die mutierte Varianten proteasomaler Untereinheiten enthielten, zeigten, dass die Beeinträchtigung der proteasomalen Funktion anscheinend zu einer erhöhten Zahl an Proteasomen in der Zelle führte (Arendt und Hochstrasser, 1997; Ramos *et al.*, 1998); Keck, 1999). In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Menge der Proteasomen in der Zelle als Antwort auf verschiedenste Einflüsse reguliert wird. So konnten Veränderung unter anderem

nach Verbrennungen (Fang *et al.*, 2000), bei Entzündungen (Tiao *et al.*, 1997; Hobler *et al.*, 1999), bei Krebserkrankungen (Williams *et al.*, 1999) oder bei Differenzierungsvorgängen (Macagno *et al.*, 1999) beobachtet werden. In allen diesen Fällen ist der zugrunde liegende Mechanismus jedoch weiterhin unbekannt.

Besser verstanden ist die Regulation der Expression der Ubiquitingene. Während die Expression der Gene *UBI1* - *UBI3* in Hefe im Wesentlichen unveränderlich ist, wird das *UBI4*-Gen als Antwort auf verschiedene Stresssituationen verstärkt exprimiert. Die Expression des *UBI4*-Gens wird als Antwort auf Hitzeschock, beim Eintritt in die stationäre Phase und unter Einfluss verschiedener anderer Stressbedingungen, z.B. nach Auftreten von DNA-Schäden, gezielt induziert (Finley *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1988; Simon *et al.*, 1999). Hierbei sind verschiedene Signalwege an der Expressionskontrolle beteiligt (Watt und Piper, 1997; Simon *et al.*, 1999).

Eine Funktion in der Steuerung der Expression sowohl von proteasomalen Untereinheiten als auch von *UBI4* konnte dem Protein Rpn4 zugeschrieben werden (Mannhaupt *et al.*, 1999). Dieses Protein - auch als Ufd5 oder Son1 bezeichnet (Nelson *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1995) - bindet an sogenannte PACE-Sequenzen (Proteasome Associated Control Element), die in den Promotoren aller Gene der 20S-Proteasomuntereinheiten und in den Promotoren vieler Gene von mit dem Ubiquitin/Proteasom-System assoziierten Proteinen gefunden wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die basale Transkription einzelner Untereinheiten von Rpn4 abhängig ist, und dass hierfür die PACE-Sequenz benötigt wird (Mannhaupt *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Rpn4 auch mit dem Proteasom assoziiert sein kann (Fujimuro *et al.*, 1998).

1.3 Zielsetzung

In der hier dokumentierten Arbeit sollten die beobachtete Autoregulation der Menge an Proteasomen eingehender untersucht und der zugrunde liegende Mechanismus charakterisiert werden. Hierbei standen folgende Fragen im Vordergrund:

1. In welcher Weise ist der Transkriptionsfaktor Rpn4 an der Autoregulation der Menge der Proteasomen beteiligt ?
2. Wie wird das Signal vermittelt, dass bei einem erhöhten Bedarf an proteasomaler Aktivität zu einer Neusynthese proteasomaler Untereinheiten führt ?

Nachdem erste Versuche gezeigt hatten, dass Rpn4 entscheidend an der Regulation der Menge aktiver Proteasomen beteiligt ist, sollte untersucht werden, in welcher Weise Rpn4 reguliert wird, und wie eine Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität zu einer Erhöhung der Rpn4 abhängigen Transkription führt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Derivat von	Referenz/Herkunft
JD47-13C	<i>MATa</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-Δ63</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i>	Ausgangsstamm	Dohmen et al., 1995
JD51	<i>MATa/α</i> , <i>leu2-3,112/leu2-3,112</i> , <i>trp1-Δ63/ trp1-Δ63</i> , <i>his3-Δ200 /his3-Δ200</i> , <i>ura3-52/ ura3-52</i> , <i>lys2-801/ lys2-801</i>	JD47-13C	Dohmen et al., 1995
JD53	<i>MATα</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-Δ63</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i>	JD47-13C	Dohmen et al., 1995
JD59	<i>Mat a</i> , <i>ump1Δ::HIS3</i>	JD47-13C	Ramos et al., 1998
YPH500	<i>Mata</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>trp1-Δ63</i> , <i>his3-D200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2-101</i>	Ausgangsstamm	
JDC2-1	<i>Mata</i> <i>ump2-1 (pup1)</i>	YPH500	Keck, 1999
JDC3-2	<i>Mata</i> <i>ump3-1 (doa4)</i>	YPH500	Keck, 1999
JDC3-11	<i>Mata</i> <i>ump4-1 (pre4)</i>	YPH500	Keck, 1999
JDC8-2	<i>Mata</i> <i>ump5-1 (rpt3)</i>	YPH500	Keck, 1999
JDC9-11	<i>Mata</i> <i>ump1-1</i>	YPH500	Keck, 1999
EJY141	<i>MATα</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-Δ63</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> , <i>rpn4Δ::LEU2</i>	JD51	Johnson et al., 1995
BY4741	<i>Mata</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	BY4741	Euroscarf, Frankfurt
BY4741 <i>yap1Δ</i>	<i>Mata</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> <i>yap1Δ::kan-MX4</i>	BY4741	Euroscarf Stammsammlung
BY4741 <i>ssz1Δ</i>	<i>Mata</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> <i>ssz1Δ::kan-MX4</i>	BY4741	Euroscarf Stammsammlung
BY4741 <i>rpn4Δ</i>	<i>Mata</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> <i>rpn4Δ::kan-MX4</i>	BY4741	Euroscarf Stammsammlung
ML3	<i>MATa/α</i> , <i>leu2-3,112/leu2-3,112</i> , <i>trp1-Δ63/ trp1-Δ63</i> , <i>his3-Δ200 /his3-Δ200</i> , <i>ura3-52/ ura3-52</i> , <i>lys2-801/ lys2-801</i> , <i>UMP1/ump1Δ::HIS3</i> , <i>RPN4/rpn4Δ::LEU2</i>	JD59 X EJY141	diese Arbeit
ML4	<i>Mata</i> , <i>rpn4Δ::HIS3-MX6</i>	JD47	diese Arbeit
ML5	<i>Mata</i> , <i>rpn4Δ::HIS3-MX6</i>	YPH500	diese Arbeit
ML6	<i>Mata</i> , <i>ump2-1 (pup1)</i> , <i>rpn4Δ::HIS3-MX6</i>	JDC2-1	diese Arbeit
ML7	<i>Mata</i> , <i>ump4-1 (pre4)</i> , <i>rpn4Δ::HIS3-MX6</i>	JDC3-11	diese Arbeit
ML16	<i>Mata</i> , <i>ump1-1</i> , <i>RPN4-3xha::HIS3-MX6</i>	JDC9-11	diese Arbeit
ML26-1B	<i>Mata</i> , <i>RPN4-3xha::HIS3-MX6</i>	YPH499 X ML16	diese Arbeit
ML26-2B	<i>Mata</i> , <i>RPN4-3xha::HIS3-MX6</i>	YPH499 X ML16	diese Arbeit
ML29	<i>Mata</i> , <i>ump2-1 (pup1)</i> , <i>RPN4-3xha::HIS3-MX6</i>	JDC2-1	diese Arbeit
ML30	<i>Mata</i> , <i>ump3-1 (doa4)</i> , <i>RPN4-3xha::HIS3-MX6</i>	JDC3-2	diese Arbeit
ML31	<i>Mata</i> , <i>ump4-1 (pre4)</i> , <i>RPN4-3xha::HIS3-MX6</i>	JDC3-11	diese Arbeit
ML32	<i>Mata</i> , <i>ump5-1 (rpt3)</i> , <i>RPN4-3xha::HIS3-MX6</i>	JDC8-2	diese Arbeit
ML72	<i>yap1Δ::kan-MX4</i> , <i>rpn4Δ::HIS3-MX6</i>	BY4741 <i>yap1Δ</i>	diese Arbeit
ML76	<i>Mata</i> , <i>ump3-1 (doa4)</i> , <i>rpn4Δ::HIS3-MX6</i>	JDC3-2	diese Arbeit
ML80	<i>Mata</i> , <i>RPN4-3xha::HIS3-MX6</i> , <i>pdr5Δ::kan-MX4</i>	ML26-2B	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Derivat von	Referenz/Herkunft
ML81	<i>Mata/α, RPN4-3xha::HIS3-MX6, RPN4-13xmyc::HIS3-MX6</i>	ML26-2B X ML75	diese Arbeit
ML82	<i>MATα, leu2-3,112, trp1-Δ63, his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, LEU2::pML139</i>	JD47	diese Arbeit
ML83	<i>MATα, leu2-3,112, trp1-Δ63, his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, LEU2::pML139</i>	JD53	diese Arbeit
ML84	<i>ssz1Δ::kan-MX4, rpn4Δ::HIS3-MX6</i>	BY4741 <i>ssz1Δ</i>	diese Arbeit

2.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
XL1-Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi1, relA1, lac⁻, proAB⁺, lacIq, lacZΔM15, tn10(tetr)</i>	Stratagene, San Diego, USA

2.1.3 *Escherichia coli*-Klonierungsvektoren

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pUC19	enthält Resistenzgen gegen Ampicillin (kodiert für β-Lactamase), Möglichkeit der Blau-Weiß-Selektion durch α-Komplementation	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)
pBluescriptSK+	wie pUC19	Stratagene, San Diego, USA

2.1.4 *Saccharomyces cerevisiae*-Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Funktion	Quelle
YCplac111	<i>CEN4/ARS1, LEU2</i>	Basisvektor	Gietz und Sugino, 1988
YIplac128	<i>LEU2</i>	Basisvektor	Gietz und Sugino, 1988
Yeplac181	2μ-Vektor, <i>LEU2</i>	Basisvektor	Gietz und Sugino, 1988
pBA2	<i>P_{CUP1}-UBI-Met-URA3-T_{CYC1}</i>	kodiert für stabiles Met-Ura3	Beth Andrews
pBA3	<i>P_{CUP1}-UBI-Arg-URA3-T_{CYC1}</i>	kodiert für instabiles Arg-Ura3	Beth Andrews
pFA6a-HIS3-MX6	<i>P_{TEF}-his5-T_{TEF}</i>	Disruptionskassette, enthält <i>S.pombe his5</i> -Gen	Longtine <i>et al.</i> , 1998

Plasmid	Beschreibung	Funktion	Quelle
pJD531	<i>CEN,TRP1</i> , <i>P_{CUP1}-UBC2-Ub-Arg-e^K-ha</i> - <i>HIS3-T_{CYC1}</i>	Exp. von <i>RPN4-2xha</i> unter Kontrolle des <i>CUP1</i> -Promotors	diese Arbeit
pML112	<i>2μ, LEU2</i> , <i>P_{CUP1}-RPN4-ha₂-T_{CYC1}</i>	Exp. von <i>RPN4-2xha</i> unter Kontrolle des <i>CUP1</i> -Promotors	diese Arbeit
pML114	<i>CEN/ARS1,LEU2</i> <i>P_{RPN4}-RPN4-ha₂-T_{CYC1}</i>	Exp. von <i>RPN4-2xha</i> unter Kontrolle des <i>RPN4</i> -Promotors	diese Arbeit
pML139	<i>LEU2</i> , <i>P_{CUP1}-RPN4-e^K-ha₂-URA3</i> - <i>T_{CYC1}</i>	integratives Plasmid (aus Yiplac128) zur Expression von <i>RPN4-e^K-ha₂-URA3</i>	diese Arbeit
pML146	<i>CEN4/ARS1, LEU2</i> , <i>P_{CUP1}-RPN4-e^K-ha₂-URA3</i> - <i>T_{CYC1}</i>	Exp. von <i>RPN4-e^K-ha₂-URA3</i>	diese Arbeit
pML152	<i>2μ, LEU2</i> , <i>P_{CUP1}-Flag-6HIS-RPN4-ha₂</i> - <i>T_{CYC1}</i>	Exp. von <i>Flag-6His-RPN4</i> - <i>2xha</i> unter Kontrolle des <i>CUP1</i> -Promotors	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Beschreibung
JD860	5'-AATAGCTAATTTGTATCTTTTCAAAGTTTT CTAGAATTTTCAAGCAATCcggatccccgggtaattaa	F1-Oligo zur Deletion von <i>RPN4</i> nach Longtine et al., 1998
JD861	5'-TTTTGTGTGAGGTTTTCTTCTTTTATCTCCTA TATAATTTGTAACCTTAAgaattcgagctcgtttaactgg	R1-Oligo zur Deletion von <i>RPN4</i> nach Longtine et al., 1998
JD862	5'-CGTCAAGAAGTTACAAAATTTGCAAAGGCT AATATTGGTTATGTCATGGGTcggatccccgggtaatt aac	F2-Oligo zur integrativen Epitopmarkierung von <i>RPN4</i> nach Longtine et al., 1998
JD863	5'-gcggaagcttGAGATATACGGGCAAATATTGGG	5'-HinDIII- <i>RPN4</i> -Promotor (-1020)
JD864	5'-gcggtaccCATGCCTGATTGTGGGCCATGG	5'-Asp718- <i>RPN4</i> -Terminator (+400)
JD903	5'-CCTCAGTGGCAAATCCTAAC	bindet in <i>S.pombe his5</i> -Gen in Richtung 5'-Ende, zur Überprüfung der Integration
ML912	5'-cgcaattcATGGCTTCTACGGAACCTTAGC	5'-EcoRI- <i>RPN4</i> -ORF
ML913	5'-cgcggtaccACCATGACATAACCAATATTAG	5'-Asp718- <i>RPN4</i> -ORF-3'-Ende (ohne Stop-Codon)
ML914	5'-GACCCAACAGACCATAGAAACG-3'	<i>RPN4</i> -Terminator (+1000)
ML1211	5'-cgcggtacctggagcttgctgttggccc-3'	bindet 5'- <i>e^K-ha-URA3</i> aus pBA2
ML1212	5'-gcgctgcaggaaatcattacgaccgagattc-3'	5'-PstI- <i>URA3</i> -Term.-3'-Ende
MM1172	5'-gatataggccagcaaccg-3'	Sequenzierung in YEp13 (5'-3')
MM1173	5'-cctgctcgtctgctacttgg-3'	Sequenzierung in YEp13 (3'-5')

2.1.6 Enzyme und Antikörper

β - Glukuronidase (aus <i>Helix pomatia</i>)	Roche
Taq/Pwo DNA Polymerase	Roche
Klenow-Polymerase	Roche
Restriktionsendonukleasen	NEB, Beverly, USA
T4-DNA-Ligase	NEB, Beverly, USA
T4-DNA-Polymerase	NEB, Beverly, USA
Lyticase	Sigma, USA
16B12 Anti-HA Antikörper (Maus)	BAbCO, Berkeley, USA
3F10, Anti-HA Antikörper (Ratte)	Roche
Anti-Maus-IgG-AK (Peroxidase gekoppelt)	Dianova, Hamburg
Anti-Ratte-IgG-AK (Peroxidase gekoppelt)	Acris Antibodies, Hiddenhausen

2.1.7 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. Sie wurden bezogen von Affinit (Exeter, England), Amersham-Pharmacia (Uppsala, Schweden), Baker (Deventer, Niederlande), Becton-Dickinson (Heidelberg), BioRad (München), Calbiochem (Bad Soden), Gibco (Paisley, Schottland), Merck (Darmstadt), Oxoid (Hampshire, England), Roth (Karlsruhe), und Sigma-Aldrich (München).

2.2 Methoden

2.2.1 Medien zur Anzucht von Bakterien und Hefen

Medien zur Aufzucht von *Saccharomyces cerevisiae*:

Vollmedium YPD:	1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Glukose
Vollmedium YPG:	1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Galaktose
Minimalmedium SD:	6,7g/l Hefestickstoffbasis ohne Aminosäuren, 2% Glukose
Je nach Selektion wurden zugegeben:	20mg/l Arginin, 10mg/l Histidin, 60mg/l Isoleucin, 60mg/l Leucin, 40mg/l Lysin, 10mg/l Methionin, 60mg/l Phenyl- alanin, 50mg/l Threonin, 40mg/l Tryptophan, 40mg/l Uracil, 20mg/l Adenin
Minimalmedium SG:	wie SD mit 2% Galaktose statt Glukose

Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar.

Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte die Aufzucht von Hefen bei 30°C.

Medien zur Aufzucht von *Escherichia coli*:

LB-Medium:	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl
SOC-Medium:	2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 20mM Glukose, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , pH 7,5

Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar. Bei Bedarf wurde dem Medium 50mg/l Ampicillin und 0,008% X-Gal (Stocklösung: 2% in DMF) zugesetzt. Die Aufzucht erfolgte bei 37°C.

2.2.2 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen in H₂O wurden entweder im ethidiumbromidgefärbten Agarosegel durch Vergleich mit einem Standard oder photometrisch durch Messung der Absorption bei 260nm ermittelt. Eine Absorption von 1 bei 260nm entspricht 50µg/ml doppelsträngiger DNA, und 40µg/ml für einzelsträngige DNA und RNA. Der Quotient aus A₂₆₀ und A₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure, er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.2.2 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Die Restriktion von DNA mittels Endonukleasen erfolgte nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des mitgelieferten Reaktionspuffers für 1-2 Stunden.

2.2.2.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese

Lösungen:

TAE-Puffer: 0,04 M Tris-HCl, pH
 17,5 % Essigsäure
 0,01 M EDTA (aus Stammlösung, pH 8,0)

6fach Auftragungspuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
 0,25 % (w/v) Xylencyanol
 15 % (w/v) Ficoll (Typ 400)

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8-1,5%igen TAE-Agarosegelen. Größe und Menge der aufgetrennten DNA wurde durch Vergleich der Ethidiumbromid-Anfärbbarkeit mit einem Standard ermittelt (1µg *EcoRI/HinDIII*-restringierte doppelsträngige DNA des Phagen Lambda). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (312nm) sichtbar gemacht und

fotografiert. Die Gelstücke mit den entsprechenden Banden wurden dann mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten.

2.2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das „QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN oder das „Nucleospin Extract Kit“ der Firma Macherey und Nagel benutzt. Es wurde nach den Angaben der Hersteller verfahren.

2.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden T4-DNA-Ligase und Reaktionspuffer der Firmen Gibco-BRL oder NEB benutzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C oder 1std bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.2.6 DNA-Amplifikation mit der Polymerasekettenreaktion nach Mullis *et al.* (1986)

Zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung des „High Fidelity Kit“ der Firma Roche durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

<u>Ansatz:</u>	1	µl Plasmid-DNA (50ng)
	1	µl Oligonukleotid 1 (100pmol/µl)
	1	µl Oligonukleotid 2 (100pmol/µl)
	10	µl 10fach Reaktionspuffer vom Hersteller mitgeliefert
	4	µl MgCl ₂ -Lösung (25mM)
	3,5	µl Desoxynukleotidmix (je 10mM)
	1	µl Polymerasemix (<i>Taq</i> - und <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase)
	79,5	µl H ₂ O
	<hr/>	
	100	µl Gesamtvolumen

Üblicherweise verlief eine PCR wie folgt:

<u>Reaktion:</u>	1. Denaturierung	3 min	92°C
	2. Denaturierung	30 sek	92°C
	3. Hybridisierung	40 sek	55°C
	4. Elongation	1 min	72°C (ca. 1min pro 1000 Basen)

Die Schritte 2 - 4 wurden dann 25 mal wiederholt.

5. Polymerisation 5 min 72°C (zur Auffüllung unvollständiger Reaktionen)

Zur Isolierung der PCR-Produkte aus dem Reaktionsgemisch wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN benutzt, wobei die Angaben des Herstellers befolgt wurden (QIAGEN, Hilden).

2.2.2.7 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von *Escherichia coli*

Diese Methode stellt eine Abwandlung der Methode nach Hanahan (1985) dar.

Lösungen:

TfB1-Lösung 30 mM Kaliumacetat
 50 mM MnCl₂
 100 mM KCl
 10 mM CaCl₂
 15 % Glycerin
steril filtrieren

TfB2-Lösung 10 mM Mops (pH 6,8 mit NaOH einstellen)
 10 mM KCl
 75 mM CaCl₂
 15 % Glycerin
steril filtrieren

100ml LB-Medium wurden mit *E. coli*-Zellen einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 herangezogen. Der Kolben wurde dann auf Eis schnell herabgekühlt. Bei allen folgenden Schritten wurden die Zellen immer auf Eis gekühlt. Durch 5min Zentrifugation bei 4°C und 5000g wurden die Zellen geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 20ml TfB1 resuspendiert und 5min auf Eis inkubiert. Durch 5min Zentrifugation bei 4°C und 5000g wurden die Zellen erneut pelletiert und anschließend in 2ml TfB2 resuspendiert. Es wurden dann Aliquots von 100µl in Eppendorfgefäße pipettiert, bei -80°C gefroren und bis zur Verwendung gelagert.

Transformation:

Ein Aliquot (150µl) tiefgefrorener, kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und sofort zur Transformation eingesetzt. Nach Zugabe der Plasmid-DNA wurden die Zellen 60min auf Eis inkubiert und anschließend für 45sek bis 2min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium wurden die Zellen 1 Stunde bei 37°C inkubiert, um das plasmidkodierte Resistenzgen zu exprimieren. Die Zellen wurden 1min bei 15.800g abzentrifugiert, auf LB-Platten mit 50µg Ampicillin pro ml ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde das „Plasmid Mini Kit“ der Firma QIAGEN benutzt. Zur Aufreinigung großer Mengen an Plasmid-DNA wurde das „Plasmid Midi Kit“ derselben Firma eingesetzt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren (QIAGEN, Hilden).

2.2.2.9 Herstellung und Transformation kompetenter Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*

Gefrierkompetente Zellen nach Dohmen *et al.*(1991b):

Lösung A: 1 M Sorbitol
 10 mM Bicin pH 8,35
 3 % (w/v) Ethylenglykol
 5 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)

Lösung B: 40 % (w/v) PEG 1000
 200mM Bicin pH 8,35

Lösung C: 150mM NaCl
 10 mM Bicin pH 8,35

Die Zellen wurden in 100ml YPD bis zu einer Zelldichte von 0,4-0,8 OD₆₀₀ herangezogen, abzentrifugiert (2000rpm, 5min) und mit 50ml Lösung A gewaschen. Nach erneuter

Zentrifugation und Resuspendierung in 2ml Lösung A wurden Aliquots von 200µl bei -80°C eingefroren und bis zum Gebrauch gelagert.

Zu einem Aliquot kompetenter Hefezellen wurden 0,1 - 5 µg Plasmid-DNA und 5µl (10mg/ml) einzelsträngige Kalbsthymus-DNA gegeben. Die Zellen wurden dann 5min bei 37°C geschüttelt und mit 1ml Lösung B 1std bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation (3000rpm, 5min) wurden die Zellen mit 1ml Lösung C gewaschen, abzentrifugiert, in 150µl Lösung C aufgenommen und auf selektivem Medium ausplattiert.

Lithium-Acetat/ss-DNA/PEG-Transformation nach Gietz und Schiestl (1995):

Die Lithium-Acetat-Transformation wurde durchgeführt, wenn eine hohe Effizienz, d.h. eine große Zahl an Transformanten benötigt wurde. 50ml Medium wurden mit Zellen aus einer 5ml Übernachtskultur zu einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Nach Aufzucht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-0,9 wurden die Zellen 5min bei 3000g zentrifugiert, mit 25ml sterilem H₂O gewaschen und in 1ml 100mM LiAc aufgenommen. Nach Überführung in ein Eppendorf-Gefäß und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 500µl 100mM LiAc resuspendiert und in Aliquots von 50µl aufgeteilt. Die Zellen wurden erneut sedimentiert und auf das Pellet wurden 240µl PEG3350 (w/v), 36µl 1M LiAc, 5µl denaturierte Kalbsthymus-DNA (10mg/ml) und 0,1 bis 10µg DNA in 70µl H₂O pipettiert. Der Ansatz wurde durch 1min starkes vortexen vermischt und 30min bei 30°C inkubiert. Nach 25min bei 42°C wurden die Zellen pelletiert (2min, 8000upm in einer Eppendorf-Zentrifuge) mit 1ml sterilem Wasser gewaschen und auf Selektivmedium ausplattiert. Kolonien aus transformierten Zellen konnten nach 2-4 Tagen bei 30°C isoliert werden.

2.2.2.10 Plasmid-Präparation aus *Saccharomyces cerevisiae* nach Robzyk *et al.* (1992)

Lösungen:

STET	8 %	Saccharose
	50 mM	Tris-Cl pH 8,0
	50 mM	EDTA
	5 %	Triton-X 100

10mM Tris-Cl pH 8,5

Zellen aus 3ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert, mit Wasser gewaschen und in 100µl STET-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen (\varnothing 0,45mm) bis unter den Meniskus wurden die Zellen 5min in einem IKA-Vibrax-VXR (Janke und Kunkel) geschüttelt. Die Suspension wurde nach erneuter Zugabe von 100µl STET-Lösung 3min bei 95°C inkubiert, 10min auf Eis gekühlt und 10min bei 4°C und 15.800g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit der Hälfte des Volumens 7,5M NH₄-Acetat versetzt und 1std bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation (10min, 4°C, 15.800g) wurden 100µl des Überstandes abgenommen, mit dem zweifachen Volumen 96% Ethanol gefällt. Das Pellet wurde nach erneuter Zentrifugation mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl Tris-Cl, pH 8,5, aufgenommen. 10µl dieser Lösung wurden zur Transformation von *E.coli* verwendet.

2.2.2.11 Präparation genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* nach Rose et al., 1990

Zellen aus 5ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (10sek. 15.000g) und in 500µl 1M Sorbitol, 0,1M EDTA pH7,5 resuspendiert. Nach Zugabe von 0,25mg/ml Lyticase (Sigma) wurde für 1std bei 37°C inkubiert. Die sphäroplastierte Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (15sek 15.000g) und in 500µl 50mM Tris-Cl (pH 7,4), 20mM EDTA resuspendiert. Nach Zugabe von 50µl 10% SDS erfolgte eine Inkubation für 30min bei 65°C. Die Proteine wurden durch Zugabe von 200µl 5M Kaliumacetatlösung für 1std auf Eis ausgefällt und anschließend für 5min bei 18.000g abzentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 700µl Isopropanol aus dem Überstand ausgefällt und durch Zentrifugation (5min 18.000g) pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 100µl 10mM Tris-Cl (pH 8,5).

Auftragungspuffer:	504	µl	deionisiertes Formamid
	105	µl	10x MOPS-Puffer
	182	µl	Formaldehyd
	149	µl	75% Glycerin
	110	µl	H ₂ O
			+ kleine Spatelspitze Bromphenolblau
Laufpuffer:	100	ml	10x MOPS Puffer
	20	ml	37% Formaldehyd
ad	1	l	RNase-freies H ₂ O
20x SSPE:	3	M	NaCl
	200	mM	NaH ₂ PO ₄
			pH 7,0
5x Denhardt´s:	0,1	%	Ficoll (Typ 400)
	0,1	%	Polyvinylpyrrolidon (Sigma, Mw 360.000)
	0,1	%	BSA (Fraktion V)

als 100x Stocklösung vorbereiten und steril filtrieren.

Hybridisierungslösung:	50	%	Formamid
	5x		SSPE
	5x		Denhardt´s
	1	%	SDS
	10	%	Dextransulfat

Isolierung und Auftrennung der RNA:

Zur Isolierung der RNA wurden Zellen aus 20ml einer exponentiell wachsenden Kultur in YPD- oder SD-Medium abzentrifugiert und mit 2ml H₂O gewaschen. Die Zellen wurden in 400µl TES-Puffer resuspendiert, mit 400µl Phenol vermischt und 3min bei 65°C und 5min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (18.000g, 4°C, 10min) und der wässrige Überstand einmal mit Phenol und einmal mit Chloroform gewaschen. Die RNA wurde durch Zugabe von 40µl RNase-freier Natriumacetatlösung (3M, pH 5,5) und 1ml 96% Ethanol für 2h bei -20°C präzipitiert. Die RNA wurde anschließend pelletiert (18.000g, 4°C, 10min), mit 70% Ethanol gewaschen und in RNase-freiem H₂O resuspendiert. Um eine größere Reinheit der RNA zu erhalten, wurde das „RNeasy Kit“ der Firma QIAGEN benutzt. Es wurde nach dem Protokoll für „RNA clean-up“ verfahren. Eine Probe der RNA-Präparation wurde zur Bestimmung der RNA-Konzentration eingesetzt.

Northern-Blot und Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde:

15-20µg Gesamt-RNA wurden in einem Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt. Zur Dokumentation wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht in Transferpuffer auf eine Nylon-Membran (Hybond N, Amersham). Nach Abbau des Blots wurde die RNA für 3min mit UV-Licht auf der Membran fixiert und 2std bei 80°C gebacken. Zur Blockierung der Membran wurde diese für 2-3std mit Hybridisierungslösung +100µg/ml Heringsperma-DNA inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde (siehe unten) in 10ml Hybridisierungslösung zugegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Die Membran wurde dann 2x 15min mit 2x SSPE bei Raumtemperatur, 2x 45 min mit 2x SSPE + 2% SDS bei 64°C und 2x 15min mit 0,1x SSPE bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Dokumentation wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Bio-Imaging Analyzer BAS 1500 der Firma Fuji.

Radioaktive Markierung einer DNA-Sonde:

25ng zu markierende DNA wurden durch Erhitzen auf 95°C für 10min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Es wurden 3µl dNTP-Mischung, 2µl Hexanukleotid-Mix und 50µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP zugegeben. Der Ansatz wurde mit sterilem H₂O auf 19µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1µl Klenow-Enzym (=2U) wurde der Ansatz 1std bei 37°C inkubiert. Die markierte DNA wurde anschließend durch Verwendung eines „Mini Quickspin Oligo Purification“-Säulchens der Firma Roche aufgereinigt und vor der Verwendung durch Erhitzen auf 95°C für 5min denaturiert.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 800µl in Wasser verdünnte Probe mit 200µl Bradford-Reagenz vermischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Der im Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff „Coomassie brilliant blue“ verschiebt sein Absorptionsmaximum durch Anlagerung an Proteine von 465nm auf 595nm. Die Absorption wurde bei 595nm photometrisch bestimmt, geeicht wurde mit einer BSA-Stammlösung.

2.2.3.2 Herstellung von zellfreien Proteinrohextrakten aus *S. cerevisiae*

Lysis Puffer	50 mM	HEPES pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 %	(v/v) Triton-X-100
	5 mM	EDTA

vor der Verwendung wurden zugegeben:

„Complete Mini“ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
20µmol/l Proteasominhibitor MG132 (Affiniti)

Zur Gewinnung der Rohextrakte wurden 5-50ml einer exponentiell wachsenden Kultur ($OD_{600} = 0,8-1,2$) abzentrifugiert (5min, 2000upm, Beckman GS-6K), mit H₂O gewaschen und in 150µl Lysis-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von Glasperlen bis unter den Meniskus erfolgte der Aufschluss durch 3x 1min heftiges Schütteln auf einem IKA-Vibrax-VXR (Janke und Kunkel), zwischendurch wurde je 1min auf Eis gekühlt. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10min, 4°C, 15.800g) pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (1970)

Lösungen:

Gel-Lösungen:

1 M	Tris pH 6,8
1,5 M	Tris pH 8,8
30 % (w/v)	Acrylamid / 2 % (w/v) Bisacrylamid
10 % (w/v)	APS
10 % (w/v)	SDS
	TEMED

Lämmli-Laufpuffer (LRB):

25 mM	Tris pH 8,3
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

Lämmli-Auftragungspuffer:

125 mM	Tris pH 6,8
10 %	β-Mercaptoethanol
4 % (w/v)	SDS
20 % (w/v)	Glyzerin
0,04 % (w/v)	Bromphenolblau

Das Trenngel (15ml) wurde wie folgt hergestellt:

Prozent	6	7	8	10	12
H ₂ O	8,1ml	7,6ml	7,1ml	6,1ml	5,1ml
1,5M Tris-Cl, pH 8,8	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml	3,75ml
Acrylamidlösung	3ml	3,5ml	4ml	5ml	6ml
10% SDS	150µl	150µl	150µl	150µl	150µl
10% APS	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
TEMED	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl

Das Sammelgel (5ml) wurde wie folgt hergestellt:

Prozent	3
H ₂ O	3,66ml
1M Tris-Cl, pH 6,8	625µl
Acrylamidlösung	650µl
10% SDS	50µl
10% APS	10µl
TEMED	5µl

Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet und für ca. 30min auspolymerisiert. Das Isopropanol wurde abgenommen, die Geloberfläche mit H₂O nachgespült, das Sammelgel gegossen und der taschenbildende Kamm eingeführt. Die verwendeten Apparaturen stammten entweder von der Firma Hoefer Scientific (San Francisco, USA) oder von der Firma BioRad (München).

20-40µg Protein wurden mit Auftragungspuffer versetzt und 5min bei 100°C inkubiert, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Durch das SDS und das β-Mercaptoethanol werden die Proteine denaturiert. Das SDS lagert sich an die Polypeptidketten an. Es entsteht ein negativ geladener Komplex, dessen Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dem Logarithmus der Masse des Proteins annähernd proportional.

2.2.3.4 Nachweis von Proteinen durch Western-Blot

Lösungen:

Transfer-Puffer: 25 mM Tris pH 8,3
 190 mM Glycin
 20 % (v/v) Methanol
 0,1 % (w/v) SDS

PBS: 8 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1,44 g/l Na₂HPO₄
 0,24 g/l KH₂PO₄
 pH 7,4

PBST: PBS + 0,1% Tween-20

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine durch Semi-Dry-Blotting aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Milipore) übertragen. Der Transfer wurde in Transferpuffer bei 240mA für eine Stunde durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde erst durch Schwenken in Methanol angefeuchtet und dann in Transferpuffer geschwenkt. Nach dem Transfer wurde die Membran 30min gekocht und anschließend 1std in Blockinglösung (3% Milchpulver in PBST) inkubiert. Die Membran wurde dann 1std mit dem 1.-Antikörper (1:2000-1:5000 verdünnt in Blockinglösung) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3x 10min waschen in PBST wurde der 2.-Antikörper (Peroxidase gekoppelt) ebenfalls 1:2000-1:5000 in Blockinglösung verdünnt zugegeben und 1std bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3x Waschen für je 10min in PBST wurde die Membran 1min in PBS gewaschen und anschließend in „Lumi-Light-Plus Western Blotting“ Chemilumineszenz-Lösung inkubiert (Roche). Das Ergebnis wurde auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

2.2.3.5 Fraktionierung von Proteinrohextrakten durch Gelfiltration nach Ramos *et al.* (1998)

Exponentiell wachsende Kulturen von Hefezellen in YPD- oder SD-Medium ($OD_{600} = 0,8-1,2$) wurden bei 5000g abzentrifugiert, einmal mit H₂O gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Die Extraktion der Proteine erfolgte durch Zerreiben der gefrorenen Zellen in einem Mörser unter ständiger Kühlung

durch flüssigen Stickstoff. Das gefrorene Zellpulver wurde in Extraktionspuffer (50mM Tris-Cl pH 7,5; 2mM ATP; 5mM MgCl₂; 1mM DTT; 15% Glycerin) resuspendiert. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (18.000g, 4°C, 10min). Der Überstand wurde einer weiteren Zentrifugation unterzogen (60.000g, 4°C, 30min) und in dem daraus gewonnenen Überstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde durch Zugabe von Extraktionspuffer auf 5mg/ml eingestellt. Eine Probe des Extrakts wurde durch Filtration (Millipore Amicon Ultrafree-MC 0,45µm Porendurchmesser, 18.000g, 4°C; 1min) nochmals von unlöslichen Bestandteilen gereinigt. Zur Gelfiltration wurden 200µl (1mg Protein) eingesetzt. Sie erfolgte in einer mit Extraktionspuffer equilibrierten Superose-Säule (Superose 6 HR 10/30) der Firma Amersham-Pharmacia unter Benutzung der Äkta-FPLC-Anlage derselben Firma. Die Geschwindigkeit der Gelfiltration betrug 0,3ml/min und es wurden Fraktionen von 0,6ml Volumen gesammelt. Die Fraktionen 13-30 wurden zur Analyse der Proteine durch SDS-PAGE und Western-Blot und zur Bestimmung der proteasomalen Aktivität verwendet.

2.2.3.6 Bestimmung der chymotryptischen Aktivität des Proteasoms

Zur Messung der für die Pre2 (β5)-Untereinheit spezifischen chymotryptischen Aktivität wurde das Substrat Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Affiniti, Exeter, England) eingesetzt. Die Pre2-Untereinheit spaltet das Substrat hinter dem Tyrosinrest und führt zur Freisetzung des fluoreszierenden Amido-4-methylcoumarins. In einer Mikrotiterplatte wurden je 20µl aus einer Fraktion einer Gelfiltration oder 5µg aus einem zellfreien Rohextrakt auf 80µl mit Extraktionspuffer (50mM Tris-Cl pH 7,5; 2mM ATP; 5mM MgCl₂; 1mM DTT; 15% Glycerin) aufgefüllt und mit 1µg Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin in 20µl Extraktionspuffer vermischt. Die Reaktion wurde mit Hilfe des Gerätes Fluostar-Galaxy der Firma BMG verfolgt. Die Reaktionsgeschwindigkeit (Änderung der Fluoreszenz pro Zeiteinheit) war ein Maß für die proteasomale Aktivität. Zur Umrechnung der Aktivität in Units (U = µmol/min) wurde anhand der Fluoreszenz definierter Mengen aus einer Stocklösung Amido-4-methylcoumarin eine Eichgerade erstellt.

2.2.3.7 Untersuchung der Proteinstabilität durch „Cycloheximide chase“

Zur Untersuchung der Stabilität von Proteinen wurden exponentiell wachsende Kulturen von Hefezellen mit 100µg/ml Cycloheximid versetzt, um die Proteasombiogenese zu unterbinden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert, mit H₂O gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Präparation des Proteinrohextraktes erfolgte wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Anschließend erfolgte die Analyse durch SDS-PAGE und Western-Blot.

2.2.4 Methoden der Hefegenetik

2.2.4.1 Kreuzung von haploiden Hefestämmen

Zellen der zu paarenden Hefestämmen wurden auf einer YPD-Agarplatte durch überkreuzende Ausstriche vermischt und 2-6std bei Raumtemperatur inkubiert. Enthielten die Ausgangsstämme unterschiedliche Auxotrophiemarker, so konnten diploide Kreuzungsprodukte durch Replikaplattierung auf ein selektives Medium isoliert werden. War dies nicht möglich, so wurden die Kreuzungsprodukte vereinzelt und in Paarungstests auf ihr Verhalten hin überprüft. Zellen, die weder mit α - noch mit a -Zellen effizient paaren konnten, wurden als Diploide identifiziert und zur weiteren Arbeit isoliert.

2.2.4.2 Paarungstypanalyse von Hefezellen

Zur Feststellung des Paarungstyps von Hefestämmen wurden diese mit den Testerstämmen KMY38 (*Mata α , trp5-27*) und KMY39 (*Mata, trp5-27*) auf einer YPD-Platte überkreuzend ausgestrichen und für 2-6std bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Replikaplattierung auf SD-Medium ohne Tryptophan. Da alle anderen benutzten Stämme eine Mutation im *TRP1*-Gen besitzen (*trp1 Δ 63*), konnten diploide Paarungsprodukte aufgrund der Fähigkeit zur gegenseitigen Komplementation der *trp1*- und *trp5*-Mutation auf diesen

Minimalmediumsplatten wachsen und identifiziert werden. Haploide Zellen aller Stämme sind aufgrund der Tryptophanauxotrophie nicht zum Wachstum befähigt.

2.2.4.3 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse

Zur Induktion der Meiose wurden die zu analysierenden Zellen auf Sporulationsmedium (0,1% Hefeextrakt, 1% Kaliumacetat, 2% Agar) ausgestrichen und für einige Tage bei 30°C inkubiert. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden einige Zellen abgenommen und in 200µl sterilem H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 3µl β-Glucuronidase und 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension in einem waagerechten Strich vorsichtig auf einer YPD-Platte verteilt. Tetraden wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert und die vier Sporen systematisch auf der Agar-Platte abgelegt. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei 30°C wurden die Sporklone isoliert und auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

2.2.4.4 Deletion und Manipulation von Genen in *S. cerevisiae* nach Longtine *et al.* (1998)

Die Deletion von Genen in *S. cerevisiae* erfolgte nach der Methode von Longtine *et al.* (1998). Hierzu wurden Oligonukleotidpaare generiert, deren 5'-Ende ca. 50-60 Nukleotide beinhaltete, die der Sequenz vor dem Startcodon (F1-Oligo) oder hinter dem Stopcodon (R1-Oligo) des zu deletierenden Genes entsprach. Das 3'-Ende dieser Oligonukleotide wurde so gewählt, dass eine Amplifikation der in Longtine *et al.* beschriebenen Deletionskassette im Plasmid pFA-6a-His3-MX6 ermöglicht wurde. Durch Transformation von Hefezellen mit den so erzeugten linearen PCR-Produkten kam es dann durch homologe Rekombination zu einem Austausch der genetischen Information am gewünschten Locus. In ähnlicher Weise wurden die offenen Leserahmen (ORF) von Genen am 3'-Ende mit einer für ein Epitop kodierenden Sequenz fusioniert. Hier wurde ein Oligonukleotid so gewählt, dass dessen 5'-Ende der Sequenz direkt vor dem Stopcodon (F2-Oligo) entsprach. Durch homologe Rekombination fand so eine Integration des linearen PCR-Produkts am 3'-Ende des gewünschten ORF statt.

2.2.4.5 Analyse des Wachstums von *S. cerevisiae*-Stämmen durch serielle Verdünnung

Zur Analyse des Wachstums verschiedener Stämme von *S. cerevisiae* wurden Zellen über Nacht in Flüssigkulturen angezogen. Aus diesen Kulturen wurden verschiedenen Verdünnungen in Mikrotiterplatten in folgenden Stufen angesetzt: 5000 Zellen pro μl , 1000 Zellen pro μl , 200 Zellen pro μl , 40 Zellen pro μl , 8 Zellen pro μl . Aus jeder Verdünnung wurde je $1\mu\text{l}$ auf die gewünschten Nährmedien aufgebracht. Die Anzucht erfolgte für 2-4 Tage unter den im jeweiligen Experiment angegebenen Bedingungen.

2.2.4.6 Anlage von Dauerkulturen von *E. coli* und *S. cerevisiae*

Zur längerfristigen Lagerung wurden Flüssigkulturen von Hefe- und Bakterienstämmen mit sterilem 75%igem Glycerin auf eine Endkonzentration von 25% Glycerin eingestellt und bei -80°C tiefgefroren. In diesem Zustand sind Kulturen für mehrere Jahre haltbar und können durch Ausstreichen auf entsprechende Medien (LB oder YPD) reanimiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Autoregulation der Menge aktiver Proteasomen in Abhängigkeit von der proteasomalen Aktivität

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit waren Untersuchungen zur Ubiquitin-vermittelten Proteolyse (engl. Ubiquitin mediated proteolysis, UMP) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Durch ein genetisches „Screening“-Verfahren wurden Mutanten identifiziert, die zur Stabilisierung artifizierter Testsubstrate des Ubiquitin-Proteasomsystems führten (Ramos *et al.*, 1998); Keck, 1999; London, 2004). Drei dieser fünf sogenannten *ump*-Mutationen betrafen Untereinheiten des 26S-Proteasoms (*ump2=pup1* (β 2), *ump4=pre4* (β 4) und *ump5=rpt3*), eine betraf den Proteasom-spezifischen Reifungsfaktor Ump1, die fünfte Mutation betraf das Deubiquitylierende Enzym Doa4 (*ump3*).

Vorausgegangene Arbeiten charakterisierten die Funktionen der so identifizierten Komponenten und die Auswirkungen der Mutationen. Das Fehlen des Ump1-Proteins führte zu einer starken Reduktion der Menge aktiver Proteasomen durch Beeinträchtigung von Assemblierungs- und Reifungsschritten (Ramos *et al.*, 1998). Die Mutationen *ump2* (*pup1-2* \rightarrow Pup1-A130E) und *ump4* (*pre4-3* \rightarrow Pre4-S224Y) beeinträchtigten die Reifung und somit die Aktivität des Proteasoms. Darüber hinaus war in der *ump4*-Mutante auch die Assemblierung von 20S-Proteasomen gestört (Keck, 1999). Die *ump3* (*doa4*)-Mutation führte zu einer Reduktion der Menge freien Ubiquitins in der Zelle (Keck, 1999; London, 2004; siehe Kap. 1.1.2). In der *ump5* (*rpt3*)-Mutante lag eine Mutation im Promotor des *RPT3*-Gens vor, die zu einer verringerten Expression dieses Gens führte und damit die Menge aktiver 26S-Proteasomen begrenzte (Keck, 1999).

Die Analyse dieser Mutanten ermöglichte nicht nur Einblicke in die Funktion der betroffenen Proteine, sondern führte auch zu der Beobachtung, dass eine Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität zu einer erhöhten Transkription proteasomaler Gene führt (Ramos *et al.*, 1998); Keck, 1999). Die Analyse dieses Rückkopplungsmechanismus, der die Menge aktiver Proteasomen in der Zelle reguliert, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.1.1 Der Transkriptionsfaktor Rpn4 ist ein zentraler Regulator der Biogenese des Proteasoms

Wie oben beschrieben löst die Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität ein Signal aus, das zu einer verstärkten Transkription von Genen führt, die für proteasomale Untereinheiten kodieren. Dieses Signal muss also einen Einfluss auf die Menge oder Aktivität eines für proteasomale Gene spezifischen Transkriptionsfaktors ausüben. Für das Protein Rpn4 (auch als Son1 oder Ufd5 bezeichnet; (Nelson *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1995) wurde in der Hefe eine Funktion als proteasomspezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben (Mannhaupt *et al.*, 1999). Zuvor konnte Rpn4 bereits eine Funktion im Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau zugewiesen werden, da eine Mutation des *RPN4*-Gens zur Stabilisierung von Modellsubstraten des Proteasoms führte (Johnson *et al.*, 1995). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Rpn4 mit dem Proteasom assoziiert ist (Fujimuro *et al.*, 1998), weshalb es auch als Untereinheit des 19S-Komplexes (Regulatory Particle Non-ATPase) bezeichnet wurde (Finley *et al.*, 1998). Diese Eigenschaften machten Rpn4 zu einem geeigneten Kandidaten für eine wichtige Funktion in der Autoregulation des Proteasoms.

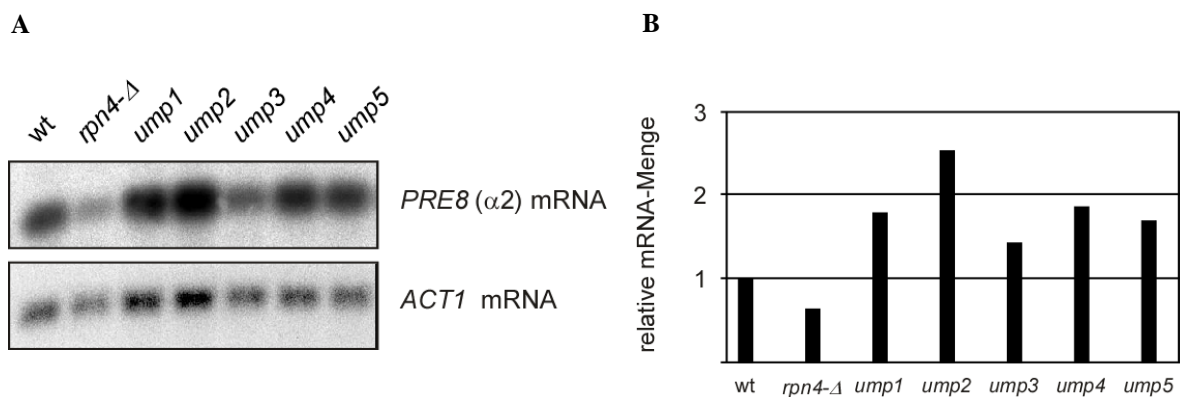


Abb. 4 Analyse der Expression proteasomaler Gene in verschiedenen *ump*-Mutanten

(A) Die Transkriptmenge des *PRE8*-Gens wurde in *rpn4Δ*- und *ump*-Mutanten durch Northern-Blot analysiert. (B) Quantifizierung der Signale mit Hilfe des BioImaging Analyzers Fuji BAS1500. Die mRNA-Menge wurde auf die Menge der *ACT1*-mRNA in jeder Probe normalisiert.

Die Analyse der Transkriptmenge eines proteasomalen Gens zeigt deutlich die Induktion der Genexpression (hier am Beispiel der mRNA des *PRE8*-Gens) bei beeinträchtigter proteasomaler Aktivität in den Mutanten *ump1* - *ump5*. Im Gegensatz dazu bewirkt die Deletion von *RPN4* eine Verringerung der Menge der *PRE8*-mRNA auf ca. 65% des Wertes

in Wildtypzellen. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der beschriebenen Funktion von Rpn4 in der basalen Transkription der Gene proteasomaler Untereinheiten (Mannhaupt *et al.*, 1999). Um zu prüfen, ob Rpn4 auch eine Funktion in der Regulation der Menge aktiver Proteasomen in Abhängigkeit von der gesamten proteasomalen Aktivität besitzt, wurde die Auswirkung der Deletion des *RPN4*-Gens in den Mutanten *ump2* und *ump4* untersucht. Die Transkriptmenge verschiedener Proteasomuntereinheiten wurde in Wildtyp-Zellen und *ump*-Mutanten in An- und Abwesenheit von Rpn4 verglichen (Abb. 5).

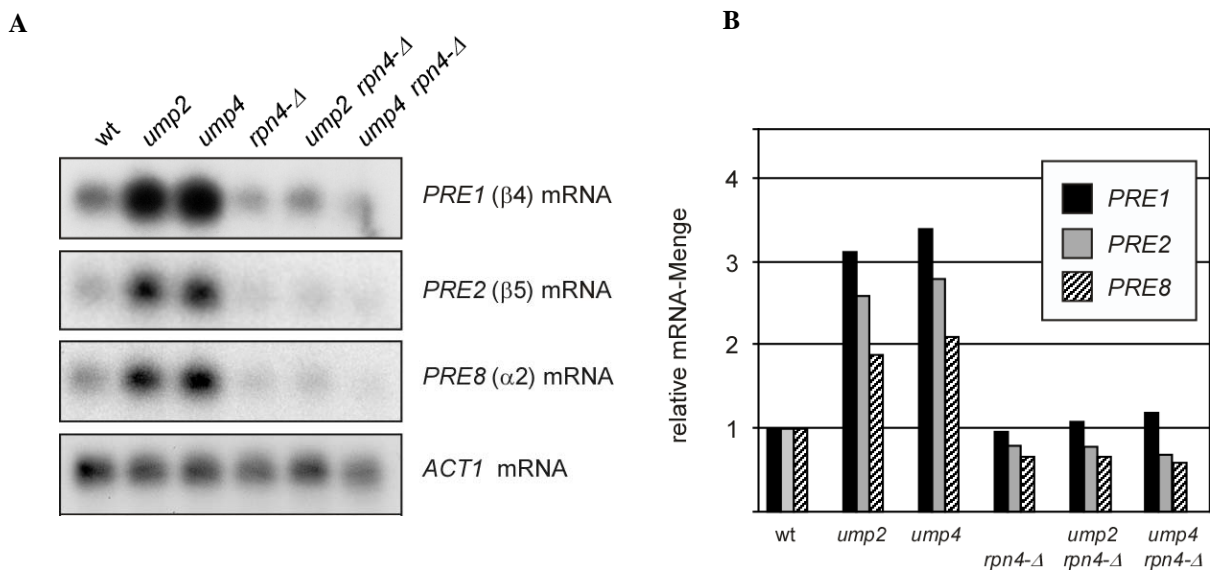


Abb. 5 Einfluss der Deletion von *RPN4* auf die Induktion der Genexpression in *ump*-Mutanten

(A) Analyse der Transkriptmenge von *PRE1*, *PRE2* und *PRE8* durch Northern-Blot und (B) Quantifizierung der Signale mit Hilfe des BioImaging Analyzers Fuji BAS1500. Die mRNA-Menge wurde auf die Menge der *ACT1*-mRNA in jeder Probe normalisiert.

Wie Abb. 5 zeigt, verhindert die Deletion von *RPN4* die Induktion der Genexpression in *ump*-Mutanten vollständig. Die Transkriptmenge in den *ump/rpn4*Δ-Doppelmutanten entspricht dem in der *rpn4*Δ-Mutante. Rpn4 ist somit ein wichtiger Bestandteil des Regulationsmechanismus, der die Menge aktiver Proteasomen kontrolliert.

Vergleicht man die Transkriptmengen in der *rpn4*Δ-Mutante mit der im Wildtyp, so erkennt man, dass die basale mRNA-Menge der untersuchten Gene unterschiedlich stark von Rpn4 abhängig ist. Während für *PRE1* kein Unterschied detektiert wurde, so ist die Menge der *PRE2*-mRNA um ca. 20%, die von *PRE8* um ca. 35% reduziert.

Rpn4 bindet an die so genannte PACE-Sequenz (Proteasome Associated Control Element, Sequenz: GGTGGCAAA) in den Promotoren verschiedener Gene. Neben den Genen für Proteasomuntereinheiten besitzen auch andere Gene für Komponenten des Ubiquitinsystems und Gene, deren Produkte keine Funktion im Ubiquitin-System ausüben, eine PACE-Sequenz in der Promotorregion (Mannhaupt *et al.*, 1999). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über eine Auswahl dieser Gene.

Gen	Funktion des Genprodukts
<i>RPT1-RPT6</i>	AAA-Proteine des 19S-Komplexes des 26S-Proteasoms
<i>RPN1, 2, 3, 5, 6, 9, 11, 12</i>	Non-ATPase-Untereinheiten des 19S-Komplexes
<i>SCL1, PRE8, PRE9, PRE6, PUP2, PRE5, PRE10</i>	α -Untereinheiten des 20S-Proteasoms
<i>PRE3, PUP1, PUP3, PRE1, PRE2, PRE7, PRE4</i>	β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms
<i>UBA1, UBI4</i>	Ubiquitin-System
<i>CDC48</i>	AAA-Protein, Zellteilung, Membranfusion
<i>CCT6</i>	Untereinheit des cytosol. Cct-Chaperonins
<i>PIM1</i>	mitochondriale AAA-Protease (homolog zu Lon)
<i>ECM12, ECM29, GSF2</i>	Zellwandsynthese
<i>CEG1, FIR1, NAB2</i>	mRNA-Stabilität und -prozessierung
<i>PDI1</i>	Protein-Disulfid-Isomerase im ER
<i>YHM1</i>	mitochondrialer GTP/GDP-Transporter
<i>RAD50, RAD511</i>	DNA-Reparatur
<i>YAP1</i>	Transkriptionsfaktor, benötigt für Stress-Antwort

Tab. 1 Hefegene, deren Promotoren eine PACE-Sequenz enthalten (nach Mannhaupt *et al.*, 1999).

3.1.2 Phänotypische Charakterisierung von *RPN4*

Die Deletion von *RPN4* in *ump*-Mutanten führt zu synthetischen Wachstumsdefekten

Mutationen, die die Funktionen des Ubiquitin/Proteasom-Systems beeinträchtigen, zeigen häufig leicht detektierbare phänotypische Auswirkungen. So zeigten z.B. die Mutanten *ump1*, *ump2*, *ump3* und *ump4* bereits unter normalen Wachstumsbedingungen (30°C) ein verlangsamtes Wachstum. Eine Erhöhung der Wachstumstemperatur oder die Zugabe bestimmter Chemikalien, z.B. von Cadmiumchlorid oder des Argininanalogons Canavanin, führten zu einer verstärkten Ausprägung dieser Defekte. Unter diesen Umständen kommt es zu einer Anhäufung abnormer Proteine, die normalerweise durch das Proteasom beseitigt werden. Alle fünf *ump*-Mutanten zeigten deutliche Wachstumsdefekte unter diesen Bedingungen. Um die Funktion von Rpn4 weiter zu charakterisieren, wurde die Auswirkung der Deletion des *RPN4*-Gens auf das Wachstum von Zellen untersucht, die Mutationen in den Genen *UMP1*, *UMP2* oder *UMP4* trugen.

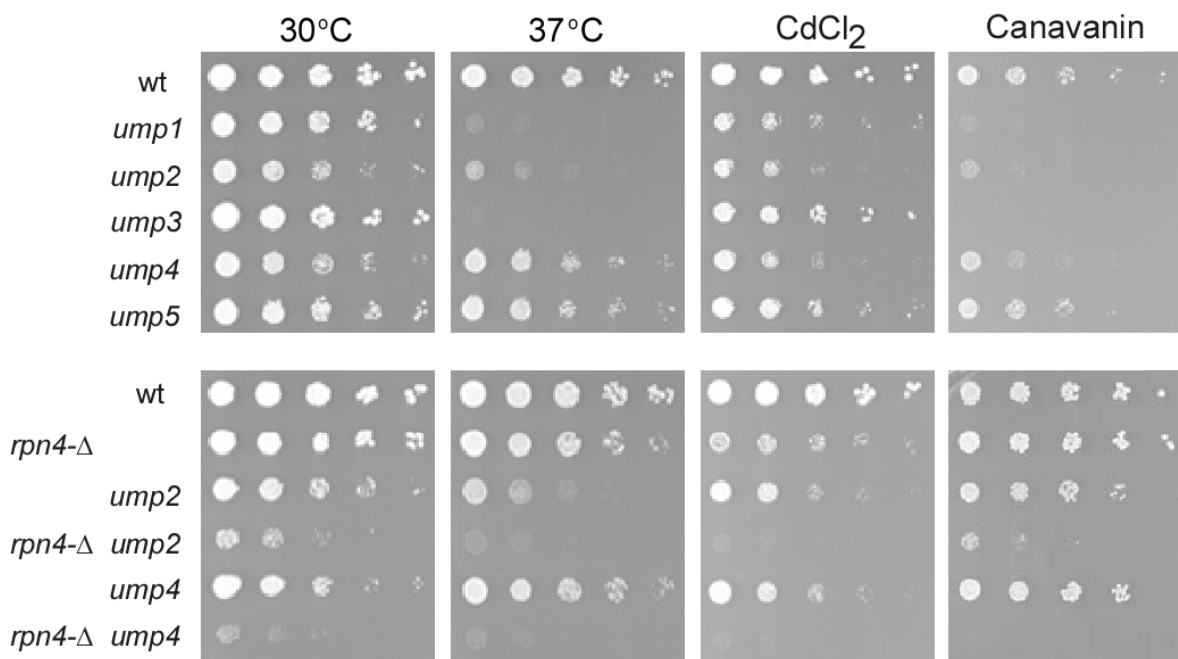


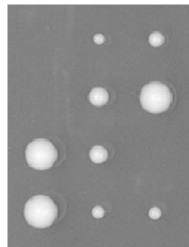
Abb. 6 Wachstumsanalyse von *ump*-Mutanten und *ump/rpn4*Δ-Doppelmutanten

Zellen aus einer Übernachtskultur wurden in geeigneten Verdünnungen auf YPD- oder SD-Agar aufgetropft und für 2-4 Tage inkubiert. Wenn angegeben, wurden dem Medium 30µM CdCl₂ oder 0,8µg/ml (oben) bzw. 0,5µg/ml (unten) Canavanin zugesetzt.

Die Wachstumsanalyse in Abb. 6 zeigt, dass die Deletion von *RPN4* im *ump2*- und *ump4*-Hintergrund zu synthetischen Wachstumsdefekten führte, die die beobachteten Phänotypen noch verstärkten. Bereits bei 30°C konnte auf Vollmedium ein deutlich verlangsamtes Wachstum festgestellt werden. Bei erhöhten Temperaturen und bei Zugabe von CdCl_2 oder von Canavanin trat dies noch deutlicher hervor. Die Deletion von *RPN4* in Wildtypzellen bewirkte lediglich eine leichte Verlangsamung des Wachstums in Anwesenheit von Cadmiumchlorid und bei erhöhter Temperatur.

In Zellen, die eine Mutation im *UMP1*-Gen trugen, konnte eine Deletion von *RPN4* durch Transformation und anschließende Rekombination eines linearen DNA-Fragmentes nicht erreicht werden. Dies deutete auf eine besonders starke synthetische Wirkung beider Mutationen hin. Um dies zu untersuchen, wurde durch Kreuzung zweier haploider Stämme, die eine Deletion des *UMP1*- oder des *RPN4*-Gens aufwiesen, ein diploider Stamm erzeugt. Die Analyse von Tetraden aus diesen heterozygot diploiden Ausgangszellen ergab, dass beide Deletionen synthetisch letal wirkten. Es konnten keine lebenden Sporklone isoliert werden, die beide Deletionen enthielten (Abb.7).

ump1-Δ x rpn4-Δ



NPD PD T

Abb.7 Die Deletionen von *UMP1* und *RPN4* sind synthetisch letal

Tetradenanalyse des diploiden Stammes ML3 (*UMP1/ump1Δ::HIS3 RPN4/rpn4Δ::LEU2*). Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 30°C. NPD: nicht-parentaler Dityp; PD: parentaler Dityp; T: Tetratyp.

30°C

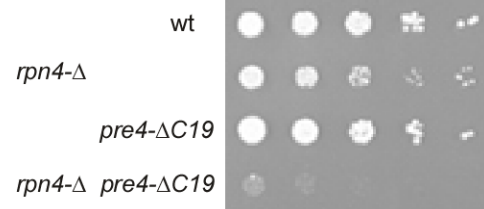


Abb.8 Eine erhöhte Menge aktiver Proteasomen maskiert die Effekte der *pre4-ΔC19*-Mutation

Zellen aus einer Übernachtskultur wurden in geeigneten Verdünnungen auf YPD-Agar aufgetropft und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Da eine erniedrigte proteasomale Aktivität zu einer erhöhten Neubildung von Proteasomen führt, könnten eventuell durch Mutationen bedingte phänotypische Defekte gänzlich maskiert werden. Ein solcher Effekt konnte für die *pre4-ΔC19*-Mutation beobachtet werden, die unter normalen Bedingungen keine auffälligen Wachstumsnachteile hervorruft. Sie beeinträchtigt die Assemblierung des 20S-Proteasoms und führt zu einer Verringerung der post-azidischen

Aktivität (Ramos *et al.*, 2004). Die Kombination mit einer Deletion von *RPN4* führte zu einem stark ausgeprägten Wachstumsdefekt (Abb. 8) und zeigte die tatsächlichen Auswirkungen der *pre4-ΔC19*-Mutation auf die Funktion des Proteasoms.

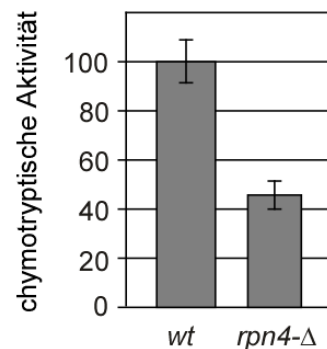
Die Deletion von *RPN4* führt zu einer Verringerung der konstitutiven Menge aktiver Proteasomen

Um den Einfluss der von Rpn4 kontrollierten basalen Transkription auf die Gesamtmenge aktiver Proteasomen zu bestimmen, wurde die chymotryptische Aktivität im Rohextrakt von Wildtyp- und *rpn4Δ*-Zellen gemessen. Wie Abb. 9 zeigt beträgt die chymotryptische Aktivität in Abwesenheit von Rpn4 nur ca. 50% der Aktivität in Wildtyp-Zellen. Umso erstaunlicher ist es, dass die Deletion von *RPN4* alleine nur sehr schwache Wachstumsdefekte hervorruft unter Bedingungen, die das Wachstum der *ump*-Mutanten deutlich beeinträchtigen (siehe Abb. 6). Bei erhöhten Temperaturen und in Anwesenheit von CdCl_2 wurde eine leichte Erniedrigung der Wachstumsrate festgestellt, während auch höhere Konzentrationen von Canavanin keine Auswirkungen zeigten (Daten nicht gezeigt). Eine auf etwa 50% reduzierte Menge aktiver Proteasomen reicht also aus, um mit den untersuchten Stressfaktoren zurecht zu kommen.

Abb. 9 Die Deletion von *RPN4* führt zu einer Erniedrigung der proteasomalen Aktivität

Bestimmung der chymotryptischen Aktivität in Rohextrakten aus Wildtyp- (YPH500) und *rpn4Δ*-Zellen (ML5). Die Aktivität im Rohextrakt (U/mg Gesamtprotein) wurde im Verhältnis zur Aktivität in Wildtyp-Extrakten (=100%) berechnet.

Dargestellt ist das Ergebnis aus vier unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.



Um die Auswirkungen dieser Reduktion der Menge aktiver Proteasomen auf die Stabilisierung von Modells substraten zu untersuchen, wurden Zellen der Stämme YPH500 (wt) und ML5 (*rpn4Δ*) mit den Plasmiden pBA2 und pBA3 transformiert. Das Plasmid pBA3 enthält ein Gen, das für eine modifizierte Form des für die Uracilbiosynthese benötigten

Ura3-Proteins kodiert. Diese modifizierte Form besitzt einen Arginin- anstelle eines Methioninrestes am N-Terminus, und wird deshalb durch den „N-end-rule“-Weg ubiquityliert und abgebaut. Das Plasmid pBA2 kodiert für die stabile Variante dieses Proteins mit Methionin am N-Terminus und dient als Kontrolle. Beide Gene stehen unter der Kontrolle des *CUP1*-Promotors, dessen Expressionsstärke durch Zugabe von Kupferionen induziert werden kann. Die Analyse des Wachstumsvermögens der transformierten Stämme auf Minimalmedium ohne Uracil erlaubt Rückschlüsse auf die Stabilität des Ura3-Proteins. Wie Abb. 10 zeigt, waren bei schwacher Expression des *URA3*-Gens nur geringe Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *rpn4*-Deletionsmutante zu erkennen. Erst bei starker Expression durch Zugabe von Kupferionen wurde ein signifikanter Anteil des Ura3-Proteins in der Deletionsmutante stabilisiert, die Zellen zeigten ein deutliches Wachstum. Hingegen verbesserte sich das Wachstum der Wildtypzellen kaum. Dies zeigt, dass die Reduktion der Menge aktiver Proteasomen auf ca. 50% des normalen Wertes keine deutliche Stabilisierung des Modells substrates Arg-Ura3 bewirkt. Erst durch eine erhöhte Genexpression führt die leicht verlängerte Halbwertszeit des Arg-Ura3-Proteins dazu, dass die Zellen uracilprototroph werden.

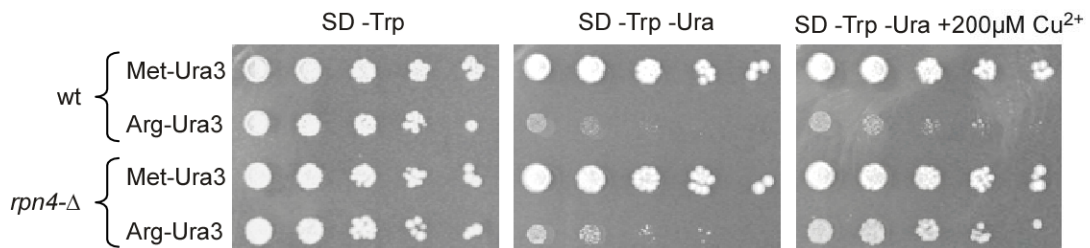


Abb. 10 Einfluss der Deletion von *RPN4* auf die Stabilität des Modells substrates Arg-Ura3

Zellen der Stämme YPH500 (wt) und ML5 (*rpn4Δ::HIS3-MX6*) wurden mit den Plasmiden pBA2 bzw. pBA3 transformiert. Zellen aus einer Übernachtskultur wurden in geeigneten Verdünnungen auf SD-Agar aufgetropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Wenn angegeben, wurden dem Medium 200µM Kupfersulfat zugesetzt.

3.1.3 Die Expression von Ubiquitin wird von Rpn4 kontrolliert

Neben Mutationen, die direkt die Aktivität des Proteasoms betrafen, konnte durch die Suche nach *ump*-Mutanten eine Mutation im *DOA4*-Gen identifiziert werden, das für ein deubiquitylierendes Enzym kodiert. Durch die als *ump3* bezeichnete Mutation wird in der Zelle keine aktive Form des Doa4-Proteins gebildet (Keck, 1999). Dieses ist normalerweise am Recycling des Ubiquitins beteiligt. Es ist mit dem Proteasom assoziiert und spaltet Ubiquitinketten von Substratproteinen ab, bevor diese durch das Proteasom abgebaut werden. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Doa4 das Ubiquitin zusammen mit dem Substratprotein durch das Proteasom abgebaut wird, was zu einer starken Verringerung der Menge an freiem Ubiquitin in der Zelle führt (Papa und Hochstrasser, 1993; Papa *et al.*, 1999; Swaminathan *et al.*, 1999). Eine verstärkte Expression von Ubiquitin führt zu einer Suppression der Phänotypen von *ump3* (Keck, 1999; London *et al.*, 2004).

In Stresssituationen ist vor allem das *UBI4*-Gen für die Expression ausreichender Ubiquitinmengen verantwortlich (siehe Kap. 1.1.1). Da das *UBI4*-Gen im Promotorbereich eine PACE-Sequenz aufweist, stellte sich die Frage, welche Rolle Rpn4 für die Expression von Ubiquitin spielt, und wie sich die Deletion von *RPN4* auf das Wachstum der *ump3*-Mutante auswirkt.

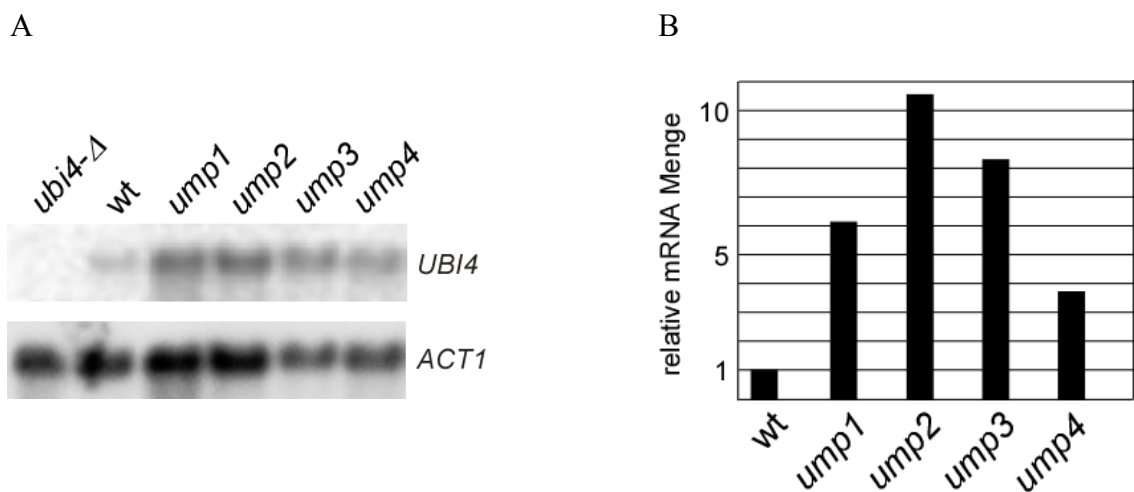


Abb. 11 Die Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität führt zu einer erhöhten *UBI4*-Transkription (A) Analyse der Transkriptmenge von *UBI4* und *ACT1* durch Northern-Blot und (B) Quantifizierung der Signale. Nach der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde wurden die Signale mit Hilfe des BioImaging Analyzers Fuji BAS1500 ausgewertet und quantifiziert. Die mRNA-Menge wurde auf die Menge der *ACT1*-mRNA in jeder Probe normalisiert.

Die Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität bewirkt eine starke Induktion der Transkription des *UBI4*-Gens (Abb. 11). Im Gegensatz zur Transkription des *PRE8*-Gens führt die *ump3*-Mutation hier ebenfalls zu einer starken Induktion (vergleiche Abb. 4).

Analog zu der in Abb.5 gezeigten Analyse wurde die Auswirkung der Deletion des *RPN4*-Gens im *ump2*- oder *ump4*-Hintergrund auf die Transkription des *UBI4*-Gens untersucht. Auch hier führt die Deletion von *RPN4* zu einer Verringerung der Induktion der *UBI4*-Transkription, allerdings wird die Induktion nicht gänzlich unterbunden (Abb. 12). Dies zeigt, dass zumindest ein Teil der verstärkten *UBI4*-Transkription durch Rpn4 gesteuert wird.

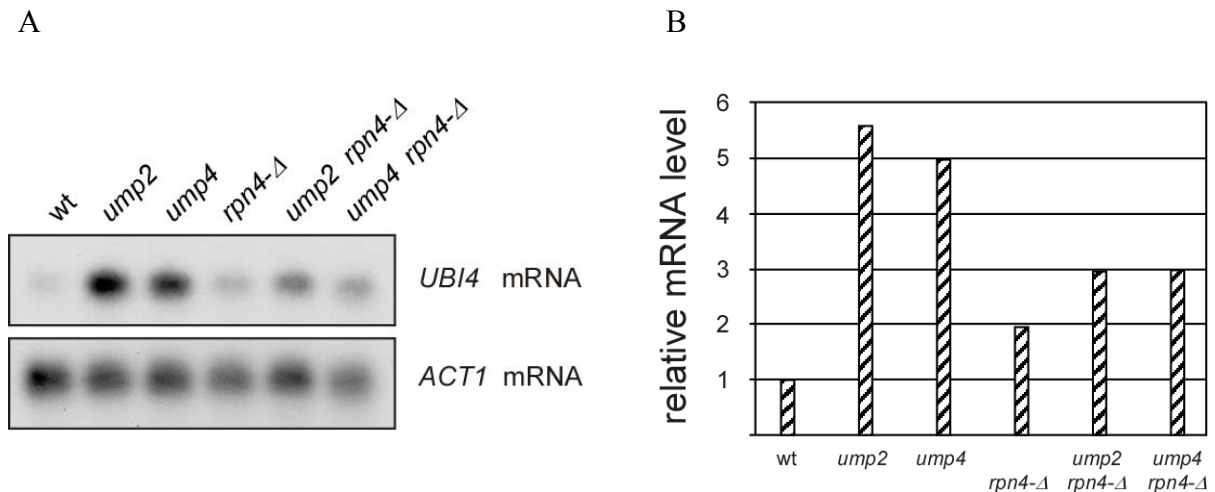


Abb. 12 Die Expression von *UBI4* wird zum Teil durch Rpn4 kontrolliert

(A) Analyse der Transkriptmenge von *UBI4* und *ACT1* in *ump*- und *ump/rpn4Δ*-Doppelmutanten durch Northern-Blot und (B) Quantifizierung der Signale mit Hilfe des BioImaging Analyzers Fuji BAS1500. Die mRNA-Menge wurde auf die Menge der *ACT1*-mRNA in jeder Probe normalisiert.

Die Menge an freiem Ubiquitin ist in der *ump3*-Mutante stark erniedrigt (Keck, 1999, London *et al.*, 2004). Eine Reduktion der Ubiquitinexpression durch Deletion von *RPN4* könnte hier zu starken synthetischen Wachstumsdefekten führen. Die Analyse des Wachstums von *ump3/rpn4Δ*-Doppelmutanten zeigte jedoch, dass die Deletion von *RPN4* zu einer leichten Suppression der Temperatursensitivität der *ump3*-Mutante führte (Abb. 13). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Deletion von *RPN4* zwar zu einer Erniedrigung der

Ubiquitinexpression, zugleich jedoch auch zu einer Verringerung der Menge aktiver Proteasomen führt. Die dadurch verringerte proteasomale Aktivität bewirkt, dass weniger Ubiquitin durch das Proteasom abgebaut wird. Die Erniedrigung der proteasomalen Aktivität verschiebt also die Balance zwischen Ubiquitinrecycling und Ubiquitinabbau, so dass die Temperatursensitivität der *ump3*-Mutante supprimiert wird. Ein ähnlicher Effekt konnte beobachtet werden, wenn die *ump1*-Mutation mit der *ump3*-Mutation kombiniert wurde (London *et al.*, 2004).

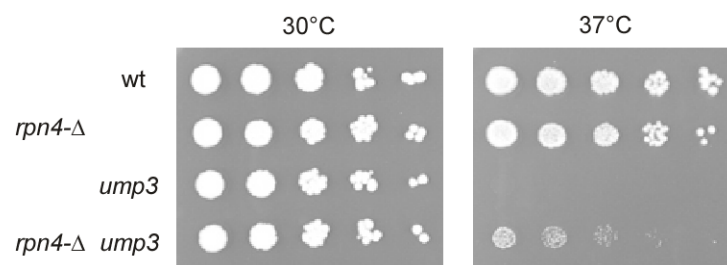
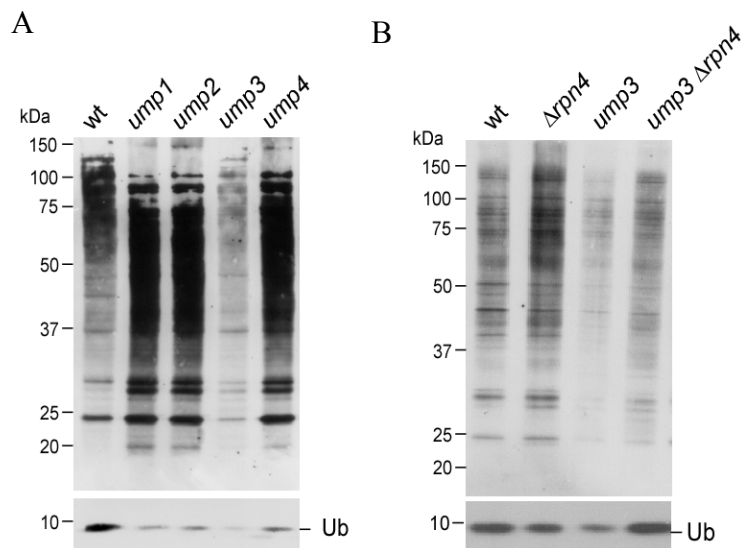


Abb. 13 Die Deletion von *RPN4* supprimiert die Temperatursensitivität der *ump3*-Mutante
Wachstumsanalyse von *ump3*-Mutanten und *ump3/rpn4Δ*-Doppelmutanten. Zellen aus einer Übernachtskultur wurden in geeigneten Verdünnungen auf YPD-Agar aufgetropft und für 3-4 Tage bei 30 bzw. 37°C inkubiert.

Abb. 14 Ubiquitinhomeostase in Wildtyp und *ump*-Mutanten

Analyse der Menge poly-ubiquitylierter Substrate und von freiem Ubiquitin (A) in Wildtyp und *ump*-Mutanten und (B) in $\Delta rpn4$, *ump3* und $\Delta rpn4/ump3$ -Mutanten durch Anti-Ubiquitin-Western-Blot. Zur Detektion freien Ubiquitins wurden Proteine aus dem unteren Teil des Gels für 10min auf eine Membran übertragen. Die Übertragung hochmolekularer Proteine erfolgte in 60min.



Wie Abb.14 zeigt, führte die Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität in den Mutanten *ump1*, *ump2* und *ump4* zu einer Anhäufung ubiquitylierter Substratproteine,

während gleichzeitig die Menge an freiem Ubiquitin erniedrigt ist. In der *ump3*-Mutante hingegen führt die Mutation des *DOA4*-Gens zu einer Abnahme ubiquitylierter Substrate bei gleichzeitiger Reduktion freien Ubiquitins. Die Deletion des *RPN4*-Gens wirkt sich ähnlich aus wie die Mutationen in *UMP1*, *UMP2* und *UMP4*. Man erkennt eine Anhäufung ubiquitylierter Proteine und eine Absenkung der Menge freien Ubiquitins. Die Kombination der *ump3*-Mutation mit der Deletion des *RPN4*-Gens führt zu einer Rückkehr sowohl der Ubiquitinmenge als auch der Menge der Ubiquitinkonjugate auf das Niveau des Wildtyps (Abb. 14 B).

3.1.4 Rpn4 ist ein Substrat des Proteasoms

Ein Modell der Regulation der Menge aktiver Proteasomen in Abhängigkeit von der insgesamt vorliegenden proteasomalen Aktivität impliziert einen Mechanismus zur Detektion dieser Aktivität und die Übertragung eines Signals, das die Transkription der Zielgene steuert. Eine denkbare Möglichkeit, die Aktivität des Proteasoms mit der Expression proteasomaler Gene zu korrelieren, wäre, die Aktivität oder die Menge des Transkriptionsfaktors Rpn4 durch einen Proteasom-abhängigen Mechanismus zu kontrollieren. Wird die Aktivität oder die Menge von Rpn4 durch ein Substrat des Proteasoms kontrolliert, so ergäbe sich ein negativer „Feedback“-Regulationszyklus. Die Reduktion der proteasomalen Aktivität würde eine Erhöhung der Proteasom-Genexpression bewirken. Im einfachsten Fall wäre Rpn4 selber ein Substrat des Proteasoms und somit direkt von der Gesamtaktivität des proteasomalen Proteinabbaus in der Zelle abhängig.

Zur Untersuchung ob und wie die Menge von Rpn4 durch das Proteasom kontrolliert wird, wurden Wildtyp-Hefezellen und *ump*-Mutanten dahingehend modifiziert, dass der genomische Lokus des *RPN4*-Gens für eine C-terminal epitopmarkierte Variante kodiert. Durch Western-Blot wurde anschließend die Menge und die Stabilität von Rpn4 untersucht. Wie das in Abb. 15 gezeigte Ergebnis verdeutlicht, ist die absolute Menge von Rpn4 in Zellen mit defekter proteasomaler Aktivität erhöht. Die beispielhafte Untersuchung der Stabilität von Rpn4 in *ump1*- und *ump2*-Mutanten ergab, dass eine Beeinträchtigung des Proteinabbaus durch das Proteasom direkt zu einer Stabilisierung von Rpn4 führt (Abb. 16). Dieses Ergebnis zeigt, dass Rpn4 selber ein Substrat des Proteasoms ist.

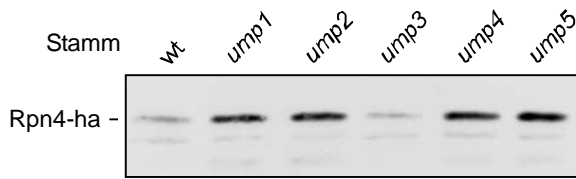
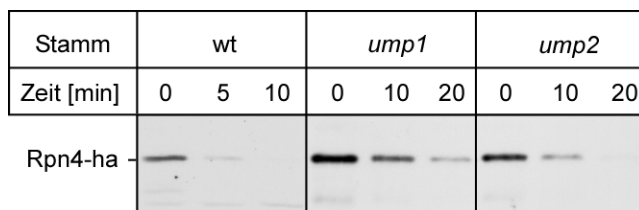


Abb. 15 Steady-state Level von Rpn4-ha in Wildtyp und *ump*-Mutanten

40µg Gesamtprotein aus Rohextrakten der angegebenen Stämme wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Hilfe von Anti-HA-Antikörpern detektiert.

A



B

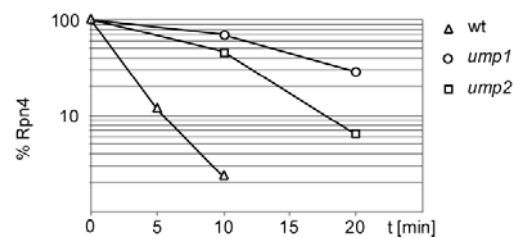


Abb. 16 Defekte im proteasomalen Abbau führen zu einer Stabilisierung von Rpn4

(A) Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu einer Kultur exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach Extraktion der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-ha-Antikörpern detektiert. (B) Quantifizierung der in (A) gezeigten Ergebnisse. (Beachte die unterschiedlichen Entnahme-Zeitpunkte für Wildtyp und *ump*-Mutanten.)

Interessanterweise übte die Mutation im *UMP3*-Gen keinen Einfluss auf die Gesamtmenge von Rpn4 aus. Da in dieser Mutante das Proteasom nicht beeinträchtigt ist, sondern durch die Erniedrigung der Ubiquitinmenge die Ubiquitylierung von Substratproteinen gestört war, deutete dieses Ergebnis daraufhin, dass Rpn4 in einem Ubiquitin-unabhängigen Schritt durch das Proteasom abgebaut wird, ähnlich wie dies für die Ornithindecaboxylase (*Odc*) beschrieben ist (Murakami *et al.*, 1992). Ein solcher Ubiquitin-unabhängiger Mechanismus wurde auch für Rpn4 vorgeschlagen, da eine Mutation des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (*Uba1*) keinen Einfluss auf die Stabilität von Rpn4 ausübte (Xie und Varshavsky, 2001). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass Rpn4 sowohl durch einen Ubiquitin-abhängigen als auch durch einen Ubiquitin-unabhängigen Mechanismus abgebaut wird (Ju und Xie, 2004). Hierbei ist der N-Terminus des Proteins für den Ubiquitin-unabhängigen Mechanismus wichtig, während einer der 11 Lysinreste innerhalb der 229 N-terminalen Aminosäurereste für die Ubiquitylierung benutzt wird. Eine Blockierung des N-Terminus durch Fusion mit einem als Epitop dienenden Peptid verhinderte den Ubiquitin-unabhängigen Abbau (Ju und Xie, 2004). Diese publizierten Daten konnten hier bestätigt werden. Der Abbau von Rpn4 ist in der *ump3*-Mutante, in der die Ubiquitylierung beeinträchtigt ist, nicht merklich reduziert. Erst die

Blockierung des N-Terminus des Rpn4-Proteins mit einem *Flag*-Epitop führte zu einer deutlichen Stabilisierung (Abb. 17). Dagegen ist in Wildtypzellen kein Unterschied zwischen dem Abbau von Rpn4-ha und Flag-Rpn4-ha zu erkennen.

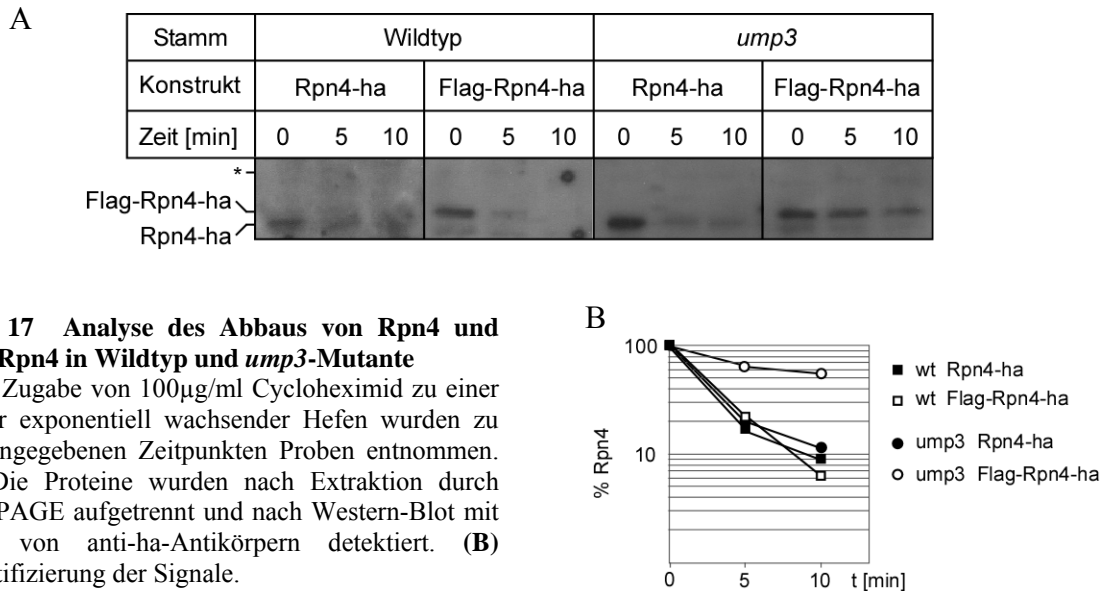


Abb. 17 Analyse des Abbaus von Rpn4 und Flag-Rpn4 in Wildtyp und *ump3*-Mutante

Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu einer Kultur exponentiell wachsender Hefen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. **(A)** Die Proteine wurden nach Extraktion durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-ha-Antikörpern detektiert. **(B)** Quantifizierung der Signale.

Durch Zugabe des Argininanalogons Canavanin wird die Zelle mit einer großen Menge falsch gefalteter und abnormer Proteine konfrontiert. Ist die Proteasomkapazität überschritten, so häufen sich Substratproteine an. Es kommt zu einer Inhibition wichtiger zellulärer Funktionen und in der Folge zu einer Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zelle. Um die Auswirkungen dieser Stressbedingung auf das Rpn4-Protein zu analysieren, wurde dessen Menge und Stabilität in Anwesenheit von Canavanin untersucht. Eine exponentiell wachsende Kultur von Hefezellen (Stamm ML26-2B) wurde mit 1,5µg/ml Canavanin versetzt, wobei ein Teil der Kultur zur Kontrolle unbehandelt blieb. Wie Abb. 18 zeigt, konnte bereits nach 15min ein deutlicher Anstieg der Rpn4-Menge beobachtet werden. Nach 30min hatte die Menge an Rpn4 bereits etwas abgenommen und erreichte nach 60min wieder ihren ursprünglichen Wert. Dies zeigt, dass eine sehr rasche Reaktion auf die Zugabe von Canavanin erfolgte. Um zu klären, ob dieser Anstieg der Rpn4-Menge tatsächlich durch einen verringerten Abbau bewirkt wurde, wurde die Stabilität von Rpn4 nach Zugabe von Canavanin untersucht. Die Zugabe von Canavanin führte zu einer leichten Stabilisierung von Rpn4 (Abb. 19).

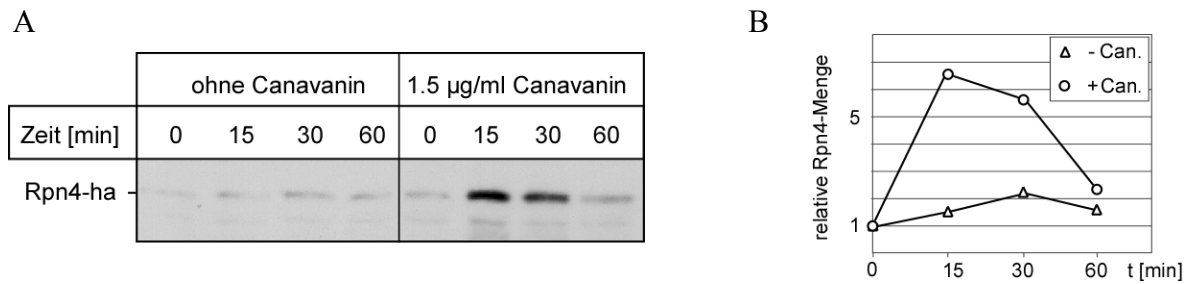


Abb. 18 Einfluss der Anhäufung falsch gefalteter und abnormer Proteine auf die Menge von Rpn4

(A) Nach Zugabe von 1,5µg/ml Canavanin zu einer Kultur exponentiell wachsender Hefezellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach Extraktion der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-ha-Antikörpern detektiert. (B) Quantifizierung der in (A) gezeigten Ergebnisse.

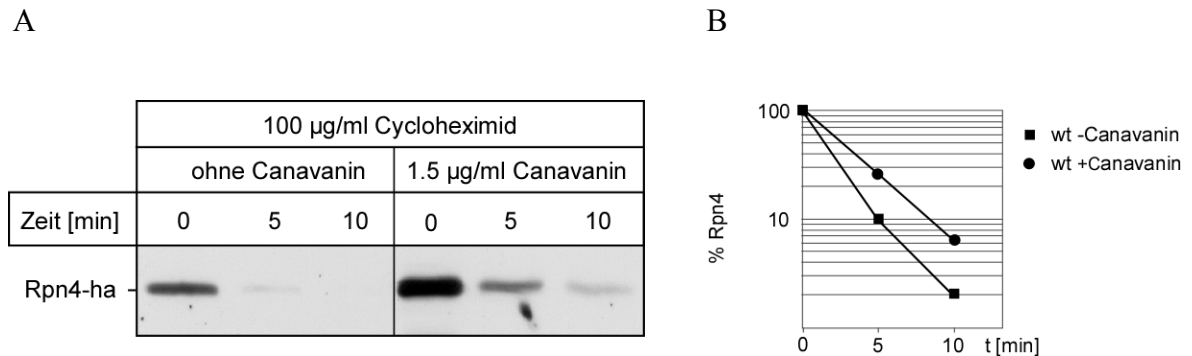


Abb. 19 Die Zugabe von Canavanin führt zu einer Stabilisierung von Rpn4

(A) 10 min nach Zugabe von 1,5µg/ml Canavanin zu einer Kultur exponentiell wachsender Hefen wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid gestoppt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Nach Extraktion der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-ha-Antikörpern detektiert. (B) Quantifizierung der in (A) gezeigten Ergebnisse.

3.1.5 Isolierung von Mutationen, die zur Stabilisierung von Rpn4 führen

Der Abbau von Rpn4 findet in der Hefezelle auf ungewöhnliche Weise statt und schließt Ubiquitin-abhängige und -unabhängige Mechanismen ein (Xie und Varshavsky, 2001). *In vitro* interagiert Rpn4 direkt mit Rpn2, einer Komponente des 19S-Komplexes. Diese direkte Interaktion könnte die Ursache dafür sein, dass eine Ubiquitylierung für den Abbau nicht benötigt wird. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ein N-terminales Fragment von Rpn4 (ca. 150 Aminosäuren) als transferierbares Degron funktionieren kann. Deletiert man

dieses Fragment, so ist der C-terminale Teil stabil, obwohl dieser weiterhin *in vitro* an Rpn2 bindet (Xie und Varshavsky, 2001). Dies legt den Schluss nahe, dass allein die Bindung an das Proteasom für den Abbau von Rpn4 nicht hinreichend ist, sondern dass zusätzliche Schritte nötig sind. Es könnte sein, dass durch die Verkürzung von Rpn4 dieses nicht mehr in die Nähe der zentralen Pore gelangt, die in das Innere des Proteasoms führt, und daher nicht effizient entfaltet werden kann.

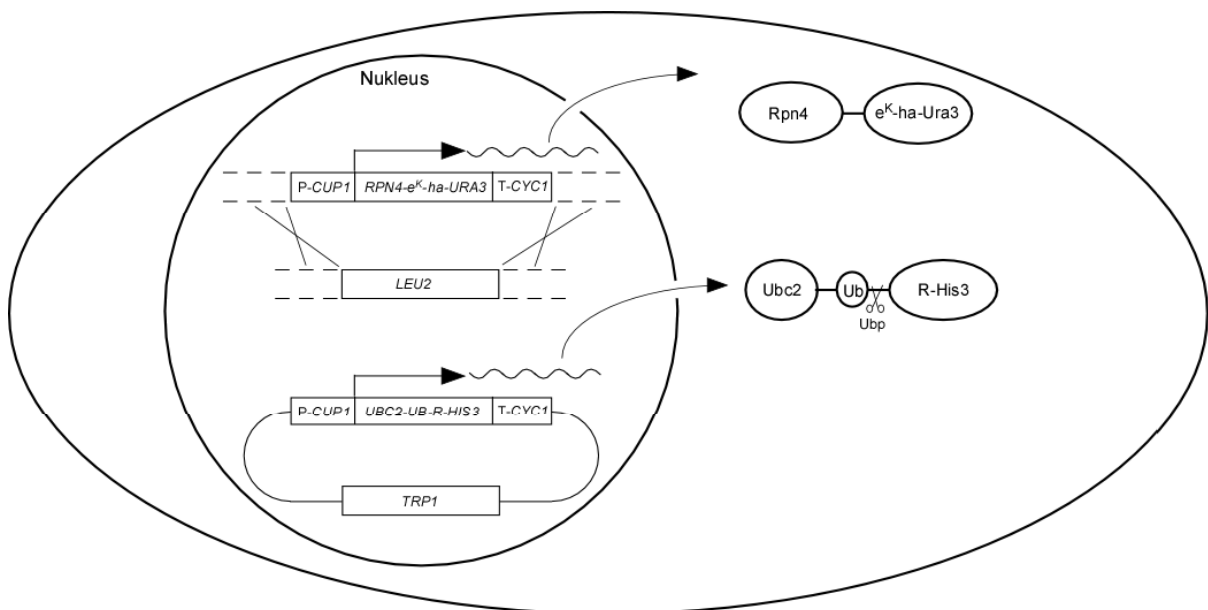


Abb. 20 Schematische Darstellung der genetischen Veränderungen der für den Screen verwendeten Hefestämme ML82 und ML83. Das Konstrukt *P-CUP1-RPN4-URA3-T-CYC1* wurde durch homologe Rekombination in den genomischen *LEU2*-Lokus integriert. Es kodiert für das Rpn4-e^K-ha-Ura3-Fusionsprotein. Das Plasmid pJD531 enthält ein Gen, das für ein Ubc2-Ub-R-His3-Fusionsprotein kodiert. Dieses Fusionsprotein wird nach seiner Synthese und Faltung durch ein Ubp hinter der Ubiquitindomäne gespalten, so dass ein His3-Protein mit einem Argininrest als N-terminalem Aminosäurerest entsteht. Dieses wird rasch durch den so genannten „N-end-rule“-Weg abgebaut. Als Ausgangsstamm für diese genetische Modifikation wurden die Stämme JD47-13C (*MAT α ; leu2-1,112; trp1- Δ 63; his3-1; ura3-52; lys2-801*) und JD53 (*MAT α ; leu2-1,112; trp1- Δ 63; his3-1; ura3-52; lys2-801; +pLYS2*) benutzt.

Um die Frage zu beantworten, ob zusätzliche Faktoren an der Erkennung von Rpn4 und dessen Transport zum Proteasom beteiligt sind, wurde ein genetisches „Screening“-Verfahren durchgeführt mit dem Ziel, Mutationen zu identifizieren, die zu einer Stabilisierung von Rpn4 führen. Zu diesem Zweck wurde das 3'-Ende des *RPN4*-Gens mit dem 5'-Ende des *URA3*-Gens fusioniert, so dass ein durchgehender Leserahmen entstand, der für ein Rpn4-Ura3-Fusionsprotein kodiert. Das *RPN4-URA3*-Fusionsgen wurde unter Kontrolle des induzierbaren *CUP1*-Promotors in den genomischen *LEU2*-Lokus integriert. Der so

modifizierte Hefestamm wurde außerdem mit einem Plasmid transformiert, auf dem ein verändertes *HIS3*-Gen enthalten war. Dieses Gen kodiert für eine Variante des His3-Proteins, die als „N-end-rule“-Substrat durch das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut wird. Parallel wurden Stämme beider Paarungstypen benutzt, um so nach Isolierung der Kolonien schnell eine Komplementationsanalyse durchführen zu können.

In einem ersten Schritt sollten aus einer großen Zahl ausplattierter Zellen uracilprototrophe Kolonien isoliert werden. Durch Analyse des Wachstums auf Minimalmedium ohne Histidin sollte anschließend überprüft werden, ob Funktionen betroffen waren, die spezifisch für den Abbau von Rpn4 sind, oder die allgemein die Funktion des Proteasoms beeinträchtigen.

Aus insgesamt ca. 1×10^9 ausplattierten Zellen je Stamm konnten 160 uracilprototrophe Kolonien mit Paarungstyp a und 180 uracilprototrophe Kolonien mit Paarungstyp α isoliert werden. Alle Kolonien zeigten Wachstumsfähigkeit nach wiederholtem Ausstreichen auf SD-Medium ohne Uracil. Durch Kreuzung gegen den Ausgangsstamm wurde zunächst auf Dominanz bzw. Rezessivität der Mutation getestet. Überraschenderweise ergab dieser Test, dass nur vier der isolierten Klone (alle mit Paarungstyp a) rezessiv waren, alle übrigen jedoch dominant. Diese untypisch hohe Zahl dominanter Klone deutete darauf hin, dass im Verlauf der Selektion durch homologe Rekombination eine Trennung zwischen dem *RPN4*-Gen und dem *URA3*-Gen stattgefunden haben könnte, so dass die Zellen möglicherweise uracilprototroph geworden waren, ohne dass eine Stabilisierung von Rpn4 vorlag. Aus diesem Grund wurde die weitere Analyse auf die vier rezessiven Mutanten (im Folgenden als *dor*-Mutanten (Degradation of Rpn4) bezeichnet) konzentriert. Diese vier *dor*-Mutanten zeigten keine Histidinprototrophie, d.h. es kam nicht zu einer signifikanten Stabilisierung des Arg-His3-Testsubstrats. Erste Wachstumsanalysen zeigten, dass die *dor2*-Mutante ein deutlich verlangsamtes Wachstum aufwies, während die Mutanten *dor1*, *dor3* und *dor4* nur ein leicht eingeschränktes Wachstum aufwiesen. Zur weiteren Analyse der Mutationen wurde eine Kreuzung gegen den Wildtypstamm JD53 durchgeführt. Durch eine anschließende Tetradenselektion sollte das mutierte Allel von der *RPN4-URA3*-Genkassette getrennt werden. Die Analyse der Tetraden zeigte, dass nur für die Mutationen *dor2* und *dor3* eine Kopplung zwischen der Mutation, die ein verlangsamtes Wachstum bewirkt, und der Uracilprototrophie vorlag. Die beiden anderen Mutanten zeigten in der Tetradenselektion eine

nicht mendelsche Aufspaltung dieser Phänotypen und wurden daher nicht weiter berücksichtigt.

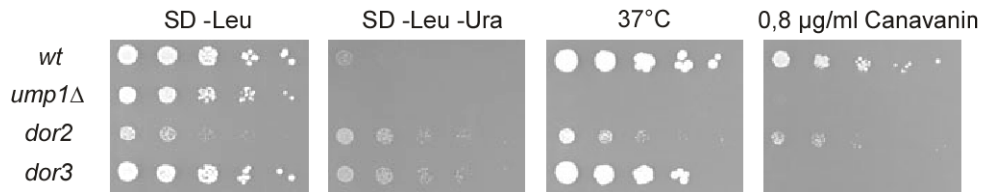


Abb. 21 Wachstumsanalyse der *dor*-Mutanten

Zellen aus einer Übernachtskultur wurden in verschiedenen Verdünnungen auf SD-Agar aufgetropft und für 3-4 Tage inkubiert. wt: ML82, *ump1Δ*: JD59 *LEU2::P_{CUP1}-RPN4-ek-ha-URA3*, *ump1Δ::HIS3*.

Die Untersuchung der Wachstumseigenschaften der verbliebenen Mutanten *dor2* und *dor3* zeigten, dass die *dor2*-Mutation zwar generell einen Wachstumsdefekt verursacht, jedoch nicht zu einer Hypersensitivität gegenüber hohen Temperaturen oder Canavanin führt (Abb. 21). Hingegen bewirkt die Mutation in *dor3* bei 30° oder 37°C nur eine leichte Verlangsamung des Wachstums, führt jedoch zu einer starken Hypersensitivität gegenüber Canavanin. Zum Vergleich wurde das Konstrukt *P_{CUP1}-RPN4-ek-ha-URA3* ebenfalls in den Stamm JD59 (*Mata*, *ump1Δ::HIS3*) integriert. Die Deletion von *ump1* führt zu einer starken Sensitivität gegenüber erhöhten Temperaturen und Canavanin, jedoch reicht die Stabilisierung des Rpn4-Ura3-Testsubstrats nicht aus um zur Uracilprototrophie zu führen (siehe auch Kap. 3.1.5).

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Mutationen in *DOR2* und *DOR3* auf die Stabilität von Rpn4 wurden die entsprechenden Stämme mit Plasmiden transformiert, die für Rpn4-ha bzw. für Flag-6His-Rpn4-ha kodierende DNA-Sequenzen enthielten. In Wildtypzellen war nur ein geringer Unterschied zwischen der Stabilität der verschiedenen Rpn4-Varianten zu beobachten (Abb. 22). Die *dor2*-Mutante zeigte hingegen eine deutliche Stabilisierung des Rpn4-Proteins. Eine zusätzliche Beeinträchtigung des ubiquitin-unabhängigen Abbaus von Rpn4 durch N-terminale Fusion mit einem Flag-Epitop führte hier nicht zu einer stärkeren Stabilisierung (Daten nicht gezeigt). Dies deutete daraufhin, dass durch diese Mutation ein genereller Schritt im Abbau des Rpn4-Proteins beeinträchtigt sein könnte, auf den beide Abbau-Mechanismen angewiesen sind.

Im Gegensatz dazu führte die Mutation von *DOR3* nur zu einer moderaten Stabilisierung des Rpn4-ha-Proteins. Das zusätzlich N-terminal mit einem epitopmarkierte Protein (Flag-

Rpn4-ha) wurde jedoch deutlich stabilisiert. Dies deutete daraufhin, dass in der *dor3*-Mutante der von Ubiquitin abhängige Mechanismus des Rpn4-Abbaus gestört ist.

A

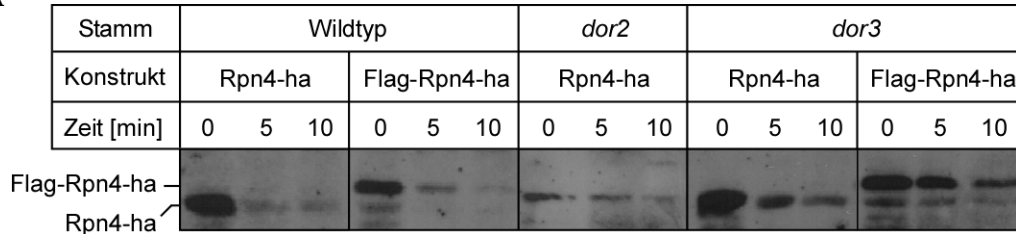
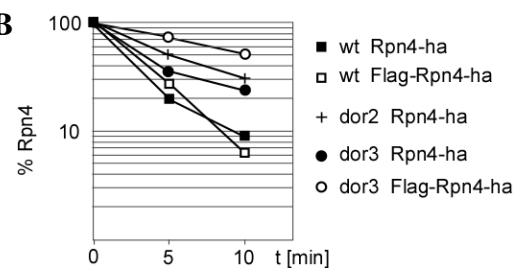


Abb. 22 Analyse des Abbaus von Rpn4 und Flag-Rpn4 in Wildtyp und *ump3*-Mutante

Nach Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid zu einer Kultur exponentiell wachsender Hefen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. (A) Die Proteine wurden nach Extraktion durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-ha-Antikörpern detektiert. (B) Quantifizierung der Signale.

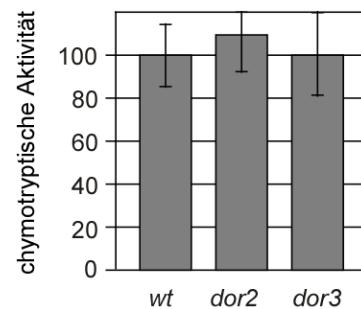
B



Um eine generelle Beeinträchtigung des Proteasoms auszuschließen, wurde die chymotryptische Aktivität des Proteasoms in Wildtypzellen und in Zellen der Mutanten *dor2* und *dor3* bestimmt. Zumindest für diese Aktivität konnte in den drei untersuchten Stämmen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Aktivität oder die Menge des Proteasoms scheint im Vergleich zur Menge an Gesamtprotein in diesen drei Stämmen vergleichbar zu sein (Abb. 23).

Abb. 23 Chymotryptische Aktivität des Proteasoms in Rohextrakten aus Wildtypzellen und Zellen der Stämme *dor2* und *dor3*

Die Aktivität im Rohextrakt (U/mg Gesamtprotein) wurde im Verhältnis zur Aktivität in Wildtyp-Extrakten (=100%) berechnet. Dargestellt ist das Ergebnis aus drei unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.



3.1.6 Klonierung des durch *dor2* betroffenen Gens

Die Komplementation des durch die *dor2*-Mutation ausgelösten Wachstumsverlustes sollte zur Klonierung des betroffenen Gens benutzt werden. Zellen des *dor2*-Stammes wurden mit verschiedenen plasmidbasierten Genbanken transformiert. Die Verwendung einer Genbank, die auf einem 2 μ -DNA enthaltenden Plasmid basierte (Nasmyth *et al.*, 1980), führte zur Isolation von sieben Kolonien, die ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum zeigten. Nach Retransformation des *dor2*-Stammes mit den isolierten Plasmiden konnte jedoch nur für ein Plasmid eine Komplementation des Wachstumsdefektes beobachtet werden. Parallel wurde eine Genbank benutzt, die auf einem eine Centromersequenz tragenden Plasmid basiert (Rose *et al.*, 1987). Hier sind nur je eine oder zwei Kopien pro Zelle vorhanden. Die Transformation mit der zweiten Genbank führte zur Isolation von sechs Kolonien. Aus vier dieser Kolonien konnten Plasmide isoliert werden, die nach wiederholter Transformation des *dor2*-Stammes eine Komplementation des Wachstumsdefektes hervorriefen.

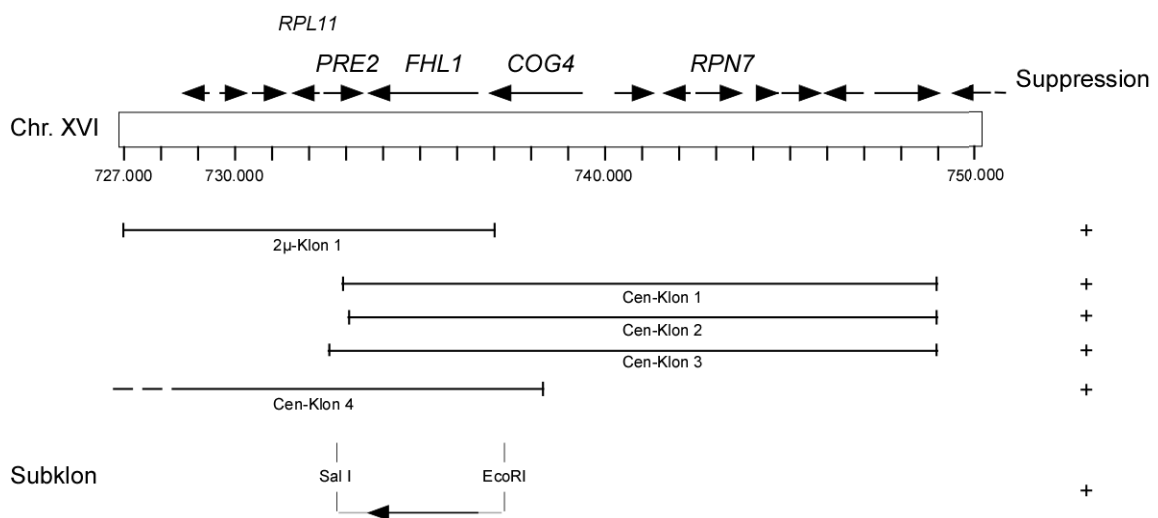


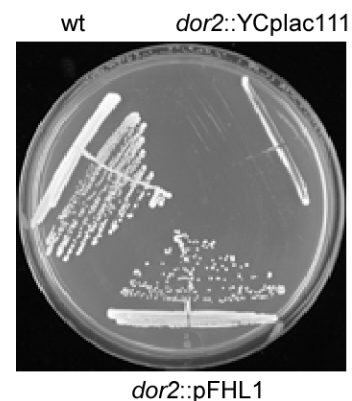
Abb. 24 Schematische Darstellung der in den isolierten Genbankplasmiden enthaltenen genomischen DNA-Fragmente

Die Pfeile symbolisieren die enthaltenen offenen Leserahmen (ORF), die Zahlen geben die Lage des Abschnitts auf dem jeweiligen Chromosom wieder. Die zur Subklonierung verwendeten Restriktionsstellen sind angegeben.

Die Sequenzanalyse der auf diese Weise isolierten Plasmide ergab, dass in allen ein Fragment von Chromosom XVI enthalten war (zwischen Position 720.000 und 749.000). Das

einziges in allen Fragmenten enthaltene Gen war das *FHL1*-Gen. Dies deutete daraufhin, dass *dor2* und *FHL1* allel zu einander sind (Abb. 24). Die Subklonierung eines *SalI*-*EcoRI*-Fragmentes, das den ORF des *FHL1*-Gens und flankierende Sequenzen enthielt, in den Vektor YCplac111 (*Cen-LEU2*) resultierte in einem Plasmid, das ebenfalls den Wachstumsdefekt der *dor2*-Mutante supprimierte (Abb. 25). Interessant ist, dass in direkter Nachbarschaft zu *FHL1* die Gene *PRE2* und *RPN7* lokalisiert sind, die für Untereinheiten des 20S- bzw. des 19S-Komplexes kodieren.

Abb. 25 Suppression des Wachstums-defektes der *dor2*-Mutante durch Expression des *FHL1*-Gens
Zellen des Stammes *dor2* wurden mit dem Kontrollplasmid YCplac111 oder mit dem Plasmid pFHL1 transformiert und für 3 Tage bei 30°C unkubiert.



3.1.7 Rpn4 ist Bestandteil eines Proteinkomplexes

Die bisher geschilderten Experimente zeigten, dass die Menge von Rpn4 direkt durch das Proteasom reguliert wird. Dadurch wird eine Verbindung zwischen proteasomaler Aktivität und Proteasombiogenese hergestellt. Einige der Ergebnisse und publizierte Daten anderer Gruppen deuteten daraufhin, dass Rpn4 einem ungewöhnlichen Abbaumechanismus unterliegt, der unabhängig von einer Ubiquitylierung des Substratproteins stattfindet. Die direkte Assoziation von Rpn4 mit dem 26S-Proteasom (Fujimuro *et al.*, 1998; Xie und Varshavsky, 2001) bietet hier eine Erklärungsmöglichkeit für diesen von Ubiquitin unabhängigen Proteinabbau. Um die Funktionsweise des Rpn4-Proteins und den Mechanismus seines Abbaus weiter zu charakterisieren, sollte untersucht werden, ob Rpn4 mit anderen zellulären Proteinen interagiert.

Zur Untersuchung vorhandener Komplexe, die mit Rpn4 assoziiert sind, wurde zunächst eine Gelfiltration von Proteinrohextrakten durchgeführt. Hierbei wurden Proteinkomplexe ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Analyse eines Extraktes aus Hefezellen, die eine C-terminal HA-epitopmarkierte Variante des Rpn4-Proteins exprimierten, wurde in einer Superose-Säule (Superose 6 HR10/30, Amersham-Pharmacia) durchgeführt. Zum Vergleich wurde ebenfalls ein Rohextrakt aus Hefezellen analysiert, in denen C-terminal HA-Epitop-markierte Varianten des Pup1 (β 2)-Proteins des Proteasoms und des proteasomspezifischen Reifungsfaktors Ump1 exprimiert wurden (Abb. 26). Diese Proteine erlauben eine Zuordnung der in den Fraktionen enthaltenen Proteasomkomplexe. Die Formen des 26S- und 20S-Proteasoms finden sich in den Fraktionen 13-21. Sie sind charakterisiert durch die prozessierte reife Form des Pup1-Proteins und die Abwesenheit der unprozessierten Pro-Form. In diesen Fraktionen ist auch die proteasomale Aktivität detektierbar. In den Fraktionen 22-23 liegt der Halbproteasom-Vorläuferkomplex vor, erkennbar an der unprozessierten Pro-Form des Pup1-Proteins und am Vorhandensein des Proteasomreifungsfaktors Ump1, der im reifen 20S-Proteasom rasch abgebaut wird (Ramos et al., 1998). Freie Untereinheiten finden sich in den Fraktionen 29 und 30.

Die Analyse der Verteilung des Rpn4-Proteins durch die Methode der Gelfiltration ergab, dass hier keine Assoziation mit Proteasomkomplexen vorlag. Rpn4 wurde hauptsächlich in den Fraktionen 23-25 detektiert, in denen Komplexe der Größe zwischen 200 und 400kDa vorliegen. Das Rpn4-Protein besitzt rechnerisch eine molekulare Masse von ca. 60kDa. Die Analyse der Proteine Ferritin (440kDa) und Catalase (232kDa), die zum Vergleich durchgeführt wurde, ergab für Ferritin eine Verteilung in den Fraktionen 21-23, während Catalase hauptsächlich in den Fraktionen 24-26 detektiert wurde. Die Tatsache, dass der Hauptteil des Rpn4-Proteins vor der Catalase von der Gelfiltrationssäule eluiert, zeigt, dass dieses Protein nicht frei in der Zelle vorliegt, sondern Bestandteil eines Proteinkomplexes ist. Da die Elutionsdauer eines Proteins in grober Näherung proportional zum Logarithmus seiner molaren Masse ist, wurde für den Rpn4-Komplex unter Berücksichtigung des Elutionsverhaltens der bekannten Proteine Ferritin und Catalase eine molare Masse von ca. 290kDa abgeleitet.

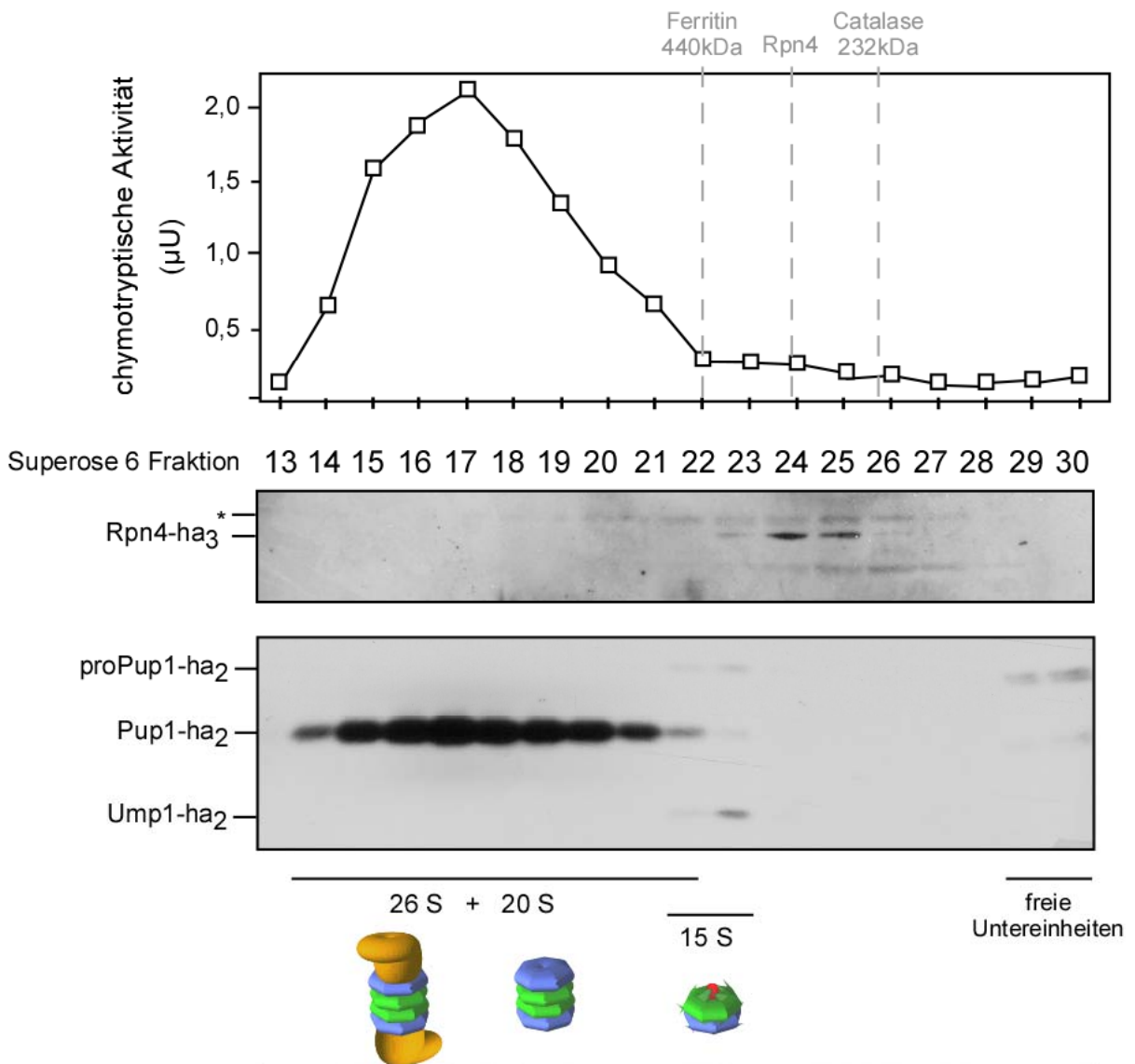


Abb. 26 Analyse des Rpn4-Proteins und proteasomaler Komplexe durch Gelfiltration

Proteinhaltige Rohextrakte des Stammes ML31 (*ump4*, *RPN4-ha3::HIS3-MX6*) und des Stammes JD131 (*PUP1-ha2::URA3*, *UMP1-ha2::LEU2*) wurden durch Zerkleinern der Zellen unter flüssigem Stickstoff im Mörser gewonnen. Je 1mg Gesamtprotein wurde mit Hilfe der ÄKTA-FPLC Anlage der Firma Amersham-Pharmacia unter Verwendung einer Superose 6-Säule fraktioniert. Eine Probe jeder Fraktion wurde mit Auftragungspuffer versetzt und zur Analyse durch SDS-PAGE und Western-Blot eingesetzt. Das Diagramm zeigt die Verteilung der chymotryptischen Aktivität des Proteasoms in den Fraktionen der Gelfiltration. Die höchste Aktivität wird in den Fraktionen detektiert, die die Komplexe des 26S-Proteasoms enthalten. Schematisch angegeben ist die Lage der Fraktionen, in denen der Hauptteil von Ferritin bzw. Catalase eluieren.

3.1.8 Das Rpn4-Protein ist im Pilzreich konserviert

Die Recherche in verschiedenen Datenbanken unter Benutzung der Programme BLAST bzw. PSI BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) führte zur Identifikation einer Reihe von putativen Orthologen des Rpn4-Proteins der Bäckerhefe. Sowohl in anderen Ascomyceten als auch in einer zu den Basidiomyceten gehörigen Art konnten orthologe Proteine gefunden werden, so in *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccaromyces castellii*, *Kluyveromyces lactis*, *Eremothecium gossypii*, *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Ustilago maydis* (Basidiomycet). In *S. castellii* und in *C. albicans* konnten verschiedene putative Orthologe zu Rpn4 aus *S. cerevisiae* gefunden werden. Anscheinend kam es hier im Lauf der Evolution zu Genverdopplungen. Durch Mutationen könnten sich dann die ursprünglich identischen Sequenzen von einander diversifiziert haben, so dass die heute vorliegende Verwandtschaft entstand. Die computergestützte Analyse einiger dieser Sequenzen wurde zur Erstellung eines Dendrogramms benutzt, das die phylogenetische Verwandtschaft dieser Proteine wiedergibt (Abb. 227). Das Ergebnis verdeutlicht, dass die Verwandtschaft der Rpn4-Orthologen gut mit der allgemeinen phylogenetischen Verwandtschaft der Organismen korreliert.

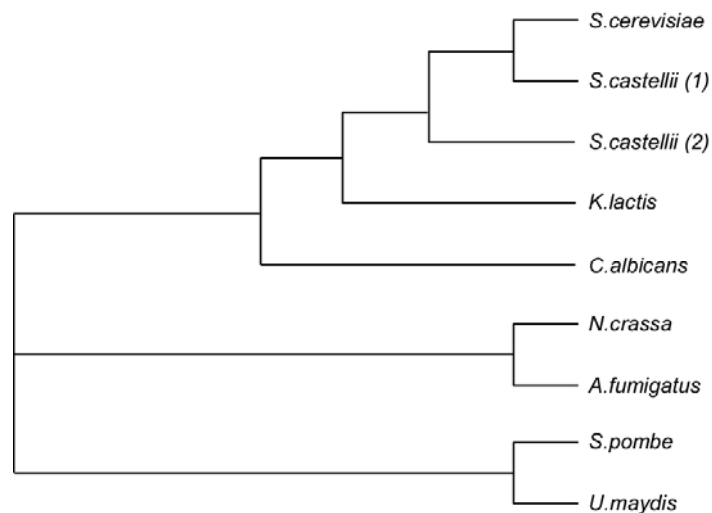


Abb. 27 Phylogenetische Verwandtschaft von Rpn4-Proteinen verschiedener Spezies

Das Programm T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) wurde zur Erstellung eines Sequenzvergleiches der verschiedenen Rpn4-Proteine benutzt. Aus den errechneten Sequenzhomologien wurde dann die phylogenetische Verwandtschaft berechnet und als Dendrogramm dargestellt. Die Längen der Äste des Dendrogramms geben nicht die evolutionäre Entfernung der Orthologen wieder. Die Analyse der Rpn4-Homologen wurde mit Unterstützung durch Hartmut Scheel (Memorec Biotec GmbH) durchgeführt.

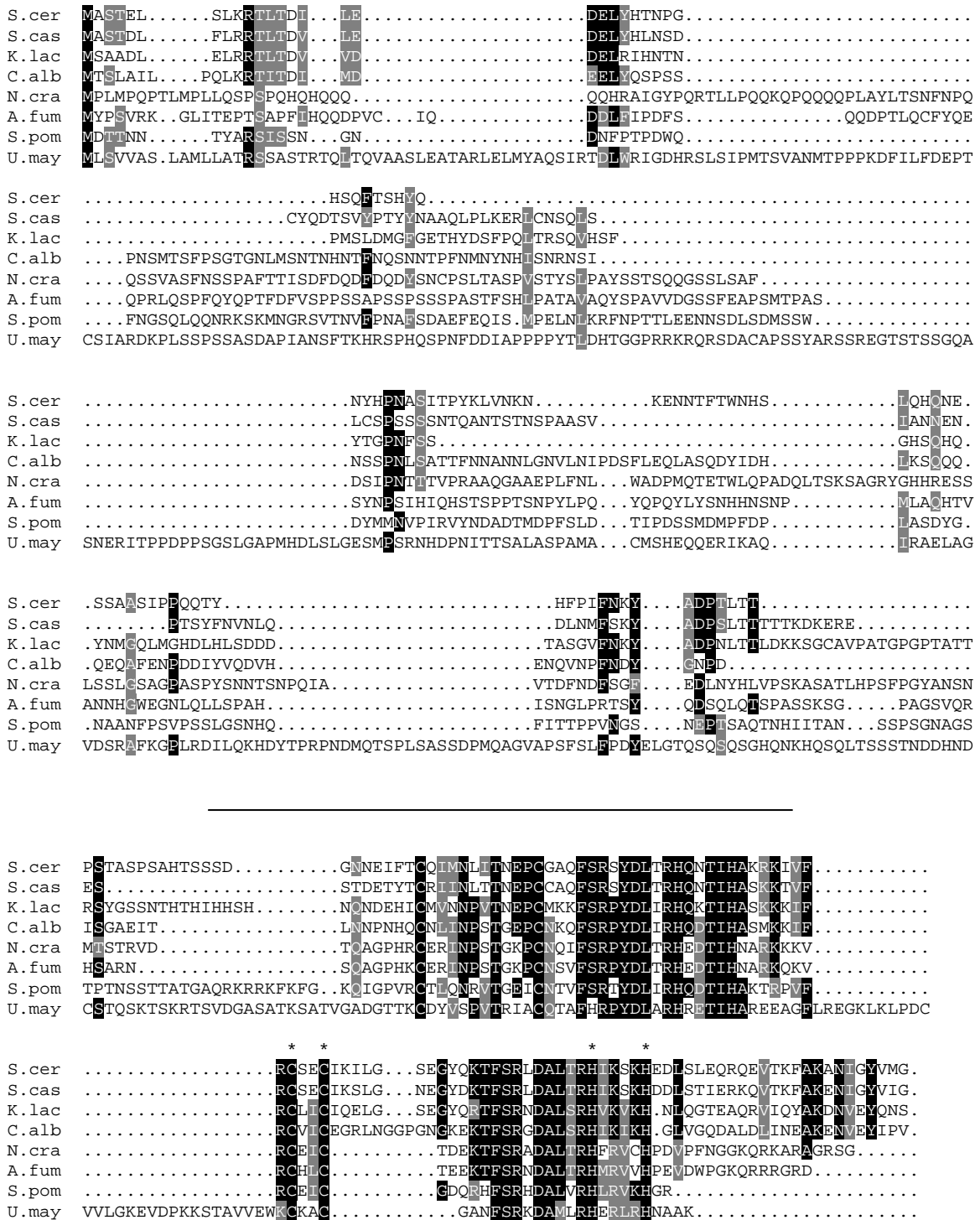


Abb. 28 Sequenzvergleich der Rpn4-Proteine aus verschiedenen Spezies

Oben: Sequenzvergleich der N-Termini, Unten: Sequenzvergleich der C-Termini der Rpn4-Orthologe.

Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000), die Bearbeitung der alinierten Sequenzen mit dem Programm Boxshade (K. Hofman und M. Baron) durchgeführt. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Die Analyse der Rpn4-Homologen wurde mit Unterstützung durch Hartmut Scheel (Memorec Biotec GmbH) durchgeführt.

* Lage der Zink-bindenden Aminosäurereste der C2H2-Zinkfinger-Domäne (Nach Mannhaupt *et al.*, 1999).
S.cer.: *Saccharomyces cerevisiae*, *S.cas.*: *Saccharomaces castellii*, *K.lac.*: *Kluyveromyces lactis*, *C.alb.*: *Candida albicans*, *N.cra.*: *Neurospora crassa*, *A.fum.*: *Aspergillus fumigatus*, *S.pom.*: *Schizosaccharomyces pombe*, *U.may.*: *Ustilago maydis*.

Die Primärsequenz der hier identifizierten Proteine wurde mit Hilfe des Programms T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) einem Sequenzvergleich unterzogen. Der Sequenzvergleich der verschiedenen Rpn4-Proteine zeigt, dass insgesamt über große Teile des Proteins nur eine schwache Konservierung vorliegt. Stärkere Konservierungen finden sich im Bereich des N-Terminus und in der Zinkfinger-Domäne am extremen C-Terminus des Proteins (Abb. 28).

3.2 Rpn4 ist Teil eines Netzwerkes, das die Antwort auf verschiedene Stresssituationen kontrolliert

3.2.1 Die Deletion von *RPN4* führt zur Sensitivität gegen DNA-schädigende Substanzen und gegen Koffein

Untersuchungen zur Reaktion von Hefezellen auf verschiedene Chemikalien ergaben, dass Rpn4 nicht nur Gene des Ubiquitin/Proteasom-Systems kontrolliert, sondern dass insgesamt die Expression von über 700 Genen direkt oder indirekt durch Rpn4 beeinflusst wird (Jelinsky *et al.*, 2000). Besonders interessant war hier die Verbindung zu Genen, deren Produkte eine Funktion in der Reparatur von DNA-Schäden besitzen. Auch das Ubiquitin/Proteasom-System spielt eine Rolle in der DNA-Reparatur (Ortolan *et al.*, 2000; Hoege *et al.*, 2002).

Die Zugabe der alkylierenden Substanz Methylmethansulfonat führt zur Anhäufung von DNA-Schäden. Koffein hingegen bewirkt, dass ein wichtiger Kontrollpunkt des Zellzyklus, der die Intaktheit der DNA kontrolliert, übergangen wird (Schlegel und Pardee, 1986; Rowley und Zhang, 1999; Moser *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2003). So können sich ebenfalls Mutationen in der DNA anhäufen.

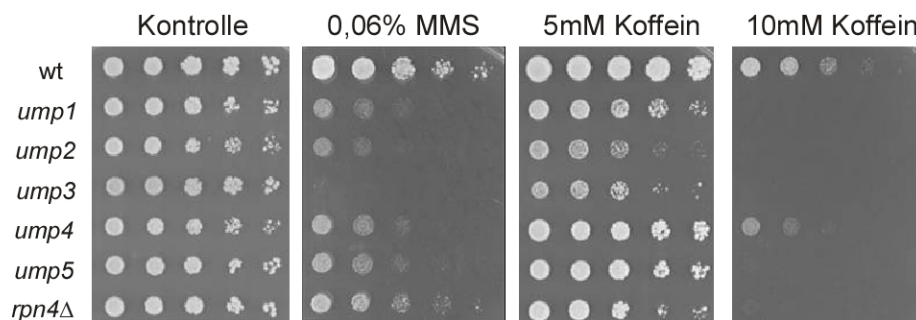


Abb. 29 Wachstumsanalyse von *ump*-Mutanten und der *rpn4*-Deletionsmutante in Anwesenheit von Methylmethansulfonat (MMS) oder von Koffein

Zellen aus einer Übernachtskultur wurden in geeigneten Verdünnungen auf YPD-Agar aufgetropft und für 2-4 Tage inkubiert. Wenn angegeben, wurden dem Medium 0,06% MMS oder 5 bzw. 10mmol/l Koffein zugesetzt.

Abb. 29 zeigt, dass sowohl *ump*-Mutanten als auch die *rpn4*Δ-Mutante durch MMS und Koffein in ihrem Wachstum stark behindert werden. Dies zeigt, dass die Zelle das Rpn4-Protein sowohl bei Zugabe von DNA-schädigenden Substanzen als auch von Koffein

benötigt, um angemessen auf diesen Stress reagieren zu können. Interessant ist, dass die Deletion von *RPN4* keine der typischen Phänotypen von *ump*-Mutanten bewirkte (Sensitivität gegen Canavanin oder Cadmiumchlorid), aber eine starke Sensitivität gegen MMS und Koffein auslöste. Es stellte sich die Frage, ob die Sensitivität hier durch die Unfähigkeit ausgelöst wurde höhere Menge aktiver Proteasomen zu generieren, oder ob die fehlende Induktion anderer Gene, die nicht das Proteasom betreffen, dafür verantwortlich war.

3.2.2 Die Expression von *RPN4* wird durch Zugabe von Methylmethansulfonat gesteigert

Um die Rolle von Rpn4 in Anwesenheit DNA-schädigender Substanzen zu untersuchen, wurde die Menge des Rpn4-Proteins und der *RPN4*-mRNA nach Zugabe von MMS analysiert. Eine Kultur exponentiell wachsender Hefezellen wurde mit 0,1% MMS versetzt. Ein Teil der Kultur blieb zur Kontrolle unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und zur Extraktion von Proteinen oder von RNA benutzt. Die Zugabe von MMS bewirkte eine rasche Zunahme des Rpn4-Proteins (Abb. 30). Die Analyse der mRNA zeigt, dass dieser Anstieg auf eine starke Erhöhung der *RPN4*-Genexpression zurückzuführen ist. Die Menge der *RPN4*-mRNA beträgt nach 15min das 4,7-fache, nach 30min das 6,6-fache der Ausgangsmenge. Im gleichen Zeitraum steigt die Expression des *PRE8*-Gens um ca. 70%. Abb. 31 zeigt, dass die Zugabe von MMS keinen Einfluss auf die Stabilität des Rpn4-Proteins besitzt.

Abb. 30 Die Zugabe von MMS bewirkt eine Induktion der *RPN4*-Genexpression

Analyse der Veränderung der Menge des Rpn4-Proteins und der *RPN4*- und *PRE8*-mRNA nach Zugabe von 0,1%MMS. Nach Zugabe von 0,1% MMS wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach Extraktion der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern detektiert. Nach Extraktion der RNA aus Zellen derselben Kultur wurde diese in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Nachweis spezifischer mRNA-Spezies erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, genspezifischen Sonde.

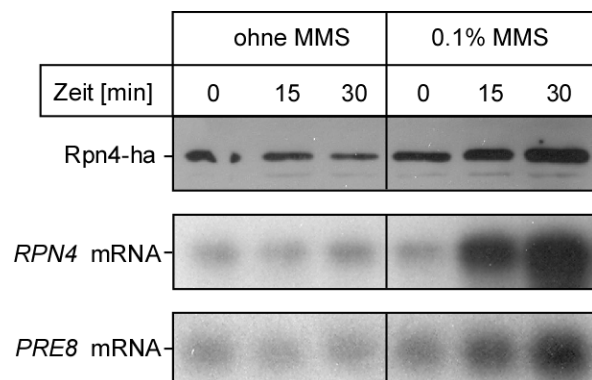
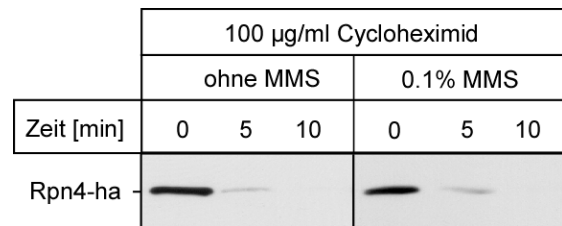


Abb. 31 MMS zeigt keinen Einfluss auf die Stabilität von Rpn4

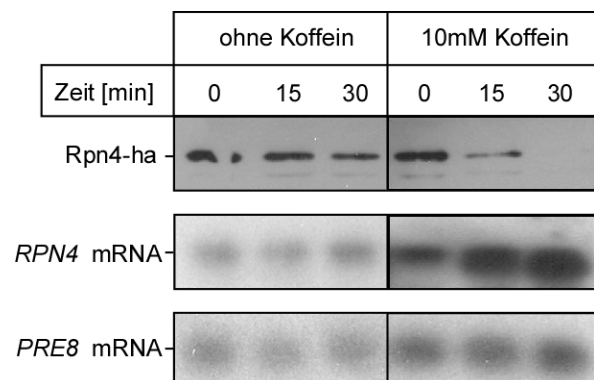
10min nach Zugabe von 0,1% MMS wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid gestoppt, und zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Nach Extraktion der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern detektiert.

**3.2.3 Die Zugabe von Koffein führt zu einem Verlust des Rpn4-Proteins**

Wie im Falle von MMS führte auch die Zugabe von Koffein zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums von Zellen, in denen das *RPN4*-Gen deletiert war. Auch hier wurde die Menge des Rpn4-Proteins und der *RPN4*-mRNA nach Zugabe von Koffein analysiert. Eine Kultur exponentiell wachsender Hefezellen wurde mit 10mmol/l Koffein versetzt. Ein Teil der Kultur blieb zur Kontrolle unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und zur Extraktion von Proteinen oder von RNA benutzt. Im Gegensatz zu MMS bewirkte die Zugabe von Koffein eine Abnahme des Rpn4-Proteins (Abb. 32). Bereits nach 15min war die Rpn4-Menge deutlich reduziert, während nach 30min kein Protein mehr zu detektieren war. Die Analyse der *RPN4*-mRNA zeigt, dass gleichzeitig eine leichte Induktion der *RPN4*-Transkription zu beobachten war. Die *RPN4*-mRNA-Menge beträgt nach 30min ca. das 2,4-fache des Ausgangswertes. Die Menge der mRNA des *PRE8*-Gens ist in diesem Zeitraum nahezu unverändert.

Abb. 32 Die Zugabe von Koffein bewirkt eine Abnahme der Rpn4-Menge

Nach Zugabe von 10mM Koffein wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach Extraktion der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern detektiert. Die extrahierte RNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Nachweis spezifischer mRNA-Spezies erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten, genspezifischen Sonde.



Zur Untersuchung der Rpn4-Stabilität nach Zugabe von Koffein wurden Zellen des Stammes ML16 (*ump1-1, RPN4-3xha::HIS3-MX6*) benutzt, da hier der proteasomale Abbau gegenüber dem in Wildtyp-Zellen reduziert ist (siehe Kap. 3.1.4). Die Analyse der „steady-state“-Konzentration zeigt, dass auch in diesen Zellen ein Rückgang der Rpn4-Menge nach Zugabe von Koffein zu beobachten ist (Abb. 33). Nach Zugabe von Cycloheximid wurde die Stabilität von Rpn4 bestimmt. Die Halbwertszeit von Rpn4 ist unter diesen Bedingungen deutlich verkürzt (Abb. 33).

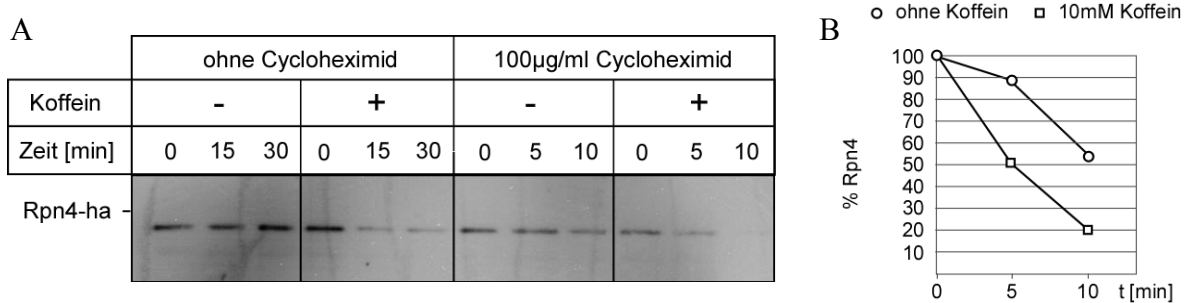


Abb. 33 Die Zugabe von Koffein führt zu einem beschleunigten Abbau von Rpn4

(A) Zur Bestimmung der „steady-state“-Konzentration von Rpn4 in Abhängigkeit von Koffein wurden Proben aus einer exponentiell wachsenden Kultur des Stammes ML16 entnommen. Zur Bestimmung der Stabilität von Rpn4 wurde 10min nach Zugabe von 10mmol/l Koffein die Proteinsynthese durch Zugabe von 100µg/ml Cycloheximid gestoppt und nach bestimmten Zeiten Proben entnommen. Nach Extraktion der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern detektiert. (B) Quantifizierung der Signale aus dem Experiment zur Bestimmung der Abbaurrate.

Die Zugabe von Koffein könnte auch bewirken, dass Rpn4 in ein anderes zelluläres Kompartiment transportiert wird oder stärker an DNA bindet, so dass es weniger effizient extrahierbar ist. In einem zu Abb. 32 vergleichbaren Experiment, in dem durch Aufkochen ganzer Zellen in SDS-Probenpuffer eine nahezu vollständige Extraktion der Proteine erfolgte, konnte kein Unterschied zu dem Ergebnis in Abb. 32 festgestellt werden.

Da die Zugabe von Koffein anscheinend den Abbau oder zumindest eine Prozessierung des Rpn4-Proteins induziert, stellte sich die Frage, ob dieser Mechanismus auf den ubiquitin-abhängigen oder -unabhängigen Abbauweg des Proteins angewiesen ist. Zur Klärung dieser Frage wurde untersucht, welche Auswirkung die Zugabe von Koffein auf das Rpn4-Protein hat, wenn dessen N-Terminus durch Fusion mit einem Flag-Epitop blockiert war, oder wenn das Experiment in Zellen des *ump3*-Stammes durchgeführt wurde. Abb. 34 zeigt, dass die Blockierung des N-Terminus die koffeinabhängige Reduktion der Rpn4-Menge gänzlich verhinderte. Es konnte keine Reduktion der Rpn4-Menge beobachtet werden. Die Mutation

von *DOA4* in der *ump3*-Mutante bewirkte lediglich eine Verlangsamung der Koffein-abhängigen Reduktion der Rpn4-Menge (Abb. 34). Man kann daraus schließen, dass der durch Koffein ausgelöste Mechanismus von einem freien Zugang zum N-Terminus des Rpn4-Proteins abhängig ist.

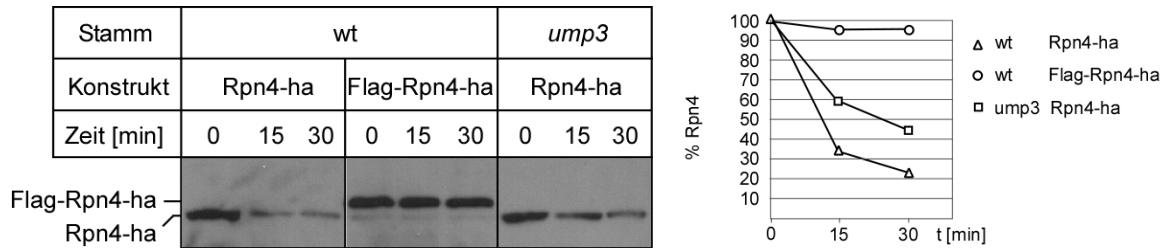


Abb. 34 Analyse des Einflusses von Koffein auf Rpn4 und Flag-Rpn4

(A) Zur Bestimmung der „steady-state“-Konzentration von Rpn4 in Abhängigkeit von Koffein wurden Proben aus einer exponentiell wachsenden Kultur von Hefezellen entnommen. Nach Extraktion der Proteine wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern detektiert. (B) Quantifizierung der Signale.

3.2.4 Isolierung von Suppressoren der Koffeinsensitivität der *rpn4Δ*-Mutante

Durch die Identifikation von Suppressoren der durch Mutationen bewirkten Defekte können die Beziehungen zwischen Genen und zwischen ihren Produkten analysiert werden. Dies kann zu einem besseren Verständnis der Funktion eines Proteins beitragen. Durch die Suche nach Genen, deren Überexpression die Koffeinsensitivität der *rpn4Δ*-Mutation supprimieren, sollte die Funktionsweise des Rpn4-Proteins in der zellulären Antwort auf Koffein untersucht werden. Hierzu wurden Zellen des Stammes ML5 (*rpn4Δ::HIS3-MX6*) mit einer auf dem Plasmid YEp13 basierenden Genbank (2μ *LEU2*, Nasmyth und Tatchell, 1980) transformiert und auf Selektivmedium mit 10mmol/ Koffein ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 Tagen bei 30°C konnten 22 leucinprototrophe koffeinresistente Kolonien aus ca. 20.000 insgesamt transformierten Zellen isoliert werden. Da durch die Transformation das *RPN4*-Gen zurück in die Zelle gelangen könnte, wurde zunächst eine PCR mit für *RPN4* spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. In 18 der 22 isolierten Klone konnte das *RPN4*-Gen nachgewiesen werden. Diese wurden daher nicht weiter bearbeitet.

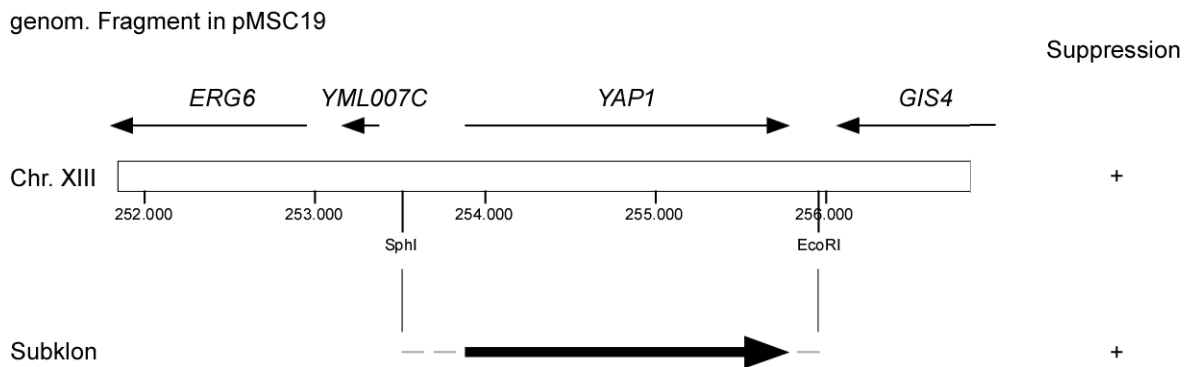


Abb. 35 Schematische Darstellung des in pMSC19 enthaltenen genomischen DNA-Fragmentes

Die Pfeile symbolisieren die enthaltenen offenen Leserahmen (ORF), die Zahlen geben die Lage des Abschnitts auf dem jeweiligen Chromosom wieder. Die zur Subklonierung verwendeten Restriktionsstellen sind angegeben.

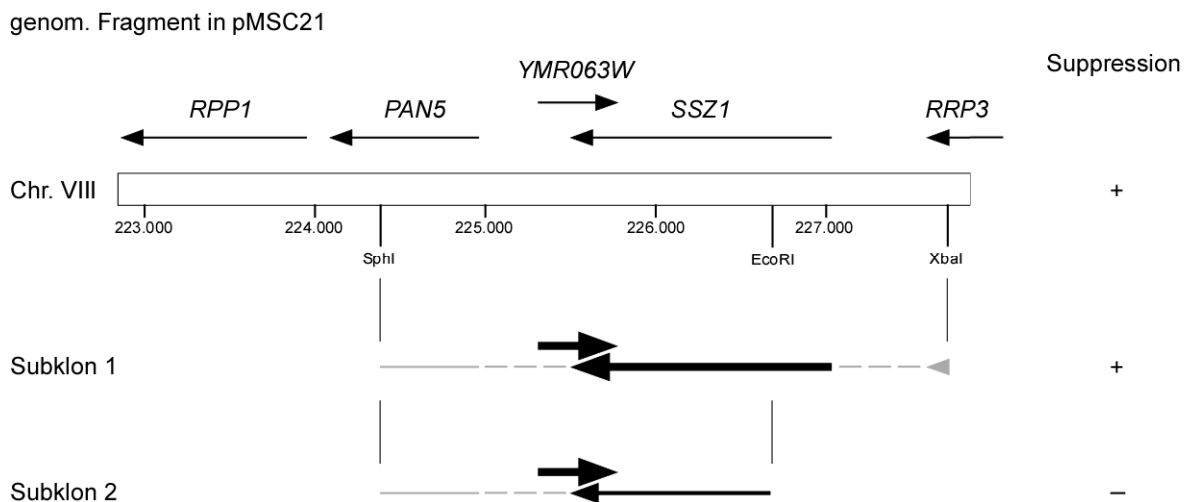


Abb. 36 Schematische Darstellung des in pMSC21 enthaltenen genomischen DNA-Fragmentes

Die Pfeile symbolisieren die enthaltenen offenen Leserahmen (ORF), die Zahlen geben die Lage des Abschnitts auf dem jeweiligen Chromosom wieder. Die zur Subklonierung verwendeten Restriktionsstellen sind angegeben.

Zwei der vier verbliebenen Klone zeigten nach erneutem Ausstreichen auf koffeinhaltigem Medium keine Wachstumsfähigkeit mehr und wurden daher ebenfalls nicht weiter berücksichtigt. Aus den zwei verbliebenen unbekanntem Klonen 19 und 21 wurden die Genbankplasmide isoliert und zur Retransformation des Stammes ML5 benutzt. Beide Plasmide führten nach Retransformation wieder zur Suppression der Koffeinsensitivität. Die Sequenzierung der als pMSC19 (MSC = Multicopy Suppressor of Caffeine sensitivity) und

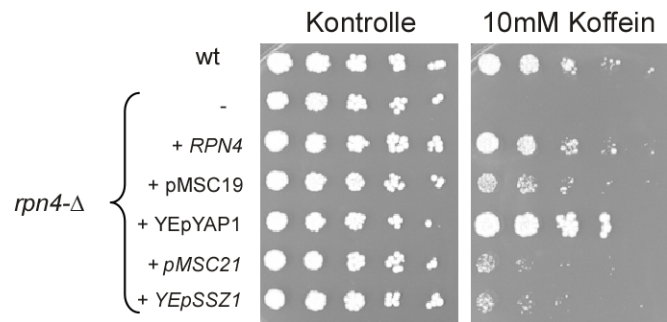
pMSC21 bezeichneten Plasmide ergab, dass das Plasmid pMSC19 ein Fragment des Chromosoms 13 (251856 - 256847; Abb. 35), das Plasmid pMSC21 ein Fragment des Chromosoms 8 (222728 - 227896) enthielt (Abb. 36).

Eine Recherche zu den in diesen Fragmenten enthaltenen Genen ergab, dass das in pMSC19 enthaltene *YAP1*-Gen sowie das in pMSC21 enthaltene *SSZ1*-Gen wahrscheinlich die den supprimierenden Effekt vermittelnden Gene darstellen. *YAP1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der zur Antwort auf oxidativen Stress benötigt wird (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004). Das *Ssz1*-Protein gehört zur Familie der Hitzeschockproteine der Hsp70-Klasse. Es ist eine Untereinheit des RAC-Komplexes (ribosome-associated complex) (Gautschi *et al.*, 2001; Gautschi *et al.*, 2002) und reguliert den Transkriptionsfaktor *Pdr1*, der für die Toleranz von Hefezellen gegenüber verschiedenen Stressbedingungen wichtig ist (Hallstrom *et al.*, 1998). Um zu zeigen, dass diese beiden Gene tatsächlich die Suppression der Koffeinsensitivität der *rpn4*-Deletionsmutante bewirken, wurden aus den Plasmiden pMSC19 und pMSC21 DNA-Fragmente subkloniert und auf ihre Fähigkeit zur Suppression getestet. Ein *SphI*-*EcoRI*-Fragment aus pMSC19, das das vollständige *YAP1*-Gen sowie flankierende Sequenzen enthielt, wurde in den Hochkopienzahl-Vektor *YEplac181* subkloniert (Vektor *YEpYAP1*). Analog wurde durch Subklonierung eines *SphI*-*XbaI*-Fragmentes aus pMSC21 das vollständige *SSZ1*-Gen mit flankierenden Sequenzen ebenfalls in den Vektor *YEplac181* eingebracht (Vektor *YEpSSZ1*). Beide Plasmide vermittelten nach Transformation von Zellen des Stammes ML5 (*rpn4Δ::HIS3-MX6*) die Fähigkeit, in Anwesenheit von Koffein zu wachsen (Abb. 37). Da das subklonierte Fragment aus pMSC21 zwei offene Leserahmen enthielt (Subklon 1), wurde hier durch eine weitere Klonierung ein Teil des 5'-Endes des *SSZ1*-Gens deletiert. Das so erhaltene Plasmid vermittelte keine Suppression der Koffeinsensitivität der *rpn4*-Deletionsmutante (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass tatsächlich das *SSZ1*-Gen den supprimierenden Effekt vermittelt.

Die Transformation der *rpn4*-Deletionsmutante mit dem Plasmid *YEpYAP1* führte zu einem deutlich besseren Wachstum verglichen mit der Transformation mit pMSC19. Wahrscheinlich kann das Plasmid *YEpYAP1*, bedingt durch die geringere Insertgröße (ca. 2,5kb verglichen mit ca. 5kb), eine höhere Kopienzahl erreichen, die zu einer noch stärkeren Überexpression führt. Ein ähnlicher Effekt ist für das Gen *SSZ1* nicht zu beobachten.

Abb. 37 Suppression der Koffeinsensitivität der *rpn4*-Deletionsmutante durch Überexpression von *YAP1* und *SSZ1*

Der Stamm ML5 (*rpn4*-Δ::*HIS3-MX6*) wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Anschließend wurden Zellen einer Übernacht-Kultur in geeigneten Verdünnungen auf YPD-Medium mit oder ohne 10mM Koffein aufgetropft und für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.



Die Beziehung von Genen zueinander kann durch Analyse und Vergleich von Doppel- und Einzelmutanten der interessanten Gene untersucht werden. Um mehr über die Beziehung zwischen *RPN4* und *YAP1*, bzw. *SSZ1*, zu erfahren, wurde das *RPN4*-Gen in *yap1*Δ- und *ssz1*Δ-Mutanten deletiert. Durch Analyse des Wachstums der so erzeugten Mutanten in Anwesenheit subletaler Konzentrationen von Koffein oder MMS sollte untersucht werden, ob die Kombination verschiedener Deletionen zu detektierbaren synthetischen Phänotypen führt. Wie Abb. 38 zeigt, bewirkt die Deletion von *YAP1* unter den getesteten Bedingungen keinen beobachtbaren Wachstumsnachteil. Die Kombination mit der Deletion von *RPN4* führt nicht zu einem synthetischen Phänotyp, das Wachstum der *rpn4*Δ/*yap1*Δ-Doppelmutante entspricht unter allen untersuchten Bedingungen dem der *rpn4*-Deletionsmutante.

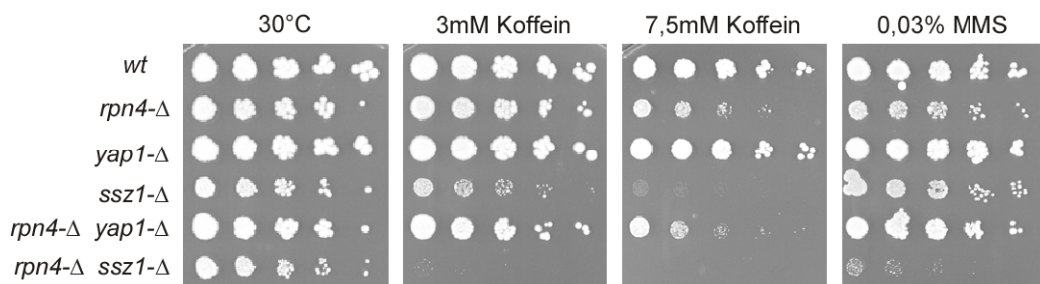


Abb. 38 Untersuchung der Wachstumseigenschaften von *rpn4*-, *yap1*- und *ssz1*-Mutanten in Anwesenheit von Koffein oder MMS

Zellen aus einer Übernachtkultur wurden in geeigneten Verdünnungen auf YPD-Agar aufgetropft und für 2-4 Tage inkubiert. Wenn angegeben, wurden dem Medium 0,03% MMS oder 3 bzw. 7,5 mmol/l Koffein zugesetzt.

Die Deletion von *SSZI* führt zu deutlichen Wachstumsnachteilen. Das Wachstum ist sogar stärker eingeschränkt als das der *rpn4Δ*-Mutante. Die Kombination beider Deletionen führt zu einem ausgeprägten synthetischen Defekt. Dies zeigt, dass Rpn4 und Ssz1 nicht redundante aber sich ergänzende Funktionen besitzen, die für das Wachstum von Zellen unter Stressbedingungen wichtig sind. Werden beide Funktionsbereiche gleichzeitig beeinträchtigt, so resultiert dies in einem deutlich verringerten Zellwachstum.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation der Expression proteasomaler Gene eingehender zu untersuchen. Nachdem Vorarbeiten gezeigt hatten, dass die Expression dieser Gene von der proteasomalen Aktivität abhängig ist (J. Dohmen, persönliche Mitteilung), sollte der Mechanismus dieser Autoregulation der Menge aktiver Proteasomen näher untersucht und beteiligte Komponenten identifiziert werden. Da das Protein Rpn4 als ein für die basale Expression proteasomaler Gene verantwortlicher Transkriptionsfaktor beschrieben worden war (Mannhaupt *et al.*, 1999), wurde zunächst untersucht, ob dieses Protein auch eine Funktion in der Autoregulation der Menge aktiver Proteasomen in Abhängigkeit von der proteasomalen Aktivität besitzt. Nachdem erste Versuche diese Vermutung bestätigten, wurde anschließend untersucht, wie die Aktivität von Rpn4 durch das Proteasom reguliert wird. Rpn4 wurde ebenfalls als zentraler Faktor in der Vermittlung anderer durch Stress induzierter Zellantworten beschrieben (Jelinsky *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wurde die Verbindung dieser Antworten zum Ubiquitin/Proteasom-System untersucht.

4.1 Der Transkriptionsfaktor Rpn4 reguliert die Expression proteasomaler Gene und ist ein Substrat des Proteasoms

Die Suche nach Komponenten des Ubiquitin/Proteasom-Systems, die am Abbau von Modellsubstraten beteiligt sind, führte zur Isolierung von 5 Mutanten, die als *ump*-Mutanten (Ubiquitin mediated proteolysis) bezeichnet wurden (Ramos *et al.*, 1998); Keck, 1999; London *et al.*, 2004). Die so identifizierten Gene kodieren für Komponenten, die an der Assemblierung und Reifung des Proteasoms (Ump1) oder dem Recycling des Ubiquitins (Ump3/Doa4) beteiligt sind, oder die Bestandteile des 20S-Proteasoms (Ump2/Pup1, Ump4/Pre4) beziehungsweise des 19S-Komplexes (Ump5/Rpt3) sind. Die Analyse der Mutationen erbrachte neue Erkenntnisse zum Mechanismus der Assemblierung und Reifung des 20S-Proteasoms und zum Verständnis der Ubiquitin-Homöostase (Ramos *et al.*, 1998); Keck, 1999; (Burri *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2004).

Die Analyse der Mutationen führte auch zu der Beobachtung, dass bei reduzierter proteasomaler Aktivität eine erhöhte Menge verschiedener Untereinheiten des

20S-Proteasoms vorlag (Ramos *et al.*, 1998); Keck, 1999). Die Untersuchung der mRNA-Menge der entsprechenden Gene zeigte, dass die Transkription dieser Gene in Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht war (Keck, 1999). Dies deutete daraufhin, dass ein Proteasom-abhängiger Schritt die Transkription proteasomaler Gene kontrollierte. Die Entdeckung der sogenannten PACE-Sequenz (Proteasome Associated Control Element, Sequenz: GGTGGCAAA) in den Promotoren fast aller proteasomalen Untereinheiten führte zur Identifikation des für diese Gene spezifischen Transkriptionsfaktors Rpn4 (Mannhaupt *et al.*, 1999). Dieses Protein war bereits als mit dem Proteasom assoziiert beschrieben worden (Fujimuro *et al.*, 1998). Diese Eigenschaften machten es wahrscheinlich, dass Rpn4 auch in der Autoregulation des Proteasoms eine wichtige Funktion übernehmen könnte.

4.1.1 Rpn4 reguliert die Expression von Genen des Ubiquitin/Proteasom-Systems

Die Analyse der Expression proteasomaler Gene zeigte, dass bei verminderter proteasomaler Aktivität eine deutliche Transkriptionsinduktion eintrat. Die mRNA-Menge der untersuchten Gene zeigte einen Anstieg um einen Faktor von ca. 2-3, wenn eine Mutation in *UMP1*, *UMP2*, *UMP4* oder *UMP5* vorlag (Abb. 4). In Zellen, die zusätzlich zu einer Mutation in *UMP2* oder *UMP4* eine Deletion des *RPN4*-Gens trugen, konnte die Erhöhung der mRNA-Mengen nicht beobachtet werden (Abb. 5). Man kann daraus schließen, dass Rpn4 tatsächlich Bestandteil des autoregulatorischen, die Menge aktiver Proteasomen kontrollierenden Mechanismus ist, und dass es in *Saccharomyces cerevisiae* kein Protein mit einer zu Rpn4 redundanten Funktion gibt, das dessen Ausfall ersetzen kann.

Die Deletion von *RPN4* bewirkte eine Reduktion der gesamten chymotryptischen Aktivität auf ca. 50% des Wertes, der für Wildtypzellen ermittelt wurde (Abb. 9). Dies zeigte, dass in Abwesenheit von Rpn4 die basale Expression zumindest einiger proteasomaler Gene deutlich reduziert ist. Die mRNA-Menge des *PRE8*-Gens war in Abwesenheit von Rpn4 um ca. 35% reduziert, während für das *PRE1*-Gen kein signifikanter Rückgang beobachtet wurde. Da die Bildung intakter 26S-Proteasomen auf einem stöchiometrischen Verhältnis aller Untereinheiten beruht, ist die Verringerung der Expression eines einzelnen proteasomalen Gens um 50% ausreichend, um die beobachtete Reduktion der proteasomalen Aktivität zu erklären.

Die Halbierung der Gesamtaktivität ist nicht in Übereinstimmung mit publizierten Daten, die in Abwesenheit von Rpn4 eine stärkere Reduktion der Expression der Gene *RPT4* und *RPT6* auf 20% bzw. 21% beschreiben (Mannhaupt *et al.*, 1999). Allerdings wurde die Expression dieser Gene mit Hilfe des Reportergens für Chloramphenicol-Acetyltransferase quantifiziert, das unter der Kontrolle des Promotors des *RPT4*- bzw. *RPT6*-Gens exprimiert wurde. Der Transfer der Promotorsequenz in einen anderen genetischen Kontext könnte die Expressionsstärke des Reportergens beeinflusst und so zu der beobachteten Differenz geführt haben.

Die Analyse der phänotypischen Auswirkungen der *RPN4*-Deletion zeigte, dass die Funktion von Rpn4 unter normalen Bedingungen für das Zellwachstum nicht benötigt wird (Abb. 6). Auch Bedingungen, die zu einer starken Wachstumsbeeinträchtigung von Mutanten des Ubiquitin/Proteasom-Systems führten, wie z.B. erhöhte Temperatur oder die vermehrte Bildung abnormer Proteine unter dem Einfluss von Cadmiumchlorid oder von Canavanin, bewirkten nur eine leichte Einschränkung des Wachstums der *rpn4Δ*-Mutante. Die Kombination der Deletion von *RPN4* mit einer Mutation in *UMP1*, *UMP2* oder *UMP4* zeigte dagegen deutliche synthetische Effekte (Abb. 6). Bereits unter normalen Wachstumsbedingungen (30°C, YPD) war eine Verschlechterung des Wachstums zu beobachten, die unter Stressbedingungen noch verstärkt wurde. Besonders stark wirkte sich das Fehlen des Rpn4-Proteins in Zellen aus, die ebenfalls eine Deletion des *UMP1*-Gens trugen. Die gleichzeitige Abwesenheit beider Gene führte zu synthetischer Letalität (Abb. 7). Da die Deletion von *RPN4* zu einer Reduktion der konstitutiven Menge aktiver Proteasomen führt, ist der synthetische Effekt mit den untersuchten *ump*-Mutationen erklärbar. Die durch die Mutationen in *UMP1*, *UMP2* oder *UMP4* hervorgerufenen Defekte in der Assemblierung, Reifung und Aktivität des Proteasoms bewirken eine weitere Reduktion der Menge intakter und aktiver Proteasomen. Umgekehrt bewirkt die Anwesenheit von Rpn4 und die damit verbundene Erhöhung der Menge aktiver Proteasomen eine Suppression der von Mutationen des Proteasoms ausgelösten Wachstumsdefekte. Dies konnte besonders deutlich in einem Stamm mit einer Mutation des *PRE4*-Gens beobachtet werden. Eine Deletion, die zum Verlust von 19 Aminosäureresten am C-Terminus des Pre4-Proteins führte (*pre4-ΔC19*), zeigte keine Auswirkungen auf das Wachstum der Hefezellen (Ramos *et al.*, 2004). Wurde diese Mutation allerdings mit einer Deletion von *rpn4* kombiniert, konnte ein starker Wachstumsdefekt beobachtet werden (Abb. 8). In selektionsbasierten „Screening“-Verfahren

zur Identifikation von neuen Mutanten des Proteasoms könnten so viele Mutationen übersehen werden, da ihre Defekte durch die verstärkte Rpn4-abhängige Neubildung von Proteasomen maskiert werden.

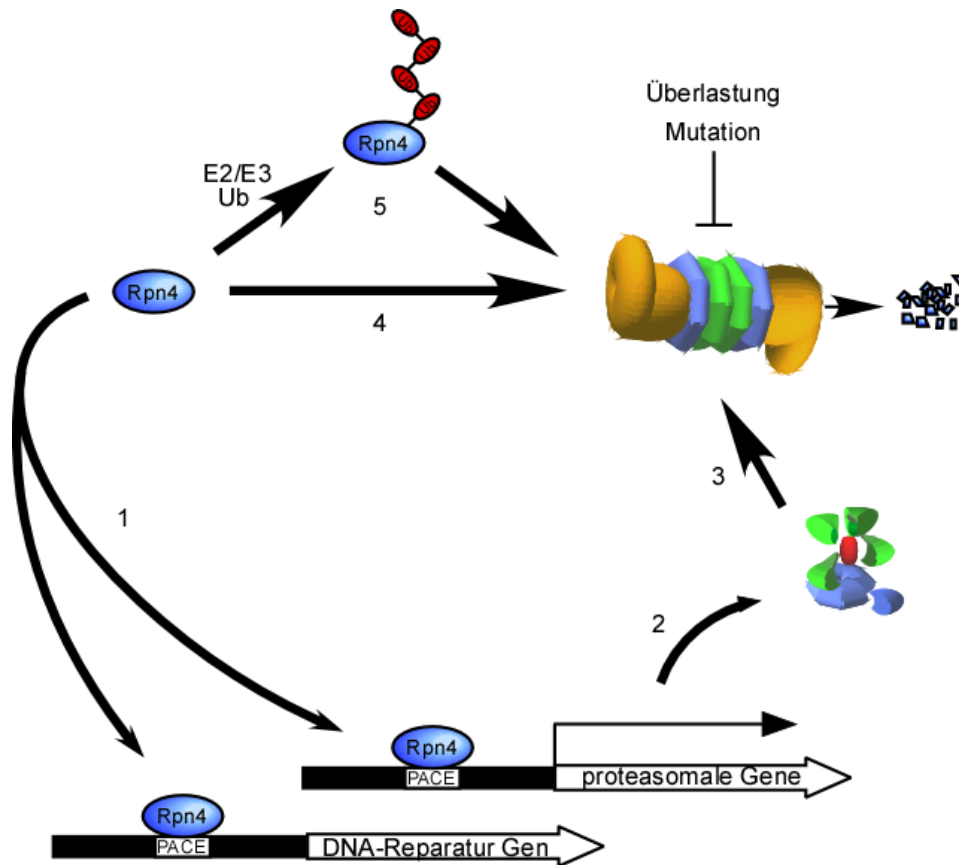


Abb. 39 Modell der Regulation der Menge aktiver Proteasomen durch den Transkriptionsfaktor Rpn4
 (1) Rpn4 bindet an PACE-Sequenzen in den Promotoren proteasomaler und verschiedener anderer Gene und aktiviert deren Transkription (2). (3) Die erhöhte Expression proteasomaler Gene führt zu einer Steigerung der Proteasombiogenese. (4) und (5) Rpn4 ist selber ein Substrat des Proteasoms und kann durch Ubiquitin-abhängige und Ubiquitin-unabhängige Mechanismen abgebaut werden. Daraus ergibt sich ein autoregulatorischer „Feedback“-Zyklus, der die Menge aktiver Proteasomen in Abhängigkeit von der Gesamtaktivität der Proteasomen in der Zelle reguliert. Wird die proteasomale Aktivität beeinträchtigt, so kommt es zu einer Stabilisierung von Rpn4 und im Zuge dessen zu einer verstärkten Neusynthese von Proteasomen.

4.1.2 Rpn4 kontrolliert die Biogenese von Ubiquitin

Da das Ubiquitinsystem vielfältige Funktionen bei der Bewältigung unterschiedlicher Stressfaktoren übernimmt, ist es verständlich, dass die Expression des *UBI4*-Gens das Ziel verschiedener Regulationsmechanismen ist, die auf diese Bedingungen reagieren. So enthält der *UBI4*-Promotor sogenannte STRE-Sequenzen (Stress Response Element), an die die Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 binden. Sie induzieren die Transkription unter anderem als Antwort auf Hitzeschock und oxidativen Stress. Der ebenfalls bei Hitzeschock aktivierte Hitzeschockfaktor (HSF) bindet an vorhandene HSE-Sequenzen (Heat Shock Element) (Simon *et al.*, 1999). Daneben enthält der Promotor auch Erkennungssequenzen für die Bindung von Hap1 und des Hap2/3/4-Komplexes. Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Genaktivität in Abhängigkeit vom respiratorischen Zustand der Zelle und werden zur Aktivierung von Genen für mitochondriale Funktionen benötigt (Watt und Piper, 1997). Außerdem ist bekannt, dass die *UBI4*-Expression bei DNA-Schäden, in Anwesenheit von Aminosäureanaloga oder von Schwermetallen, in der stationären Phase, bei geringem Nährstoffangebot und in der Meiose induziert wird (Finley *et al.*, 1987; Watt und Piper, 1997; Simon *et al.*, 1999). Verschiedenste Stresssignale werden also zur Regulation der Ubiquitinsynthese integriert, um auf ein breites Spektrum an Anforderungen reagieren zu können. Die Anwesenheit einer PACE-Sequenz im Promotor des *UBI4*-Gens suggerierte, dass ebenfalls eine Regulation durch Rpn4 stattfinden könnte (Mannhaupt *et al.*, 1999). Die Analyse der *UBI4*-Transkriptmenge zeigte eine verstärkte *UBI4*-Expression in *ump*-Mutanten (Abb. 11). Die Deletion von *RPN4* in *ump2* und *ump4* führte zu einer Verringerung der Induktion, jedoch blieb die mRNA-Menge gegenüber der *rpn4*-Deletionsmutante erhöht (Abb. 12). Dies zeigte, dass Rpn4 an der gesteigerten Expression von *UBI4* beteiligt ist, parallel wirkende Signalwege jedoch ebenfalls eine Induktion der Expression bewirken. Diese führen offenbar auch dazu, dass in der *rpn4Δ*-Mutante eine Erhöhung der *UBI4*-mRNA-Menge gegenüber dem Wildtyp erkennbar ist.

Auf Proteinebene zeigte die Untersuchung der Ubiquitinmenge, dass sich die Deletion von *RPN4* ähnlich auswirkt wie eine Mutation von *UMP1*, *UMP2* oder *UMP4*. Es kam hier zu einer Akkumulation hochmolekularer Ubiquitinkonjugate bei gleichzeitiger Reduktion der Menge freien Ubiquitins (Abb. 14). Es wäre möglich, dass das Fehlen freien Ubiquitins unabhängig von der Funktion des Proteasoms eine verstärkte Ubiquitinsynthese bewirkt. Hier könnte das Ausbleiben einer Ubiquitin-abhängigen Reaktion in der Antwort auf andere

Stressbedingungen wie z.B. oxidativen Stress zu einer Induktion der Transkription führen, die durch einen der oben geschilderten Transkriptionsfaktoren gesteuert wird.

Da das *UBI4*-Gen eine PACE-Sequenz im Promotor trägt, könnte man vermuten, dass die Deletion von *RPN4* zu einer synthetischen Verstärkung der Wachstumsdefekte der *ump3*-Mutante führt. Dies ist jedoch nicht der Fall. Es konnte vielmehr eine gewisse Suppression dieser Wachstumsdefekte beobachtet werden (Abb. 13). Durch das Fehlen der Aktivität des Doa4-Proteins wird das Ubiquitin zusammen mit den Substratproteinen durch das Proteasom abgebaut (Swaminathan *et al.*, 1999). Die Reduktion der Menge aktiver Proteasomen durch die Deletion des *RPN4*-Gens führt zu einer Verzögerung des Abbaus ubiquitylierter Proteine. Dadurch haben lösliche zytosolische Deubiquitinierungsenzyme mehr Zeit, Ubiquitin zu regenerieren und somit der Zelle wieder zur Verfügung zu stellen. Ein ähnlicher balancierender Effekt konnte für die Kombination der Deletion von *UMP3* mit der Deletion von *UMP1* gezeigt werden (London *et al.*, 2004).

4.1.3 Rpn4 ist ein ungewöhnliches Substrat des Proteasoms

Rpn4 reguliert die Expression von Genen unter anderem in Abhängigkeit von der Menge aktiver Proteasomen. Damit die Vorgänge des Proteinabbaus und der Transkriptionsaktivierung korreliert werden können, muss es einen Mechanismus geben, der die Integrität oder die Aktivität des Proteasoms detektiert und davon abhängig die Aktivität, die Menge oder die Lokalisierung von Rpn4 beeinflusst. Eine Möglichkeit die Aktivität von Rpn4 direkt zu kontrollieren wäre gegeben, wenn Rpn4 selbst ein Substrat des Proteasoms wäre. Die Reduktion der proteasomalen Aktivität würde direkt zu einer Stabilisierung und damit zu einer erhöhten Menge von Rpn4 führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass ein anderes Substrat des Proteasoms die Aktivität oder die Menge von Rpn4 bestimmt. Dies könnte z.B. ein Interaktionspartner von Rpn4 sein, ohne den eine Transkriptionsaktivierung nicht möglich wäre. Es könnte sich auch um ein Protein handeln, das eine posttranslationale Modifikation, z.B. eine Phosphorylierung von Rpn4, durchführt, die eine Aktivierung von Rpn4 bewirkt oder eine Lokalisation in den Kern ermöglicht, so wie dies z.B. für den Transkriptionsfaktor NF- κ B beschrieben ist (Lin *et al.*, 1998).

Die Untersuchungen des Rpn4-Proteins zeigten zunächst, dass in Zellen mit defektem Proteasom eine erhöhte Rpn4-Menge vorliegt (Abb. 15). Tatsächlich konnte durch

weitergehende Analysen gezeigt werden, dass Rpn4 ein extrem instabiles Protein ist, das in Proteasommutanten stabilisiert wird (Abb. 16). Eine Erhöhung der Menge falsch gefalteter und abnormer Proteine durch Zugabe von Canavanin führte ebenfalls zu einer Stabilisierung des Proteins (Abb. 18 und 19). Rpn4 ist also selbst ein Substrat des Proteasoms. Dies ermöglicht der Zelle, eine direkte Korrelation zwischen der Aktivität des proteasomalen Proteinabbaus sowie der Menge und damit Aktivität des Rpn4-Proteins herzustellen. Die Stabilität von Rpn4 wurde vor allem durch die das Proteasom betreffenden Mutationen beeinflusst. Die Mutation von *UMP3*, die durch Reduktion der Menge freien Ubiquitins die Ubiquitylierung von Proteinen beeinträchtigt, zeigte keine deutliche Auswirkung auf die Menge von Rpn4. Diese Beobachtung deutete auf einen ungewöhnlichen Mechanismus des Abbaus von Rpn4 hin, bei dem die Ubiquitylierung nur eine untergeordnete oder gar keine Rolle spielt. Ein solcher Mechanismus konnte für verschiedene andere Proteine gezeigt werden (Murakami *et al.*, 1992; Orłowski und Wilk, 2003). Diese Ergebnisse werden auch durch andere Arbeiten bestätigt, die für Rpn4 einen Ubiquitin-unabhängigen Abbaumechanismus beschreiben (Xie und Varshavsky, 2001; Ju und Xie, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* eine Interaktion zwischen Rpn4 und Rpn2, einer Untereinheit des 19S-Komplexes, stattfindet. Eine solche direkte Interaktion könnte die Unabhängigkeit des Abbaus von Rpn4 von einer Ubiquitylierung erklären. Im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-151) von Rpn4 konnte ein transferierbares Abbausignal lokalisiert werden (Xie und Varshavsky, 2001). Wurde dieser Bereich deletiert, so war das verkürzte Protein stabil. Die C-terminale Domäne von Rpn4 war allerdings nach wie vor zur Bindung an Rpn2 befähigt. Die Bindung an Rpn2 ist also alleine keine hinreichende Voraussetzung für den Abbau des Proteins. Der Ubiquitin-unabhängige Abbau von Rpn4 könnte auch auf die Funktion eines Adapterproteins angewiesen sein, ähnlich wie dies für den Antizym-vermittelten Abbau der Ornithin-Decarboxylase (Odc) beschrieben ist. Ein solches Protein könnte die Interaktion zwischen dem Proteasom und Rpn4 in einer Weise herstellen, dass Rpn4 entfaltet und in das Innere des Proteasoms eingeschleust wird. Ein solcher Mechanismus könnte gänzlich unabhängig von der Interaktion zwischen Rpn2 und Rpn4 stattfinden. Bisher ist ein solches Protein jedoch noch nicht bekannt.

Eine weitergehende Analyse des Abbaus von Rpn4 ergab kürzlich, dass neben dem Ubiquitin-unabhängigen auch ein Ubiquitin-abhängiger Mechanismus vorhanden ist (Ju und Xie, 2004). Beide Wege sind unabhängig von einander in der Lage, Rpn4 mit einer

vergleichbaren Halbwertszeit abzubauen. Erst wenn beide Wege unterbunden werden, kommt es zu einer deutlichen Stabilisierung von Rpn4 (Abb. 17). Es konnte gezeigt werden, dass der frei zugängliche N-Terminus des Rpn4-Proteins (Aminosäuren 1-10) für die Ubiquitin-unabhängige Proteolyse notwendig ist. Die Deletion dieses Abschnitts oder die Blockierung des N-Terminus durch Fusion mit einem kurzen Peptid verhinderte diesen Abbau. Der Ubiquitin-abhängige Mechanismus ist hingegen auf die Anwesenheit eines Lysinrestes innerhalb der 229 N-terminal gelegenen Aminosäurereste angewiesen. Die Funktion dieser zwei Mechanismen im Abbau von Rpn4 ist noch ungeklärt. Die Integration Ubiquitin-abhängiger und -unabhängiger Mechanismen könnte zu einer strikteren Kontrolle der Rpn4-abhängigen Genexpression führen. Ist nur der Ubiquitin-abhängige Mechanismus gestört, so könnte eine volle Stabilisierung von Rpn4 zu einer für die Zelle schädlichen Überexpression von Zielgenen führen. Nur wenn beide Mechanismen beeinträchtigt sind, wird die Menge von Rpn4 deutlich gesteigert (Ju und Xie, 2004).

Da der genaue Mechanismus des Rpn4-Abbaus noch nicht aufgeklärt war, wurde ein genetisches „Screening“-Verfahren durchgeführt, um Komponenten zu identifizieren, die an diesem Abbau beteiligt sind. Eine Fusion des *RPN4*-Gens mit dem Gen für das Ura3-Protein (Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase) sollte es ermöglichen, Mutationen zu isolieren, die aufgrund der Stabilisierung des Rpn4-Ura3-Fusionsproteins der Zelle ein Wachstum in Abwesenheit von Uracil im Medium zu ermöglichen. In einem ersten Schritt konnte eine große Zahl von Klonen isoliert werden, die dieses Kriterium erfüllten. Die weitere Analyse zeigte jedoch, dass sich fast alle der so isolierten putativen Mutationen dominant verhielten. Die ungewöhnlich hohe Zahl dominanter Mutationen deutete daraufhin, dass während der Selektion durch homologe Rekombination eine Trennung zwischen dem *RPN4*-Gen und dem *URA3*-Gen stattgefunden haben könnte. Dies würde dazu führen, dass das Ura3-Protein nicht mehr durch das Proteasom abgebaut wird und daher stabil ist. Eine solche Trennung könnte z.B. durch Rekombination mit dem originalen *URA3*-Lokus oder dem *RPN4*-Lokus im Hefegenom eintreten. Zur Verhinderung einer solchen Rekombination könnten diese beiden Loci vor der Integration des *RPN4-URA3*-Fusionsgens deletiert werden.

Die Analyse der verbliebenen Klone führte zur Isolierung der Mutanten *dor2* und *dor3* (Abb. 21). Beide zeigten reproduzierbares Wachstum auf Medien, die kein Uracil enthielten. Gleichzeitig konnte jedoch kein signifikantes Wachstum in Abwesenheit von Histidin beobachtet werden, was eine Stabilisierung des im verwendeten Stamm ebenfalls

vorhandenen Modellsubstrats Arg-His3 angezeigt hätte. Die gleichzeitige Stabilisierung dieses Substrats des „N-end-rule“-Abbauweges und von Rpn4 hätte auf eine generelle Beeinträchtigung der proteasomalen Aktivität hingedeutet. Auch die Analyse der proteasomalen Aktivität in diesen Mutanten zeigte, dass keine Störung des Proteasoms selbst vorlag (Abb 23).

Die Untersuchung des Einflusses der Mutationen in *DOR2* und *DOR3* auf die Stabilität von Rpn4 zeigte, dass *dor2* den Ubiquitin-abhängigen und den Ubiquitin-unabhängigen Abbau von Rpn4 gleichermaßen beeinträchtigt, während die *dor3*-Mutation einen spezifischen Defekt im ubiquitin-abhängigen Abbau von Rpn4 bewirkt (Abb. 22). Obwohl normalerweise keine deutliche Verlängerung der Halbwertszeit des Rpn4-Proteins festzustellen war, wenn nur einer der beiden Abbauwege aktiv war, konnte die *dor3*-Mutante hier isoliert werden. Hier könnte die Fusion mit dem Ura3-Protein einen stabilisierenden Effekt ausüben, so dass es bei gleichzeitiger Beeinträchtigung des Ubiquitin-abhängigen Abbauweges zu einer Anhäufung des Rpn4-Ura3-Proteins kommt, was den Zellen ein Wachstum in Abwesenheit von Uracil ermöglicht.

In dieser Arbeit konnte der starke Wachstumsdefekt der *dor2*-Mutante genutzt werden, um durch Komplementation aus einer Genbank Plasmide zu isolieren, die das Wildtypgen des durch die Mutation betroffenen *dor2*-Allels enthalten könnten. Alle auf diese Weise identifizierten Plasmide enthielten genomische DNA-Fragmente desselben Chromosoms. Das einzige Gen, das in allen diesen Fragmenten enthalten war, war das *FHL1*-Gen. Dies deutete daraufhin, dass *dor2* und *FHL1* allel zu einander sind (Abb. 24). Tatsächlich führte die Expression des aus einem der Genbankplasmide subklonierten *FHL1*-Gens zu einer Suppression des Wachstumsdefektes (Abb. 25). Das *DOR2* und *FHL1* tatsächlich allel sind könnte z.B. durch die Kreuzung der *dor2*-Mutante mit einem Stamm erbracht werden, in dem das *FHL1*-Gen deletiert wurde. Der resultierende diploide Stamm müsste ebenfalls den Wachstumsdefekt aufweisen, da die beiden Mutationen den Phänotyp nicht komplementieren könnten. Zur Identifizierung der Mutation in *dor2* müsste das betroffene Gen sequenziert werden.

Eine Literaturrecherche ergab, dass das Fhl1-Protein zur Familie der „Forkhead“-Transkriptionsfaktoren gehört. Es wurde mit der Prozessierung von rRNA in Verbindung gebracht, und die Überexpression von *FHL1* führte zu einer Suppression von Mutationen in der RNA-Polymerase III (Hermann-Le Denmat *et al.*, 1994). Bei der Untersuchung der

Stabilität von Rpn4 in der *dor2*-Mutante konnte eine auffallend niedrige zelluläre Proteinkonzentration festgestellt werden, die auf die fehlerhafte Prozessierung der ribosomalen RNA in Abwesenheit von Fhl1 zurück geführt werden könnte (Daten nicht gezeigt). Die hier dokumentierten Analysen zeigen zum ersten Mal eine Verbindung von Fhl1 mit dem Ubiquitin/Proteasom-System. Es wäre denkbar, dass durch eine Reduktion der Zahl funktionsfähiger Ribosomen eine Verschiebung in der Proteinzusammensetzung der Zelle stattfindet, so dass bestimmte Proteine gegenüber anderen unterrepräsentiert sind. Auf diese Weise könnte ein Protein betroffen sein, das am Abbau von Rpn4 beteiligt ist. Wie kann ein solches Protein nun an beiden Abbauwegen des Rpn4-Proteins beteiligt sein? Eine Möglichkeit wäre, dass der Abbau von Rpn4 nur dann induziert wird, wenn das Protein in einem bestimmten Kompartiment lokalisiert ist, z.B. im Nukleus. Die Lokalisierung könnte in der *dor2*-Mutante durch eine Reduktion des Transports aus dem Zytosol in den Nukleus verändert sein. Auch könnte ein Interaktionspartner von Rpn4 an der korrekten Lokalisierung beteiligt sein, der in der *dor2*-Mutante möglicherweise unterrepräsentiert ist. Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein Schritt in der Bindung des Rpn4-Proteins durch das Proteasom gestört ist. Die Beobachtung, dass die *dor2*-Mutation keine Stabilisierung des Modellsubstrats Arg-His3 bewirkt könnte dann dadurch erklärt werden, dass verschiedene Substrate in unterschiedlicher Weise zum Proteasom gebracht werden (Verma *et al.*, 2004), und der Mechanismus auf dem der Arg-His3-Abbau beruht hier nicht beeinträchtigt ist.

Für die *dor3*-Mutante konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das betroffene Protein wahrscheinlich eine Funktion im Ubiquitin-abhängigen Abbau von Rpn4 besitzt (Abb. 22). Es könnte sich hierbei um ein Gen handeln, das für ein Ubiquitin konjugierendes Enzym oder für eine Ubiquitin-Protein-Ligase kodiert. Eine Mutation im *UBA1*-Gen oder in einem Gen, das eine generelle Funktion in der Substratubiquitylierung besitzt, ist dagegen eher unwahrscheinlich, da die *dor3*-Mutation keinen Einfluss auf den Abbau des Modellsubstrats Arg-His3 zeigte. Durch die Sensitivität der Mutante gegenüber Canavanin könnte eine zur Identifikation von *DOR2* analoge Klonierungsstrategie angewendet werden.

Die Tatsache, dass Rpn4 Ubiquitin-abhängig und -unabhängig abgebaut wird, erschwert die Identifikation einzelner Komponenten dieser Mechanismen. Aufgrund der präsentierten Ergebnisse könnte nun ein optimiertes „Screening“-Verfahren durchgeführt werden, bei dem gezielt nach Komponenten des einen oder des anderen Abbauweges gesucht wird. Z.B. könnte

ein Flag-Rpn4-Ura3-Fusionsprotein benutzt werden. Da hier der Ubiquitin-unabhängige Abbau bereits verhindert ist, könnten Komponenten identifiziert werden, die an der Ubiquitylierung von Rpn4 beteiligt sind. Umgekehrt könnte man z.B. die *ump3*-Mutante als Ausgangsstamm für die Suche nach Komponenten benutzen, die spezifisch für den Ubiquitin-unabhängigen Weg sind.

4.1.4 Rpn4 ist Bestandteil eines Proteinkomplexes

Die Analyse von Rohextrakten aus Zellen, die ein epitopmarkiertes Rpn4-Protein enthielten, zeigte, dass dieses nicht als freies Protein, sondern als Untereinheit eines Komplexes mit einer molekularen Masse von ca. 290 kDa auftrat (Abb. 26). In Fraktionen, in denen Komplexe des 26S-Proteasoms vorlagen, konnte hingegen kein Rpn4-Protein detektiert werden. In verschiedenen Publikationen wurde die Assoziation von Rpn4 mit anderen Proteinen gezeigt werden. So interagiert es z.B. *in vitro* mit der 19S-Untereinheit Rpn2 (Xie und Varshavsky, 2001). Rpn4 wurde sogar als Untereinheit des 26S-Komplexes beschrieben (Fujimuro *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass die Menge von Rpn4 nicht in einem stöchiometrischen Verhältnis zu anderen Untereinheiten in diesem Komplex auftritt, spricht jedoch gegen diese Annahme. Die beschriebene Kopräzipitation mit dem 26S-Proteasom könnte auch dadurch erklärt werden, dass Rpn4 als Substrat eine transiente Interaktion mit Rpn2 eingeht, die auf den ungewöhnlichen Ubiquitin-unabhängigen Abbaumechanismus zurückzuführen sein könnte.

Eine funktionelle Interaktion von Rpn4 mit dem 19S-Komplex könnte für Aufgaben wichtig sein, in denen eine Assoziation mit DNA oder mit Komponenten der RNA-Polymerase stattfindet. So konnte gezeigt werden, dass der 19S-Komplex für die Transkriptionselongation durch RNA-Polymerase II benötigt wird (Ferdous *et al.*, 2001; Ferdous *et al.*, 2002), und dass auch das 26S-Proteasom in einer transkriptionsabhängigen Weise mit verschiedenen Genen assoziiert ist, wobei eine Interaktion mit der RNA-Polymerase II stattfindet (Gillette *et al.*, 2004). Es konnte auch gezeigt werden, dass der 19S-Komplex unabhängig vom 20S-Proteasom eine Funktion in der DNA-Reparatur besitzt (Russell *et al.*, 1999; Gillette *et al.*, 2001). Man kann spekulieren, dass Rpn4 hier unabhängig von der Bindung an PACE-Sequenzen eine Rolle in der Assoziation von 19S- oder 26S-Komplexen mit der RNA-Polymerase erfüllen könnte.

Für einen Subkomplex des 19S-Komplexes konnte ebenfalls eine Funktion in der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription beschrieben werden. Dabei interagiert ein als APIS (AAA-proteins independent of 20S) bezeichneter Komplex, der alle sechs ATPase-Untereinheiten des 19S-„Base“-Komplexes enthält, mit dem Transkriptionsfaktor Gal4 und bindet an die Promotoren verschiedener Gene des Galaktose-Regulons (Gonzalez *et al.*, 2002). Eine Beteiligung von Rpn4 konnte hier allerdings noch nicht gezeigt werden.

Zur Identifikation anderer Untereinheiten wurde eine Aufreinigung des Rpn4-Komplexes durchgeführt. Aufgrund der geringen Menge an Rpn4 in der Zelle und des Befunds, dass das C-terminale Ha-Epitop des Rpn4-ha-Proteins im nativen Zustand für einen anti-Ha-Antikörper nicht zugänglich war, war es nicht möglich eine genügend große Menge zu gewinnen, um so mit Coomassie oder Silber gefärbte Proteinbanden aus einem Polyacrylamidgel zu isolieren. Auch hier können basierend auf den in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen optimierte Versuchsansätze entwickelt werden, um größere Mengen des Rpn4-Komplexes aufzureinigen. Z.B könnte man versuchen eine N-terminal epitopmarkierte Variante des Proteins aus Zellen der *ump3*-Mutante zu isolieren. In diesem Fall sollte die Halbwertszeit des Rpn4-Proteins deutlich verlängert sein und eine erhöhte Rpn4-Menge hervorrufen.

4.2 Rpn4 ist Teil eines Netzwerks, das verschiedene Stressantworten integriert

Untersuchungen der zellulären Antwort auf verschiedene Stressbedingungen ergaben, dass Rpn4 die Transkription einer großen Zahl von Genen reguliert (Jelinsky *et al.*, 2000). Zu diesen Genen gehören sowohl solche, die für Komponenten des Ubiquitin/Proteasom-Systems kodieren als auch solche, deren Produkte in der DNA-Reparatur fungieren. Interessant ist, dass für eine Reihe von Genen, deren Produkte eine Funktion in der DNA-Reparatur besitzen, eine regulatorische Sequenz im Promotor beschrieben wurde, die als *MAG1-URS2* (*MAG1-Upstream Re^upressing Sequence*) bezeichnet wurde und die der *PACE*-Sequenz sehr ähnlich ist (*PACE*: GGTGGCAA, *MAG1-URS2*: GGTGGCGA) (Singh und Samson, 1995; Jelinsky *et al.*, 2000). Obwohl diese Sequenz ursprünglich als Bindeelement für einen Repressor beschrieben wurde, schließt dies eine Transkriptionsaktivierung durch Rpn4 nicht aus. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression einiger dieser Gene nach Induktion von DNA-

Schäden durch Rpn4 verstärkt wird (Jelinsky *et al.*, 2000). Rpn4 ist also ein zentraler Bestandteil einer Stressantwort, die eine Vielzahl von Einflüssen integriert und verschiedene Mechanismen der Stressabwehr beziehungsweise der Eindämmung von Schäden auslöst. Da Komponenten des Ubiquitin/Proteasom-Systems in verschiedenen Arbeiten bereits mit der Beseitigung von DNA-Schäden in Verbindung gebracht wurden (Russell *et al.*, 1999; Gillette *et al.*, 2001; Hoege *et al.*, 2002); siehe auch Kap. 4.1.4), erscheint eine Verknüpfung zwischen der Antwort auf solche Schäden und der Expression proteasomaler Gene durch Rpn4 sinnvoll.

4.2.1 Die Deletion von *RPN4* bewirkt eine Sensitivität gegen die DNA-alkylierende Substanz Methylmethansulfonat und gegen Koffein

Die Analyse der Wachstumseigenschaften der *rpn4*-Deletionsmutante ergab, dass eine deutliche Sensitivität gegenüber der DNA-schädigenden Substanz Methylmethansulfonat (MMS) und gegenüber Koffein vorlag. Auch die Stämme mit Mutationen in *UMP1* - *UMP5* zeigten eine deutliche Sensitivität gegenüber diesen Chemikalien (Abb. 29).

MMS bewirkt die Alkylierung von Basen in der DNA und führt so zu DNA-Schäden, die durch Basenexzisions- oder Nukleotidexzisionsreparatur beseitigt werden (Jelinsky und Samson, 1999). Die Zugabe von Koffein bewirkt eine Aufhebung des G2/M-Kontrollpunkts („Checkpoint“) des Zellzyklus, der auch als „DNA-damage checkpoint“ bezeichnet wird (Schlegel und Pardee, 1986). Dieser Kontrollpunkt verhindert normalerweise das Fortschreiten der Mitose, wenn umfangreiche Schäden in der DNA vorliegen. Diese Unterbrechung des Zellzyklus ermöglicht es den DNA-Reparaturmechanismen die Schäden zu beseitigen, bevor die Mitose abgeschlossen wird. Koffein inhibiert dabei die Weiterleitung des Signals, das durch Proteinkinasen auf die Effektorproteine übertragen wird (Rowley und Zhang, 1999; Moser *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* wird hier das Signal durch den ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)-ähnlichen Komplex über mehrere Proteinkinasen letztlich auf die Proteine Chk1, Dun1, Cdc5 und Pds1 übertragen (Zhou und Elledge, 2000). In *Schizosaccharomyces pombe* konnte gezeigt werden, dass das Rhp6-Protein, das zu Ubc2 aus *S. cerevisiae* homolog ist, für die Koffein-abhängige Umgehung des „DNA-damage checkpoints“ benötigt wird (Rowley und Zhang, 1999).

Um die Verbindung zwischen der Reaktion auf MMS oder Koffein und der Regulation der Expression proteasomaler Gene zu untersuchen, wurde der Einfluss auf die Menge bzw.

Stabilität von Rpn4 untersucht. Die Zugabe von MMS bewirkte eindeutig eine starke Induktion der *RPN4*-Transkription, in deren Folge auch die Menge des Rpn4-Proteins ansteigt (Abb. 30). Ein Einfluss auf die Stabilität von Rpn4 konnte hier nicht beobachtet werden (Abb. 31). Die Expression von *RPN4* wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren gesteuert. Im Promotorbereich befinden sich zwei Erkennungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren Pdr1 und Pdr3, die als PDRE (Pleiotropic Drug Resistance Element) bezeichnet werden (Owsianik *et al.*, 2002). Diese Proteine werden bei Zugabe verschiedenster, die Zelle schädigender Substanzen aktiviert und induzieren die Synthese von Proteinen, die zur Beseitigung dieser Substanzen führen (DeRisi *et al.*, 2000). Neben den PDR-Elementen ist auch eine als YRE (Yap1 Response Element) bezeichnete Sequenz vorhanden, die den Transkriptionsfaktor Yap1 bindet (Owsianik *et al.*, 2002). Dieser Transkriptionsfaktor steuert die Expression verschiedener Gene in Antwort auf oxidativen Stress und verschiedene Chemikalien (Fernandes *et al.*, 1997; Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004); siehe Kap. 4.2.2). Wahrscheinlich führt die Zugabe von MMS zu einer Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren und damit zu einer Induktion der *RPN4*-Expression. Interessanterweise enthält der Promotor des *YAP1*-Gens eine PACE-Sequenz und wird von Rpn4 reguliert, so dass sich hier eine wechselseitige Abhängigkeit ergibt, die zu einer Verstärkung der Induktion führen könnte.

Die Zugabe von Koffein führte ebenfalls zu einer leichten Induktion der *RPN4*-Expression, gleichzeitig bewirkte sie überraschenderweise eine Abnahme der Menge des Rpn4-Proteins (Abb. 32). Nach 30min konnte im Western-Blot kein Rpn4 mehr nachgewiesen werden. Eine Analyse des Abbaus von Rpn4 in Gegenwart von Koffein zeigte, dass die Halbwertszeit des Rpn4-Proteins verringert ist (Abb. 33). Es könnte sein, dass durch Zugabe von Koffein der Abbau von Rpn4 verstärkt wird, oder dass eine Prozessierung von Rpn4 stattfindet, die ebenfalls zum Verschwinden des Vollängenproteins führen würde. Da bei der Untersuchung von Rpn4 durch Western-Blot eine größere Zahl von Abbauprodukten detektiert wurde, konnte keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden (Daten nicht gezeigt). Es wäre interessant den Einfluss von Koffein in Zellen zu untersuchen, in denen das Proteasom durch Zugabe eines Inhibitors vollständig inaktiviert wurde. Dies würde die Frage beantworten, ob die Reduktion der Rpn4-Menge durch einen proteasomabhängigen Schritt bewirkt wird.

Der Einfluss von Koffein auf die Stabilität von Rpn4 erscheint zunächst widersinnig. Die Abwesenheit von Rpn4 nach Deletion des *RPN4*-Gens führt zu einer starken Sensitivität gegenüber Koffein. Gleichzeitig bewirkt die Zugabe von Koffein bei Wildtyp-Zellen eine starke Abnahme dieses Proteins. Eine Möglichkeit dieses Paradoxon zu erklären, ist die Annahme, dass Koffein zu einer posttranslationalen Modifikation des Rpn4-Proteins führen könnte, die dessen Transkriptionsfunktion verstärkt und damit eine Toleranz gegenüber Koffein ermöglicht, gleichzeitig aber auch eine erhöhte Abbaurrate bewirkt. Ein solcher Mechanismus konnte für den viralen Transkriptionsfaktor VP16 gezeigt werden, der erst durch Monoubiquitylierung aktiviert wird. Diese Modifikation ist zugleich Ausgangspunkt für eine nachfolgende Polyubiquitylierung, die zum Proteasom-abhängigen Abbau des Proteins führt (Salghetti *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus wird auch als „Licensing“ bezeichnet, und man vermutet, dass hierdurch eine strikte Kontrolle der Transkriptionsaktivierung ermöglicht wird (Salghetti *et al.*, 2000; Salghetti *et al.*, 2001; Muratani und Tansey, 2003). Auch für den Transkriptionsfaktor c-Myc konnte eine Regulation der Aktivierung und der Stabilität durch das Ubiquitinsystem gezeigt werden (Kim *et al.*, 2003). In beiden Fällen wird die Ubiquitylierung durch den SCF-Komplex katalysiert (Salghetti *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003).

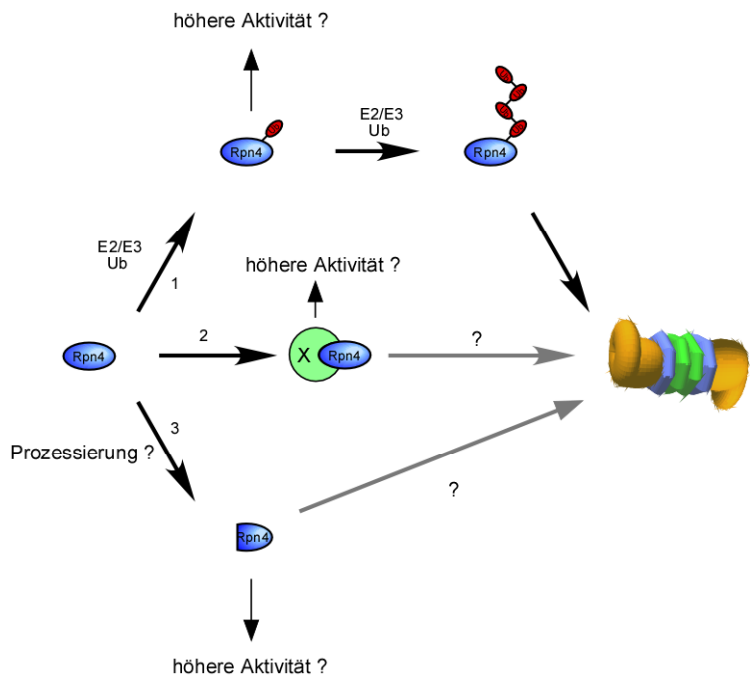


Abb. 40 Modell zur Erklärung der potenziellen Einflüsse von Koffein auf Rpn4

Die Zugabe von Koffein könnte verschiedene denkbare Einflüsse auf Rpn4 ausüben. (1) In einem Mechanismus der ähnlich dem „Licensing“ verläuft, könnte es durch Monoubiquitylierung zu einer Erhöhung der Rpn4-Aktivität oder zu einer verstärkten Bindung an DNA kommen. Eine nachfolgende Polyubiquitylierung würde zu einem rascheren Abbau von Rpn4 führen. (2) Ähnlich könnte sich auch die Expression oder die Modifikation eines Interaktionspartners von Rpn4 auswirken. (3) Eine dritte Möglichkeit wäre, dass eine Prozessierung von Rpn4 stattfindet, die zu einer erhöhten Expression von Zielgenen führt.

Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch in der Regulation von Rpn4 eine Rolle spielen. Dies würde zu einer weiteren Verbindung zwischen Ubiquitin/Proteasom-abhängigem Proteinabbau und der Regulation der Expression proteasomaler Gene durch Rpn4 führen. Da Rpn4 sowohl abhängig als auch unabhängig von einer Ubiquitylierung durch das Proteasom abgebaut wird, ist ein solcher Mechanismus vorstellbar. Es konnte jedoch kein Einfluss des SCF-Komplexes auf die Stabilität von Rpn4 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), und eine Abhängigkeit der Transkriptionsaktivität von Ubiquitin wurde bisher nicht beschrieben.

Die Untersuchung der Auswirkung der Koffeinzugabe auf Rpn4 und Flag-Rpn4 zeigte, dass ein freier N-Terminus des Rpn4-Proteins für die Reduktion der Rpn4-Menge erforderlich ist (Abb. 34). Dies deutet zunächst daraufhin, dass ein gesteigerter Abbau also über den Ubiquitin-unabhängigen Mechanismus erfolgen könnte. Allerdings zeigt auch die Reduktion der Ubiquitinmenge in der *ump3*-Mutante eine Auswirkung auf die Koffein-abhängige Reaktion. Es wäre daher auch denkbar, dass eine Modifikation von Rpn4, vielleicht unter Beteiligung von Ubiquitin, stattfindet, die durch Fusion des N-Terminus mit dem Flag-Epitop verhindert wird. Der Unterschied in der Auswirkung der Blockierung des N-Terminus und der Mutation in *UMP3* könnte dadurch erklärt werden, dass die erstgenannte Veränderung diesen Mechanismus vollständig blockiert, da 100% des Rpn4-Proteins verändert sind. Die Reduktion der Ubiquitinmenge in der *ump3*-Mutante ist hingegen nicht vollständig, so dass immer noch eine ausreichende Menge zur Verfügung steht. Die *ump3*-Mutation führt lediglich zu einer Beeinträchtigung.

Auch eine Prozessierung von Rpn4, die zu einer Erhöhung der Transkriptionsaktivität führen könnte, könnte von einem intakten und zugänglichen N-Terminus abhängig sein. Ein solcher Mechanismus ist für die Transkriptionsfaktoren Spt23 und NFκB beschrieben, die durch regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung (RUP) gespalten werden und dann in den Nukleus gelangen (Hoppe *et al.*, 2000).

Alternativ könnte auch ein Interaktionspartner von Rpn4 modifiziert werden, der dessen Aktivität verändert, aber auch zu einer erhöhten Abbaurate von Rpn4 führt. Hier wäre es auch denkbar, dass der Ubiquitin-abhängige Abbau von Rpn4 verstärkt wird, wenn der Interaktionspartner an diesem Mechanismus beteiligt ist.

Die genaue Ursache der Sensitivität von *ump*-Mutanten gegenüber MMS und Koffein ist noch ungeklärt. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass Komponenten des Ubiquitinsystems in DNA-Reparaturmechanismen involviert sind. So ist das Ubiquitin-

konjugierende Enzym Ubc2 ein wichtiger Bestandteil der post-replikativen DNA-Reparatur (Hoegge *et al.*, 2002). Auch der 19S-Komplex und das 26S-Proteasom konnten mit DNA-Reparaturmechanismen und Transkriptionsvorgängen in Verbindung gebracht werden (Ferdous *et al.*, 2001; Gillette *et al.*, 2001; Ferdous *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2002; Gillette *et al.*, 2004). Die genaue Funktion dieser Komplexe in der DNA-Reparatur oder Transkription ist bisher noch ungeklärt. Die Beteiligung proteasomaler Komplexe an diesen Reparaturvorgängen erklärt jedoch, warum Mutationen, die zu einer Verringerung der Menge oder Aktivität des Proteasoms führen, eine Sensitivität gegenüber DNA-Schäden oder Beeinträchtigungen von Transkriptionsvorgängen auslösen können.

4.2.2 Die Überexpression von *YAPI* oder *SSZI* supprimiert die MMS- und Koffeinsensitivität der *rpn4*-Deletionsmutante

Um solche Gene zu identifizieren, deren Produkte spezifisch an der durch Rpn4 kontrollierten Antwort auf DNA-Schäden beteiligt sind, wurden Zellen, in denen das *RPN4*-Gen deletiert war, mit einer Genbank transformiert, die auf der Basis des 2 μ -Plasmids erstellt worden war. Die hohe Kopienzahl eines der Genbankplasmide in der Zelle führt zu einer erhöhten Gendosis. Auf diese Weise kommt es zu einer Überexpression der in diesen Plasmiden enthaltenen Gene. Durch die Aufhebung der Rpn4-Abhängigkeit der Expression solcher Gene, die in Anwesenheit von Koffein oder MMS für die Zellviabilität entscheidend sind, könnten die Wachstumsdefekte der *rpn4*-Deletionsmutante in Gegenwart dieser Substanzen supprimiert werden.

Die Transformation der *rpn4*-Deletionsmutante mit einer solchen Genbank führte tatsächlich zur Isolierung mehrerer Kolonien, die in Anwesenheit von 10mmol/l Koffein reproduzierbar wachstumsfähig waren. Auf diesem Wege konnten die Gene *YAPI* und *SSZI* identifiziert werden, deren Überexpression nicht nur die Sensitivität gegenüber Koffein, sondern auch die Sensitivität gegenüber MMS supprimierte (Abb. 37). Beide Gene wurden bereits im Zusammenhang mit Vorgängen beschrieben, die bei der Reaktion der Zelle auf Stressbedingungen und Schädigungen eine Rolle spielen (Fernandes *et al.*, 1997; Hallstrom *et al.*, 1998).

Die Analyse von Zellen, in denen eine Deletion von *YAPI* vorlag, und von Zellen, in denen zusätzlich das *RPN4*-Gen deletiert worden war, zeigte, dass eine Deletion von *YAPI* in

Anwesenheit von Koffein oder MMS keine phänotypischen Wachstumsdefekte auslöste (Abb. 38). Auch die Kombination mit der *rpn4*-Deletion bewirkte keine synthetischen Defekte. Die Doppelmutanten zeigten vergleichbare Wachstumseigenschaften wie die *rpn4*-Deletionsmutante. Die Funktion von Yap1 ist also für die Antwort der Zelle auf die Einwirkung von Koffein oder MMS weder in An- noch in Abwesenheit von Rpn4 unerlässlich, ermöglicht aber bei erhöhter Expression ein Wachstum unter diesen Bedingungen, wenn Rpn4 fehlt.

Die Deletion von *SSZ1* führte hingegen zu stark verlangsamtem Wachstum in Anwesenheit von Koffein oder MMS (Abb. 38). Das Wachstum war hier stärker eingeschränkt als in der *rpn4*-Deletionsmutante. Eine Kombination beider Mutationen führte zu einem deutlichen, synthetischen Wachstumsdefekt. Dies deutet darauf hin, dass die Funktionsbereiche von Rpn4 und Ssz1 zur Antwort auf DNA-schädigende Einflüsse nicht redundant, aber miteinander verknüpft sind, so dass sie sich gegenseitig ergänzen.

4.2.3 YAPI kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in Stresssituationen aktiviert wird

Yap1 ist Mitglied einer Familie von acht Proteinen (Yap1-8), die zur Gruppe der b-zip Proteine (basic-leucine zipper) gehören und Ähnlichkeiten zum Transkriptionsfaktor c-Jun aus Säugerzellen aufweisen (Fernandes *et al.*, 1997). Ursprünglich wurde Yap1 aufgrund seiner Eigenschaft isoliert, an das AP-1 Erkennungselement des Simian Virus 40 zu binden und dieses zu aktivieren (Harshmann *et al.*, 1988). In verschiedenen anderen Studien konnte Yap1 außerdem aufgrund seiner Funktion in der Antwort auf verschiedenste Stressbedingungen isoliert werden, wie z.B. in der Cadmiumtoleranz (Wemmie *et al.*, 1994) oder in der Antwort auf oxidativen Stress (Stephen *et al.*, 1995) sowie in der Toleranz gegenüber Eisenchelatoren oder Cycloheximid (Schnell und Entian, 1991; Wu *et al.*, 1993). Yap1 bindet an die Sequenz TTA(C/G)TAA und aktiviert die Transkription verschiedener Gene als Antwort auf solche Stressbedingungen (Fernandes *et al.*, 1997; Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004).

Bei Überexpression von Yap1 konnte eine Zunahme der Transkriptmenge verschiedener Gene beobachtet werden. Für 17 Gene wurde eine 3 - 13fache Steigerung beschrieben (DeRisi *et al.*, 1997). Die größte Gruppe unter ihnen kodiert für Proteine, denen aufgrund von

Sequenzanalysen eine Funktion als Aryl-Alkohol-Oxidoreduktasen oder -dehydrogenasen zugeordnet wurde. Sie katalysieren Redox-Reaktionen mit aromatischen und aliphatischen ungesättigten Alkoholen oder Aldehyden (Muheim *et al.*, 1991) und könnten daher eine Funktion in der Yap1-vermittelten Toleranz gegenüber oxidativem Stress übernehmen (DeRisi *et al.*, 1997). Die Umsetzung von Koffein durch diese Enzyme wurde nicht beschrieben. Eine Reduktion der Ketogruppen des Koffeins ist jedoch denkbar und könnte das Koffein unschädlich machen.

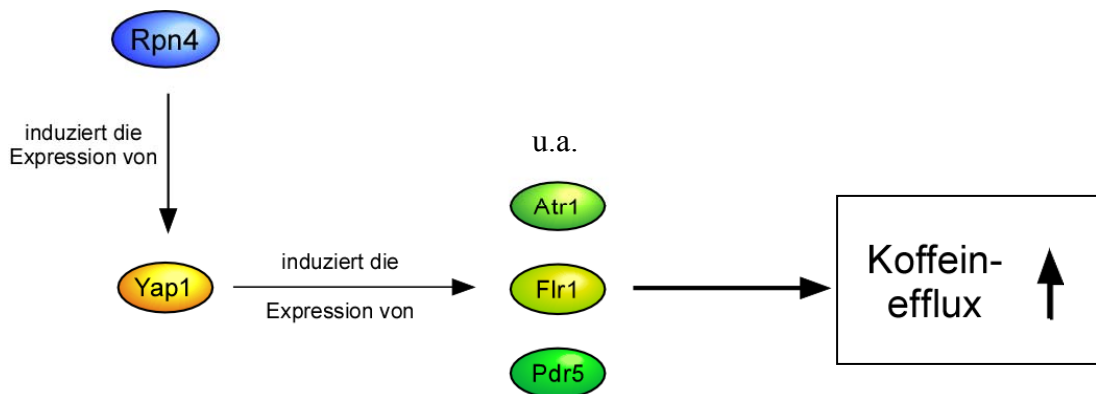


Abb. 41 Modell der Yap1-vermittelten Suppression der Koffeinsensitivität der *rpn4Δ*-Mutante

Der Transkriptionsfaktor Yap1 induziert die Expression von Genen, deren Produkte an der zellulären Antwort auf Stressbedingungen beteiligt sind. Hierzu gehören u.a. die Gene für die Plasmamembran-ständigen Transportproteine Atr1, Flr1 und Pdr5. Diese sind am Export schädlicher Substanzen beteiligt. Die Expression des *YAP1*-Gens unterliegt der Kontrolle durch Rpn4. In Abwesenheit von Rpn4 kann diese Abhängigkeit durch Überexpression von *YAP1* umgangen werden. Die erhöhte Synthese der Membrantransporter könnte zu einer erhöhten Ausscheidung von Koffein und MMS führen, was die Sensitivität der *rpn4Δ*-Mutante supprimieren könnte.

Neben diesen Reduktasen und Dehydrogenasen konnten auch *ATR1* und *FLR1* als Zielgene einer Yap1-kontrollierten Expression identifiziert werden. Beide Gene werden bei Überexpression von Yap1 stärker exprimiert (DeRisi *et al.*, 1997). Sie kodieren für Transportproteine der „Major Facilitator“-Proteinfamilie, die am Export verschiedener schädlicher Substanzen aus der Zelle beteiligt sind (Coleman *et al.*, 1997; Oskouian und Saba, 1999). Yap1 beeinflusst auch die Expression des ABC (ATP Binding Cassette)-Transporters Pdr5 (Pleiotropic drug resistance 5) (Dexter *et al.*, 1994). Dieses Protein bildet einen ATP-abhängigen Transporter in der Plasmamembran, der verschiedene Chemikalien unspezifisch aus der Zelle befördert. Zusammen mit Atr1 und Flr1 könnte Pdr5 also einen Export von Koffein aus der Zelle durchführen. Diese Befunde deuten daraufhin, dass die Überexpression

von Yap1 zu einer Verringerung der intrazellulären Koffeinkonzentration führt und dadurch eine Suppression der Koffeinsensitivität der *rpn4*-Deletionsmutante bewirkt.

Um zu untersuchen, ob tatsächlich die Induktion der Expression der Gene *ATRI*, *FLR1* und *PDR5* durch Yap1 zu der beobachteten Suppression der Wachstumsdefekte der *rpn4*-Deletionsmutante beiträgt, könnte man diese Gene in der *rpn4Δ*-Mutante überexprimieren. Träfen diese Annahmen zu, so hätten diese Gene theoretisch auch in dem durchgeführten „Screening“-Verfahren isoliert werden können. Es kann jedoch sein, dass die Überexpression eines einzelnen Gens nicht den gleichen Effekt auslöst, wie die gleichzeitige Überexpression mehrerer dieser Gene. Die erzielte Zahl an Transformanten könnte auch limitierend gewesen sein. Obwohl mit 20.000 Transformanten eine dreifache Abdeckung der Genzahl des *S. cerevisiae*-Genoms (ca. 6600 Gene) erreicht wurde, könnten einzelne Gene unterrepräsentiert sein. Dass die Gene *YAPI* und *SSZ1* im durchgeführten „Screening“-Verfahren nur je einmal isoliert werden konnten, deutet jedoch daraufhin, dass dieser Ansatz weit entfernt von einer Sättigung war. Bei einer deutlich höheren Anzahl von Transformanten könnten somit möglicherweise noch andere supprimierende Gene identifiziert werden.

4.2.4 Ssz1 ist Bestandteil eines Ribosom-assoziierten Chaperonkomplexes, der die Aktivität von Pdr1 beeinflusst

Das Ssz1-Protein gehört zur Familie der Hitzeschockproteine der Hsp70-Klasse (Hallstrom *et al.*, 1998). Zusammen mit den Hsp70-Proteinen Ssb1 und Ssb2 und dem Protein Zuotin (Zuo1), einem Vertreter der Hsp40-Proteinfamilie, bildet es einen als RAC (ribosome associated complex) bezeichneten Komplex, der mit naszierenden Polypeptidketten interagiert (Gautschi *et al.*, 2001; Gautschi *et al.*, 2002; Hundley *et al.*, 2002). Ursprünglich wurde *SSZ1* als *PDR13* (pleiotropic drug resistance) beschrieben, da die Überexpression von *SSZ1* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Oligomycin führte. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *SSZ1* zu einer erhöhten Aktivität des Transkriptionsfaktors Pdr1 führt, wobei keine Veränderung der Menge der *PDR1*-mRNA oder des Pdr1-Proteins festgestellt werden konnte (Hallstrom *et al.*, 1998). Die Untersuchung des RAC-Komplexes zeigte, dass dieser eine Funktion als Chaperon bei der Faltung neusynthetisierter Polypeptide übernimmt. Ähnlich zum NAC (nascent polypeptide-associated complex) bindet er an Ribosom-assoziierte Polypeptidketten unabhängig von ihrer Sequenz (Gautschi *et al.*, 2001).

Da der RAC-Komplex die Faltung neu gebildeter Proteine beeinflusst, ist zu erklären, warum kein Unterschied in der Gesamtmenge des Pdr1-Proteins detektiert werden konnte (Hallstrom *et al.*, 1998). Sehr wohl kann aber die Menge aktiven Pdr1-Proteins in An- oder Abwesenheit von Ssz1 oder bei *SSZI*-Überexpression unterschiedlich sein. Die Auswirkung der *SSZI*-Überexpression auf die Resistenz der *rpn4*-Deletionsmutante gegenüber Koffein lässt sich durch die erhöhte Pdr1-abhängige Expression von Proteinen erklären, die eine Rolle für die Toleranz der Zelle gegenüber Stress hervorrufenden Chemikalien erfüllen. Eines dieser Proteine ist z.B. Pdr5, dessen Menge ebenfalls durch Yap1 reguliert wird. Wie im Falle von Yap1 ist es hier also wahrscheinlich, dass die erhöhte Menge von Ssz1 zu einer Reduktion der intrazellulären Koffeinkonzentration führt und so die Suppression der Koffeinsensitivität bewirkt.

Die Hypothese, dass die Überexpression von *SSZI* durch eine Erhöhung der Aktivität von Pdr1 wirkt, könnte untersucht werden, indem *PDR1* selber überexprimiert wird. Dies könnte ebenfalls zu einer Suppression der Wachstumsdefekte der *rpn4*-Deletionsmutante führen. Da der RAC-Komplex anscheinend eine allgemeine Funktion in der Proteinfaltung besitzt, könnten jedoch auch andere Proteine durch Überexpression von *SSZI* positiv beeinflusst werden. Wenn *PDR1* alleine eine supprimierende Wirkung auf die Wachstumsdefekte der *rpn4*-Deletionsmutante hätte, so hätte auch dieses Gen möglicherweise in dem durchgeführten „Screening“-Verfahren isoliert werden können.

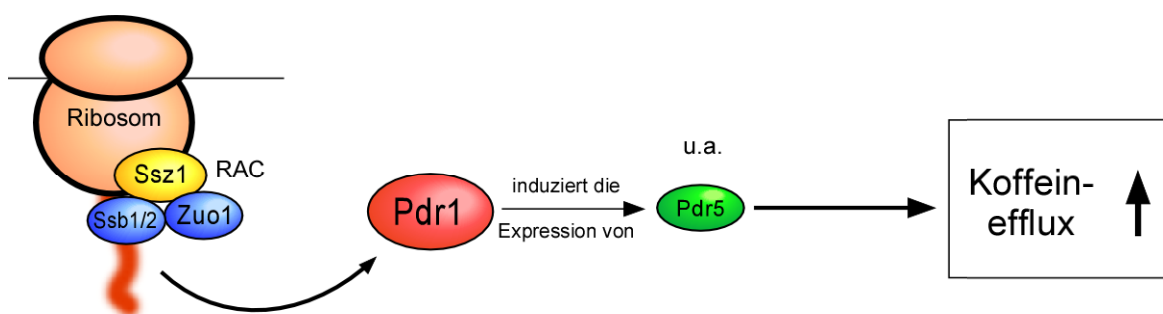


Abb. 42 Modell der Ssz1-vermittelten Suppression der Koffeinsensitivität der *rpn4*Δ-Mutante

Ssz1 ist Bestandteil des Ribosom-Assoziierten Komplexes (RAC), der an der Faltung neusynthetisierter Proteine beteiligt ist. Die Aktivität von RAC ist für die Pdr1-Aktivität von Bedeutung. Der Transkriptionsfaktor Pdr1 wiederum reguliert die Expression einer Reihe von Genen, deren Produkte an der zellulären Antwort auf Stressbedingungen beteiligt sind. Unter anderem wird auch die Expression des *PDR5*-Gens durch Pdr1 reguliert. Die Überexpression von *SSZI* könnte zu einer Erhöhung der Menge aktiven Pdr1 führen und dadurch die Überexpression von *PDR5* bewirken. Hierdurch könnte es zu einer erhöhten Ausscheidung von Koffein und MMS aus der Zelle kommen.

4.3 Ausblick

Die Untersuchung der Rpn4-abhängigen Regulation der Menge aktiver Proteasomen führte zu neuen Erkenntnissen über das Ubiquitin/Proteasom-System und über die Verknüpfung desselben mit der Antwort auf zelluläre Abwehrsysteme gegen DNA-Schäden. Verschiedene Ergebnisse bieten dabei Ansätze für weitergehende Experimente. Besonders der ungewöhnliche Abbaumechanismus des Rpn4, der parallel einen Ubiquitin-abhängigen und einen Ubiquitin-unabhängigen Weg einschließt, bietet Ansatzpunkte für eine Reihe von Untersuchungen. Durch ein geeignetes selektionsbasiertes „Screening“-Verfahren könnte gezielt nach Komponenten gesucht werden, die den Ubiquitin-unabhängigen Abbau beeinträchtigen. Dies könnte z.B. ein Protein sein, das analog zum Antizym beim Abbau der Ornithindecaboxylase eine Verbindung zwischen Rpn4 und dem Proteasom herstellt. Obwohl Rpn4 *in vitro* alleine zu einer Interaktion mit der Rpn2-Untereinheit des 19S-Komplexes in der Lage ist, könnte die effiziente Steuerung des Abbaus die Anwesenheit anderer Faktoren benötigen. *In vitro* konnte jedenfalls bisher nicht gezeigt werden, dass das Proteasom gereinigtes Rpn4 abbauen kann (Ju und Xie, 2004).

Die Benutzung von N-terminal Flag-markiertem Rpn4 für ein „Screening“-Verfahren könnte zur Identifikation der an der Ubiquitylierung beteiligten Ubiquitin-konjugierenden Enzyme und Ubiquitin-Protein-Ligasen führen. Durch Blockierung des N-Terminus von Rpn4 wird der Ubiquitin-unabhängige Mechanismus bereits beeinträchtigt, so dass der Abbau gänzlich von der Ubiquitylierung abhängig ist. In der bereits isolierten *dor3*-Mutante könnte ein Gen der E2- oder E3-Enzymfamilie betroffen sein, da hier der Ubiquitin-abhängige Abbau gestört ist. Die Identifizierung des betroffenen Genes würde eventuell weitere Aufschlüsse über die involvierten Ubiquitylierungsmechanismen ermöglichen.

Der Einfluss von Koffein auf die Regulation der Rpn4-Menge ist besonders interessant. Weitergehende Analysen dieses Phänomens könnten Aufschlüsse über die Mechanismen der Kontrolle von Stabilität und Aktivität dieses Proteins ergeben. Verschiedene Fragestellungen könnten Ausgangspunkt für anschließende Untersuchungen sein, so z.B.: Ist ein Ubiquitylierungsschritt involviert? Wenn ja, welches sind die beteiligten Mechanismen? Liegt hier ein Mechanismus vor, der ähnlich dem beschriebenen „Licensing“ verläuft (Salghetti *et al.*, 2000; Salghetti *et al.*, 2001)? Durch Verwendung des Rpn4-Ura3-Fusionsproteins könnte man auch hier versuchen, ein „Screening“-Verfahren zu etablieren. Bei geeigneter Expressionsstärke könnten Wildtypzellen unter Normalbedingungen ohne Uracil wachsen,

während die Zugabe von Koffein zu einer Verringerung der Rpn4-Ura3-Proteinmenge führen und damit eine Uraciluxotrophie hervorrufen würde. Durch Selektion könnten dann Mutanten isoliert werden, die in Anwesenheit von Koffein wieder Uracil-prototroph sind.

Die Identifizierung von Interaktionspartnern des Rpn4-Proteins könnte zur Aufklärung des Komplexes führen, mit dem Rpn4 assoziiert ist. Diese Interaktionspartner könnten die Aktivität oder die Bindung von Rpn4 an die Promotoren bestimmter Gene beeinflussen. Im Zusammenhang mit dem Einfluss von Koffein könnte man sich auch vorstellen, dass hier die Interaktion mit bestimmten Proteinen verändert und so eine Gruppe von Genen verstärkt exprimiert wird. Die Aufreinigung des Komplexes in ausreichender Menge sollte zur Isolierung interagierender Proteine führen, die durch Massenspektrometrie identifiziert werden könnten.

5 Zusammenfassung

Selektive Ubiquitin (Ub)-vermittelte Proteolyse ist der wichtigste Mechanismus im Abbau zytosolischer und nukleärer Proteine eukaryotischer Zellen. Substratproteine werden durch Komponenten des Ub-Systems erkannt und über interne Lysinreste mit Polyubiquitinketten verknüpft. Diese Polyubiquitinketten vermitteln die Bindung an das 26S-Proteasom, einem Komplex mit einer Masse von ca. 2MDa, der die Substratproteine entfaltet und hydrolysiert. Die Expression proteasomaler Gene wird durch einen autoregulatorischen Mechanismus in Abhängigkeit von der proteasomalen Aktivität reguliert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Rpn4 neben der basalen Expression die aktivitätsabhängige Expression proteasomaler Gene und des Polyubiquitin-Gens kontrolliert. Die Deletion von *RPN4* verursachte eine Reduktion der proteasomalen Aktivität um 50% und führte in Zellen, in denen die Aktivität oder die Assemblierung der Proteasomen beeinträchtigt war, zur Ausprägung starker Wachstumsdefekte. Die Analyse der Stabilität von Rpn4 in verschiedenen proteasomdefizienten Stämmen zeigte, dass Rpn4 selber ein Substrat des proteasomalen Proteinabbaus ist. Dies bewirkt eine direkte Abhängigkeit der Rpn4-Menge von der proteasomalen Aktivität in der Zelle, die eine Korrelation dieser Aktivität mit der Rpn4-kontrollierten Neusynthese von Proteasomen ermöglicht. Rpn4 ist ein ungewöhnliches Substrat des Proteasoms, das durch von Ubiquitin-abhängigen und -unabhängigen Mechanismen abgebaut wird.

Durch ein selektionsbasiertes „Screening“-Verfahren konnten die Mutanten *dor2* und *dor3* (degradation of Rpn4) isoliert werden, die den Abbau von Rpn4 beeinträchtigen. In der *dor2*-Mutante scheint das Gen *FHL1* betroffen zu sein, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der an der Prozessierung ribosomaler RNA beteiligt ist. Die Identität des durch *dor3* betroffenen Genes ist noch unbekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass hier spezifisch der Ubiquitin-abhängige Abbau von Rpn4 gestört ist.

Neben der Kontrolle der Expression proteasomaler Gene ist Rpn4 auch Teil eines Netzwerks, das die zelluläre Antwort auf unterschiedliche Stressbedingungen reguliert, die die Beseitigung von DNA-Schäden einschließt. Die Auswirkungen von Substanzen, die solchen Stress hervorrufen, wurden am Beispiel von Methylmethansulfonat (MMS) und Koffein untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von MMS zu einer Steigerung der *RPN4*-Genexpression führt, während die Zugabe von Koffein zu einem raschen Abbau von Rpn4 führt. Die Deletion von *RPN4* führte zu einer starken Sensitivität gegen beide Substanzen. Die Überexpression der Gene *YAP1* oder *SSZ1*, für die eine Funktion in der zellulären Antwort auf verschiedene Stressbedingungen beschrieben ist, bewirkte eine Suppression dieser Sensitivität. Die Analyse der Mechanismen, die der Regulation von Rpn4 zugrunde liegen, könnte zu interessanten Einblicken in das Zusammenspiel zwischen dem Ubiquitin/Proteasom-System und der zellulären Stressantwort führen.

6 Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J., (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J., (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-3402.
- Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B. A., Wilkinson, K. D. und Hochstrasser, M., (1997). "In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome." *Embo J* **16**(16): 4826-4838.
- Arendt, C. S. und Hochstrasser, M., (1997). "Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7156-7161.
- Arendt, C. S. und Hochstrasser, M., (1999). "Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly." *Embo J* **18**(13): 3575-3585.
- Bachmair, A., Finley, D. und Varshavsky, A., (1986). "In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue." *Science* **234**(4773): 179-186.
- Bachmair, A. und Varshavsky, A., (1989). "The degradation signal in a short-lived protein." *Cell* **56**(6): 1019-1032.
- Baker R.T. (2000) Deubiquitinating enzymes and the regulation of Proteolysis. In: Hilt W. und Wolf D.H.(Hrsg.): *Proteasomes the World of Regulatory Proteolysis*. Eureka.com/Landes Bioscience, Georgetown, Texas
- Bartel, B., Wunning, I. und Varshavsky, A., (1990). "The recognition component of the N-end rule pathway." *Embo J* **9**(10): 3179-3189.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F. und Seemüller, E., (1998). "The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease." *Cell* **92**(3): 367-380.
- Benaroudj, N., Zwickl, P., Seemüller, E., Baumeister, W. und Goldberg, A. L., (2003). "ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation." *Mol Cell* **11**(1): 69-78.
- Biederer, T., Volkwein, C. und Sommer, T., (1997). "Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface." *Science* **278**(5344): 1806-1809.
- Blondel, M. und Mann, C., (1996). "G2 cyclins are required for the degradation of G1 cyclins in yeast." *Nature* **384**(6606): 279-282.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. und Huber, R., (1999). "The proteasome." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**: 295-317.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification 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**(4): 221-226.
- Bregman, D. B., Du, L., van der Zee, S. und Warren, S. L., (1995). "Transcription-dependent redistribution of the large subunit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains." *J Cell Biol* **129**(2): 287-298.
- Bullock, W.O. et al. (1987). *BioTechniques* **5**: 376-378.
- Burri, L., Höckendorff, J., Boehm, U., Klamp, T., Dohmen, R. J. und Levy, F., (2000). "Identification and characterization of a mammalian protein interacting with 20S proteasome precursors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(19): 10348-10353.
- 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**(4898): 1576-1583.
- Chen, P. und Hochstrasser, M., (1996). "Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly." *Cell* **86**(6): 961-972.
- Chen, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S. und Hochstrasser, M., (1993). "Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor." *Cell* **74**(2): 357-369.
- Chernova, T. A., Allen, K. D., Wesoloski, L. M., Shanks, J. R., Chernoff, Y. O. und Wilkinson, K. D., (2003). "Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool." *J Biol Chem* **278**(52): 52102-52115.
- Coleman, S. T., Tseng, E. und Moye-Rowley, W. S., (1997). "Saccharomyces cerevisiae basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the ATR1 structural gene." *J Biol Chem* **272**(37): 23224-23230.
- Connell, P., Ballinger, C. A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L. J., Hohfeld, J. und Patterson, C., (2001). "The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins." *Nat Cell Biol* **3**(1): 93-96.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. und Brown, P. O., (1997). "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale." *Science* **278**(5338): 680-686.
- DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C. und Goffeau, A., (2000). "Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants." *FEBS Lett* **470**(2): 156-160.
- Deshaies, R. J., (1999). "SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 435-467.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. und Rechsteiner, M., (1994). "A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates." *J Biol Chem* **269**(10): 7059-7061.

- Dexter, D., Moye-Rowley, W. S., Wu, A. L. und Golin, J., (1994). "Mutations in the yeast PDR3, PDR4, PDR7 and PDR9 pleiotropic (multiple) drug resistance loci affect the transcript level of an ATP binding cassette transporter encoding gene, PDR5." *Genetics* **136**(2): 505-515.
- Ditzel, L., Huber, R., Mann, K., Heinemeyer, W., Wolf, D. H. und Groll, M., (1998). "Conformational constraints for protein self-cleavage in the proteasome." *J Mol Biol* **279**(5): 1187-1191.
- Ditzel, M., Wilson, R., Tenev, T., Zachariou, A., Paul, A., Deas, E. und Meier, P., (2003). "Degradation of DIAP1 by the N-end rule pathway is essential for regulating apoptosis." *Nat Cell Biol* **5**(5): 467-473.
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Höner, C.B. und Hollenberg, C.P. (1991a) An efficient transformation procedure enabling long time storage of competent cells of different yeast genera. *Yeast* **7**: 691.
- Dohmen, R. J., Madura, K., Bartel, B. und Varshavsky, A., (1991b). "The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7351-7355.
- Dohmen, R. J., Stappen, R., McGrath, J. P., Forrova, H., Kolarov, J., Goffeau, A. und Varshavsky, A., (1995). "An essential yeast gene encoding a homolog of ubiquitin-activating enzyme." *J Biol Chem* **270**(30): 18099-18109.
- Dohmen R.J. (2000) Primary Destruction Signals. In: Hilt W. und Wolf D.H.(Hrsg.): Proteasomes the World of Regulatory Proteolysis. Eureka.com/Landes Bioscience, Georgetown, Texas
- 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**(9): 725-730.
- Estruch, F. (2000). "Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast." *FEMS Microbiol. Rev.* **24**(4): 469-486.
- Fang, C. H., Li, B. G., Fischer, D. R., Wang, J. J., Runnels, H. A., Monaco, J. J. und Hasselgren, P. O., (2000). "Burn injury upregulates the activity and gene expression of the 20 S proteasome in rat skeletal muscle." *Clin Sci (Lond)* **99**(3): 181-187.
- 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**(5): 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**(42): 12798-12805.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. und Struhl, K., (1997). "Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions." *Mol Cell Biol* **17**(12): 6982-6993.
- Finley, D., Ciechanover, A. und Varshavsky, A., (1984). "Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85." *Cell* **37**(1): 43-55.
- Finley, D., Özkaynak, E. und Varshavsky, A., (1987). "The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses." *Cell* **48**(6): 1035-1046.

- Finley, D., Bartel, B. und Varshavsky, A., (1989). "The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis." *Nature* **338**(6214): 394-401.
- Finley, D., Tanaka, K., Mann, C., Feldmann, H., Hochstrasser, M., *et al.*, (1998). "Unified nomenclature for subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome regulatory particle." *Trends Biochem Sci* **23**(7): 244-245.
- Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J. A., Capati, C., McDonald, W. H., Yates, J. R. und Kaiser, P., (2004). "Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain." *Nat Cell Biol* **6**(7): 634-641.
- Frentzel, S., Kuhn-Hartmann, I., Gernold, M., Gott, P., Seelig, A. und Kloetzel, P. M., (1993). "The major-histocompatibility-complex-encoded beta-type proteasome subunits LMP2 and LMP7. Evidence that LMP2 and LMP7 are synthesized as proproteins and that cellular levels of both mRNA and LMP-containing 20S proteasomes are differentially regulated." *Eur J Biochem* **216**(1): 119-126.
- 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**(4): 975-981.
- 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**(2): 149-154.
- Galan, J. M. und Haguenaer-Tsapis, R., (1997). "Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein." *Embo J* **16**(19): 5847-5854.
- Gautschi, M., Lilie, H., Funfschilling, U., Mun, A., Ross, S., Lithgow, T., Rucknagel, P. und Rospert, S., (2001). "RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(7): 3762-3767.
- Gautschi, M., Mun, A., Ross, S. und Rospert, S., (2002). "A functional chaperone triad on the yeast ribosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4209-4214.
- Gerards, W. L., de Jong, W. W., Bloemendal, H. und Boelens, W., (1998). "The human proteasomal subunit HsC8 induces ring formation of other alpha-type subunits." *J Mol Biol* **275**(1): 113-121.
- Gietz, R.D. und Sugino, A. (1988). „New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites.” *Gene* **74**(2): 527-534.
- Gietz, R.D. und Schiestl, R.H. (1995) Transforming yeast with DNA. *Meth. Mol. And Cell. Biol.* **Vol. 5**: 255
- Gille, C., Goede, A., Schloetelburg, C., Preissner, R., Kloetzel, P. M., Gobel, U. B. und Frommel, C., (2003). "A comprehensive view on proteasomal sequences: implications for the evolution of the proteasome." *J Mol Biol* **326**(5): 1437-1448.
- Gillette, T. G., Huang, W., Russell, S. J., Reed, S. H., Johnston, S. A. und Friedberg, E. C., (2001). "The 19S complex of the proteasome regulates nucleotide excision repair in yeast." *Genes Dev* **15**(12): 1528-1539.

- Gillette, T. G., Gonzalez, F., Delahodde, A., Johnston, S. A. und Kodadek, T., (2004). "Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 5904-5909.
- 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**(5): 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**(6): 3149-3162.
- Glotzer, M., Murray, A. W. und Kirschner, M. W., (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." *Nature* **349**(6305): 132-138.
- Goldberg, A. L., (2003). "Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins." *Nature* **426**(6968): 895-899.
- Gonda, D. K., Bachmair, A., Wüning, I., Tobias, J. W., Lane, W. S. und Varshavsky, A., (1989). "Universality and structure of the N-end rule." *J Biol Chem* **264**(28): 16700-16712.
- Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T. und Johnston, S. A., (2002). "Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter." *Science* **296**(5567): 548-550.
- Griffin, T. A., Slack, J. P., McCluskey, T. S., Monaco, J. J. und Colbert, R. A., (2000). "Identification of Proteasomelin, a Mammalian Homologue of the Yeast Protein, Ump1p, That Is Required for Normal Proteasome Assembly." *Mol Cell Biol Res Commun* **3**(4): 212-217.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R. und Kloetzel, P. M., (1996). "A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome." *Eur J Immunol* **26**(4): 863-869.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, 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**(6624): 463-471.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. und Finley, D., (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." *Nat Struct Biol* **7**(11): 1062-1067.
- Hallstrom, T. C., Katzmann, D. J., Torres, R. J., Sharp, W. J. und Moyer-Rowley, W. S., (1998). "Regulation of transcription factor Pdr1p function by an Hsp70 protein in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **18**(3): 1147-1155.
- Hanahan, D. (1985) Techniques of transformation of *E.coli*. *DNA cloning* **1**: 109-135
- Hanna, J., Leggett, D. S. und Finley, D., (2003). "Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors." *Mol Cell Biol* **23**(24): 9251-9261.
- Harshman, K.D., Moyer-Rowley, W.S. und Parker, C.S. (1988). "Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4." *Cell* **53**(2): 321-330.
- Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. und Nakayama, K. I., (2001). "U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases." *J Biol Chem* **276**(35): 33111-33120.

- Hatakeyama, S. und Nakayama, K. I., (2003). "U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases." *Biochem Biophys Res Commun* **302**(4): 635-645.
- 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**(40): 25200-25209.
- Hermann-Le Denmat, S., Werner, M., Sentenac, A. und Thuriaux, P., (1994). "Suppression of yeast RNA polymerase III mutations by FHL1, a gene coding for a fork head protein involved in rRNA processing." *Mol Cell Biol* **14**(5): 2905-2913.
- Hershko, A. und Ciechanover, A., (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479.
- Hicke, L. und Riezman, H., (1996). "Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis." *Cell* **84**(2): 277-287.
- Hicke, L., (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 195-201.
- Hilioti, Z., Chung, Y. S., Mochizuki, Y., Hardy, C. F. und Cohen-Fix, O., (2001). "The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner." *Curr Biol* **11**(17): 1347-1352.
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M. und Wolf, D. H., (1996). "ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway." *Science* **273**(5282): 1725-1728.
- Hobler, S. C., Williams, A., Fischer, D., Wang, J. J., Sun, X., Fischer, J. E., Monaco, J. J. und Hasselgren, P. O., (1999). "Activity and expression of the 20S proteasome are increased in skeletal muscle during sepsis." *Am J Physiol* **277**(2 Pt 2): R434-440.
- Hochstrasser, M. und Varshavsky, A., (1990). "In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor." *Cell* **61**(4): 697-708.
- Hochstrasser, M., (1996). "Ubiquitin-dependent protein degradation." *Annu Rev Genet* **30**: 405-439.
- Hochstrasser, M., (2004). "Ubiquitin signalling: what's in a chain?" *Nat Cell Biol* **6**(7): 571-572.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S., (2002). "RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO." *Nature* **419**(6903): 135-141.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D. und Jentsch, S., (2000). "Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing." *Cell* **102**(5): 577-586.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S. und Howley, P. M., (1995). "A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2563-2567.
- Hundley, H., Eisenman, H., Walter, W., Evans, T., Hotokezaka, Y., Wiedmann, M. und Craig, E., (2002). "The in vivo function of the ribosome-associated Hsp70, Ssz1, does not require its putative peptide-binding domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7): 4203-4208.

- Imai, J., Maruya, M., Yashiroda, H., Yahara, I. und Tanaka, K. (2003). "The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome." *EMBO J.* **22**(14): 3557-3567
- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I. und Takahashi, R., (2002). "CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity." *Mol Cell* **10**(1): 55-67.
- Isono, E., Saeki, Y., Yokosawa, H. und Toh-e, A., (2004). "Rpn7 Is required for the structural integrity of the 26 S proteasome of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **279**(26): 27168-27176.
- Jäger, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D. H. und Heinemeyer, W., (1999). "Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function." *J Mol Biol* **291**(4): 997-1013.
- Jelinsky, S. A. und Samson, L. D., (1999). "Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1486-1491.
- Jelinsky, S. A., Estep, P., Church, G. M. und Samson, L. D., (2000). "Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes." *Mol Cell Biol* **20**(21): 8157-8167.
- Jentsch, S., McGrath, J. P. und Varshavsky, A., (1987). "The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme." *Nature* **329**(6135): 131-134.
- Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M. und Varshavsky, A., (1995). "A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal." *J Biol Chem* **270**(29): 17442-17456.
- Johnson, E. S. und Blobel, G., (1997a). "Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p." *J Biol Chem* **272**(43): 26799-26802.
- Johnson, E. S., Schwienhorst, I., Dohmen, R. J. und Blobel, G., (1997b). "The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer." *Embo J* **16**(18): 5509-5519.
- Johnson, P. R., Swanson, R., Rakhilina, L. und Hochstrasser, M., (1998). "Degradation signal masking by heterodimerization of MATalpha2 and MATa1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-proteasome pathway." *Cell* **94**(2): 217-227.
- Ju, D. und Xie, Y., (2004). "Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent." *J Biol Chem* **279**(23): 23851-23854.
- Kamura, T., Koepp, D. M., Conrad, M. N., Skowyra, D., Moreland, R. J., Iliopoulos, O., Lane, W. S., Kaelin, W. G., Jr., Elledge, S. J., Conaway, R. C., Harper, J. W. und Conaway, J. W., (1999). "Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase." *Science* **284**(5414): 657-661.
- Katzmann, D. J., Babst, M. und Emr, S. D., (2001). "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I." *Cell* **106**(2): 145-155.
- Kaufmann, W. K., Heffernan, T. P., Beaulieu, L. M., Doherty, S., Frank, A. R., Zhou, Y., Bryant, M. F., Zhou, T., Luche, D. D., Nikolaishvili-Feinberg, N., Simpson, D. A. und Cordeiro-Stone, M.,

- (2003). "Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery." *Mutat Res* **532**(1-2): 85-102.
- Keck, B. (1999). "Genetische Studien zur Ubiquitin-vermittelten Proteolyse in *Saccharomyces cerevisiae*." Dissertation, Universität Düsseldorf.
- Kile, B. T., Schulman, B. A., Alexander, W. S., Nicola, N. A., Martin, H. M. und Hilton, D. J., (2002). "The SOCS box: a tale of destruction and degradation." *Trends Biochem Sci* **27**(5): 235-241.
- Kim, S. Y., Herbst, A., Tworkowski, K. A., Salghetti, S. E. und Tansey, W. P., (2003). "Skp2 regulates Myc protein stability and activity." *Mol Cell* **11**(5): 1177-1188.
- Knipfer, N. und Shrader, T. E., (1997). "Inactivation of the 20S proteasome in *Mycobacterium smegmatis*." *Mol Microbiol* **25**(2): 375-383.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. und Schiebel, E., (1999). "Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines." *Yeast* **15**(10B): 963-972.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U. und Jentsch, S., (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." *Cell* **96**(5): 635-644.
- Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R. G. und Fink, G. R., (1994). "Regulated degradation of the transcription factor Gcn4." *Embo J* **13**(24): 6021-6030.
- Kostova, Z. und Wolf, D. H., (2003). "For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection." *Embo J* **22**(10): 2309-2317.
- Krüger, E., Kloetzel, P. M. und Enenkel, C., (2001). "20S proteasome biogenesis." *Biochimie* **83**(3-4): 289-293.
- Kuckelkorn, U., Frentzel, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M. und Kloetzel, P. M., (1995). "Incorporation of major histocompatibility complex--encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma." *Eur J Immunol* **25**(9): 2605-2611.
- Kumar, S., Talis, A. L. und Howley, P. M., (1999). "Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination." *J Biol Chem* **274**(26): 18785-18792.
- Lämmler, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lam, Y. A., DeMartino, G. N., Pickart, C. M. und Cohen, R. E., (1997). "Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes." *J Biol Chem* **272**(45): 28438-28446.
- 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**(6882): 763-767.
- 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**(3): 495-507.

- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K. und Jentsch, S., (1998). "A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system." *Embo J* **17**(8): 2208-2214.
- Lim, H. H., Goh, P. Y. und Surana, U., (1998). "Cdc20 is essential for the cyclosome-mediated proteolysis of both Pds1 and Clb2 during M phase in budding yeast." *Curr Biol* **8**(4): 231-234.
- Lin, L., DeMartino, G. N. und Greene, W. C., (1998). "Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome." *Cell* **92**(6): 819-828.
- London, M.K., Keck, B.I., Ramos, P.C. und Dohmen, R.J. (2004). "Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome." *FEBS Lett* **567**: 259-264.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J. R., (1998). "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**(10): 953-961.
- Macagno, A., Gilliet, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Nestle, F. O. und Groettrup, M., (1999). "Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation." *Eur J Immunol* **29**(12): 4037-4042.
- Madura, K., Dohmen, R. J. und Varshavsky, A., (1993). "N-recognin/Ubc2 interactions in the N-end rule pathway." *J Biol Chem* **268**(16): 12046-12054.
- Mann C., und Hilt W. (2000) The ubiquitin-proteasome system in cell cycle control. In: Hilt W. und Wolf D.H.(Hrsg.): Proteasomes the World of Regulatory Proteolysis. Eurekah.com/Landes Bioscience, Georgetown, Texas
- Mannhaupt, G., Schnell, 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**(1-2): 27-34.
- Mayr, J., Seemuller, E., Muller, S. A., Engel, A. und Baumeister, W., (1998). "Late events in the assembly of 20S proteasomes." *J Struct Biol* **124**(2-3): 179-188.
- McGrath, J. P., Jentsch, S. und Varshavsky, A., (1991). "UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme." *Embo J* **10**(1): 227-236.
- Moser, B. A., Brondello, J. M., Baber-Furnari, B. und Russell, P., (2000). "Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast." *Mol Cell Biol* **20**(12): 4288-4294.
- Muheim, A., Waldner, R., Sanglard, D., Reiser, J., Schoemaker, H. E. und Leisola, M. S., (1991). "Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*." *Eur J Biochem* **195**(2): 369-375.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K. und Ichihara, A., (1992). "Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination." *Nature* **360**(6404): 597-599.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. und Tanaka, K., (2001). "CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein." *EMBO Rep* **2**(12): 1133-1138.

- Muratani, M. und Tansey, W. P., (2003). "How the ubiquitin-proteasome system controls transcription." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(3): 192-201.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D. B. und Monaco, J. J., (1997). "Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits." *Embo J* **16**(17): 5363-5375.
- Nasmyth, K.A. und Tatchell, K. (1980). "The structure of transposable yeast mating type loci." *Cell* **19**(3):753-764.
- Navon, A. und Goldberg, A. L., (2001). "Proteins are unfolded on the surface of the ATPase ring before transport into the proteasome." *Mol Cell* **8**(6): 1339-1349.
- Nelson, M. K., Kurihara, T. und Silver, P. A., (1993). "Extragenic suppressors of mutations in the cytoplasmic C terminus of SEC63 define five genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **134**(1): 159-173.
- Neumann, S., Petfalski, E., Brugger, B., Grosshans, H., Wieland, F., Tollervey, D. und Hurt, E., (2003). "Formation and nuclear export of tRNA, rRNA and mRNA is regulated by the ubiquitin ligase Rsp5p." *EMBO Rep* **4**(12): 1156-1162.
- Notredame C, Higgins DG, und Heringa J. (2000). "T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment." *J Mol Biol* **302**(1): 205-217.
- Orlowski, M. und Wilk, S., (2003). "Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome." *Arch Biochem Biophys* **415**(1): 1-5.
- Ortolan, T. G., Tongaonkar, P., Lambertson, D., Chen, L., Schaubert, C. und Madura, K., (2000). "The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly." *Nat Cell Biol* **2**(9): 601-608.
- Oskouian, B. und Saba, J. D., (1999). "YAP1 confers resistance to the fatty acid synthase inhibitor cerulenin through the transporter Flr1p in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **261**(2): 346-353.
- Owsianik, G., Balzi I, L. und Ghislain, M., (2002). "Control of 26S proteasome expression by transcription factors regulating multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* **43**(5): 1295-1308.
- Özkaynak, E., Finley, D., Solomon, M. J. und Varshavsky, A., (1987). "The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions." *Embo J* **6**(5): 1429-1439.
- Özkaynak, E., Finley, D. und Varshavsky, A., (1984). "The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein." *Nature* **312**(5995): 663-666.
- Papa, F. R. und Hochstrasser, M., (1993). "The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene." *Nature* **366**(6453): 313-319.
- 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**(3): 741-756.

- Patnaik, A., Chau, V. und Wills, J. W., (2000). "Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24): 13069-13074.
- Pickart, C. M., (2000). "Ubiquitin in chains." *Trends Biochem Sci* **25**(11): 544-548.
- Ramos, P. C., Höckendorff, 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**(4): 489-499.
- Ramos, P. C., Marques, A. J., London, M. K. und Dohmen, R. J., (2004). "Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes." *J Biol Chem* **279**(14): 14323-14330.
- Rao, H., Uhlmann, F., Nasmyth, K. und Varshavsky, A., (2001). "Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability." *Nature* **410**(6831): 955-959.
- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H. und Jentsch, S., (2001). "Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone." *Cell* **107**(5): 667-677.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S. W., (1996). "PEST sequences and regulation by proteolysis." *Trends Biochem Sci* **21**(7): 267-271.
- Robzyk, K. und Kassir, Y. (1992) A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucl. Acids Res.* **20**: 3790.
- Robzyk, K., Recht, J. und Osley, M. A., (2000). "Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast." *Science* **287**(5452): 501-504.
- Rock, K. L. und Goldberg, A. L., (1999). "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides." *Annu Rev Immunol* **17**: 739-779.
- Rodrigues-Pousada, C. A., Nevitt, T., Menezes, R., Azevedo, D., Pereira, J. und Amaral, C., (2004). "Yeast activator proteins and stress response: an overview." *FEBS Lett* **567**(1): 80-85.
- Rose, M.D., Winston, F. und Hieter, P. (1990) "Methods in yeast genetics, a laboratory course manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Rowley, R. und Zhang, J., (1999). "Caffeine-mediated override of checkpoint controls. A requirement for rhp6 (*Schizosaccharomyces pombe*)." *Genetics* **152**(1): 61-71.
- Rubin, D. M., van Nocker, S., Glickman, M., Coux, O., Wefes, I., Sadis, S., Fu, H., Goldberg, A., Vierstra, R. und Finley, D., (1997). "ATPase and ubiquitin-binding proteins of the yeast proteasome." *Mol Biol Rep* **24**(1-2): 17-26.
- Russell, S. J., Reed, S. H., Huang, W., Friedberg, E. C. und Johnston, S. A., (1999). "The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair." *Mol Cell* **3**(6): 687-695.
- Sadis, S., Atienza, C., Jr. und Finley, D., (1995). "Synthetic signals for ubiquitin-dependent proteolysis." *Mol Cell Biol* **15**(8): 4086-4094.

- Salghetti, S. E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B. und Tansey, W. P., (2000). "Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3118-3123.
- Salghetti, S. E., Caudy, A. A., Chenoweth, J. G. und Tansey, W. P., (2001). "Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin." *Science* **293**(5535): 1651-1653.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Santamaria, P. G., Finley, D., Ballesta, J. P. und Remacha, M., (2003). "Rpn6p, a proteasome subunit from *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for the assembly and activity of the 26 S proteasome." *J Biol Chem* **278**(9): 6687-6695.
- Scheffner, M., Nuber, U. und Huibregtse, J. M., (1995). "Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade." *Nature* **373**(6509): 81-83.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. und Howley, P. M., (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63**(6): 1129-1136.
- Schlegel, R. und Pardee, A. B., (1986). "Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells." *Science* **232**(4755): 1264-1266.
- Schmidt, M. und Kloetzel, P. M., (1997a). "Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme." *Faseb J* **11**(14): 1235-1243.
- Schmidt, M., Schmidtke, G. und Kloetzel, P. M., (1997b). "Structure and structure formation of the 20S proteasome." *Mol Biol Rep* **24**(1-2): 103-112.
- Schmidt, M., Zantopf, D., Kraft, R., Kostka, S., Preissner, R. und Kloetzel, P. M., (1999). "Sequence information within proteasomal prosequences mediates efficient integration of beta-subunits into the 20 S proteasome complex." *J Mol Biol* **288**(1): 117-128.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, 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**(24): 6887-6898.
- Schmidtke, G., Schmidt, M. und Kloetzel, P. M., (1997). "Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes." *J Mol Biol* **268**(1): 95-106.
- Schnell, N. und Entian, K. D., (1991). "Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (PAR1) conferring resistance to iron chelators." *Eur J Biochem* **200**(2): 487-493.
- Seemüller, E., Lupas, A. und Baumeister, W., (1996). "Autocatalytic processing of the 20S proteasome." *Nature* **382**(6590): 468-471.
- Seufert, W. und Jentsch, S., (1990). "Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins." *Embo J* **9**(2): 543-550.

- Simon, J. R., Treger, J. M. und McEntee, K., (1999). "Multiple independent regulatory pathways control UBI4 expression after heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* **31**(3): 823-832.
- Singh, K. K. und Samson, L., (1995). "Replication protein A binds to regulatory elements in yeast DNA repair and DNA metabolism genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 4907-4911.
- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J. und Harper, J. W., (1997). "F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex." *Cell* **91**(2): 209-219.
- Sommer, T. (2000) The Ubiquitin System in Yeast. In: Hilt W. und Wolf D.H.(Hrsg.): *Proteasomes the World of Regulatory Proteolysis*. Eureka.com/Landes Bioscience, Georgetown, Texas
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L. und Finley, D., (1995). "A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination." *Mol Cell Biol* **15**(3): 1265-1273.
- Spence, J., Gali, R. R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M. und Finley, D., (2000). "Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain." *Cell* **102**(1): 67-76.
- Stephen, D. W., Rivers, S. L. und Jamieson, D. J., (1995). "The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Microbiol* **16**(3): 415-423.
- Swaminathan, S., Amerik, A. Y. und Hochstrasser, M., (1999). "The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast." *Mol Biol Cell* **10**(8): 2583-2594.
- Tabb, A. L., Utsugi, T., Wooten-Kee, C. R., Sasaki, T., Edling, S. A., Gump, W., Kikuchi, Y. und Ellis, S. R., (2001). "Genes encoding ribosomal proteins Rps0A/B of *Saccharomyces cerevisiae* interact with TOM1 mutants defective in ribosome synthesis." *Genetics* **157**(3): 1107-1116.
- Tamura, T., Nagy, I., Lupas, A., Lottspeich, F., Cejka, Z., Schoofs, G., Tanaka, K., De Mot, R. und Baumeister, W., (1995). "The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of *Rhodococcus*." *Curr Biol* **5**(7): 766-774.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. und Toh-e, A., (1988). "Dual regulation of the expression of the polyubiquitin gene by cyclic AMP and heat shock in yeast." *Embo J* **7**(2): 495-502.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. und Pickart, C. M., (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." *Embo J* **19**(1): 94-102.
- Tiao, G., Hobler, S., Wang, J. J., Meyer, T. A., Luchette, F. A., Fischer, J. E. und Hasselgren, P. O., (1997). "Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle." *J Clin Invest* **99**(2): 163-168.
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G. und Varshavsky, A., (1991). "The N-end rule in bacteria." *Science* **254**(5036): 1374-1377.
- Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R. und Futcher, B., (1992). "The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation." *Embo J* **11**(5): 1773-1784.
- Ulrich, H. D. und Jentsch, S., (2000). "Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair." *Embo J* **19**(13): 3388-3397.

- Utsugi, T., Hirata, A., Sekiguchi, Y., Sasaki, T., Toh-e, A. und Kikuchi, Y., (1999). "Yeast tom1 mutant exhibits pleiotropic defects in nuclear division, maintenance of nuclear structure and nucleocytoplasmic transport at high temperatures." *Gene* **234**(2): 285-295.
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. und 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**(11): 6020-6028.
- Velichutina, I., Connerly, P. L., Arendt, C. S., Li, X. und Hochstrasser, M., (2004). "Plasticity in eucaryotic 20S proteasome ring assembly revealed by a subunit deletion in yeast." *Embo J* **23**(3): 500-510.
- 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**(5593): 611-615.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J. und Deshaies, R. J., (2004). "Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system." *Cell* **118**(1): 99-110.
- Voges, D., Zwickl, P. und Baumeister, W., (1999). "The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis." *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068.
- Watt, R. und Piper, P. W., (1997). "UBI4, the polyubiquitin gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is a heat shock gene that is also subject to catabolite derepression control." *Mol Gen Genet* **253**(4): 439-447.
- Weissman, A. M., (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 169-178.
- Wemmie, J. A., Wu, A. L., Harshman, K. D., Parker, C. S. und Moye-Rowley, W. S., (1994). "Transcriptional activation mediated by the yeast AP-1 protein is required for normal cadmium tolerance." *J Biol Chem* **269**(20): 14690-14697.
- Williams, A., Sun, X., Fischer, J. E. und Hasselgren, P. O., (1999). "The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer." *Surgery* **126**(4): 744-749; discussion 749-750.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P. M. und Krüger, 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): 1-9.
- Wu, A., Wemmie, J. A., Edgington, N. P., Goebel, M., Guevara, J. L. und Moye-Rowley, W. S., (1993). "Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance." *J Biol Chem* **268**(25): 18850-18858.
- 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**(6): 3056-3061.
- Yao, T. und Cohen, R. E., (2002). "A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome." *Nature* **419**(6905): 403-407.

- Yen, H. C., Espiritu, C. und Chang, E. C., (2003). "Rpn5 is a conserved proteasome subunit and required for proper proteasome localization and assembly." *J Biol Chem* **278**(33): 30669-30676.
- Zachariae, W., Shin, T. H., Galova, M., Obermaier, B. und Nasmyth, K., (1996). "Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **274**(5290): 1201-1204.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K. und Seufert, W., (1998a). "Control of cyclin ubiquitination by CDK regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex." *Science* **282**(5349): 1721-1724.
- Zachariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P.D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M.J., Mann, M. und Nasmyth, K. (1998b). "Mass spectrometric analysis of the anaphase promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins." *Science* **279**(5354): 1216-1219.
- Zhou, B.B. und Elledge, S.J. (2000). „The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.” *Nature* **408**(6811): 433-439.
- Zuhl, F., Seemuller, E., Golbik, R. und Baumeister, W., (1997). "Dissecting the assembly pathway of the 20S proteasome." *FEBS Lett* **418**(1-2): 189-194.
- Zwickl, P., Kleinz, J. und Baumeister, W., (1994). "Critical elements in proteasome assembly." *Nat Struct Biol* **1**(11): 765-770.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARS	Autonom replizierende Sequenz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
<i>CEN</i>	Centromer-Sequenz
Ci	Curie
Cys	Cystein
Da	Dalton
dATP	Desoxy-Adenosin-Tri-phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dXTP	Desoxy-Nukleotid-Tri-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
g	relative Zentrifugalkraft
HA	Influenza Virus Häm-Agglutinin Epitop
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
kDa	Kilodalton
min	Minute
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame, offenes Leseraster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	synthetisches Medium, Dextrose
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SG	synthetisches Medium, Galaktose
std	Stunde
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv
U	Unit
Ub	Ubiquitin
UV	ultraviolett
ÜN	über Nacht
Vol.	Volumen
(w/v)	Masse/Volumen-Verhältniss (weight/volume)
X-Gal.	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
YPD	yeast extract, peptone, dextrose
YPG	yeast extract, peptone, galactose

8 Anhang

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

London, M.K., Keck, B.I., Ramos, P.C. und Dohmen, R.J. (2004)

“Regulatory mechanisms controlling biogenesis of ubiquitin and the proteasome.

FEBS Lett **567**(2-3): 259-264

Abstract:

Analysis of several *Saccharomyces cerevisiae* ump mutants with defects in ubiquitin (Ub)-mediated proteolysis yielded insights into the regulation of the polyubiquitin gene UBI4 and of proteasome genes. High-molecular weight Ub-protein conjugates accumulated in ump mutants with impaired proteasome function with a concomitant decrease in the amount of free Ub. In these mutants, transcriptional induction of UBI4 was depending in part on the transcription factor Rpn4. Deletion of UBI4 partially suppressed the growth defects of ump1 mutants, indicating that accumulation of polyubiquitylated proteins is deleterious to cell growth. Transcription of proteasome subunit genes was induced in ump mutants affecting the proteasome, as well as under conditions that mediate DNA damage or the formation of abnormal proteins. This induction required the transcriptional activator Rpn4. Elevated Rpn4 levels in proteasome-deficient mutants or as a response to abnormal proteins were due to increased metabolic stability. Up-regulation of proteasome genes in response to DNA damage, in contrast, is shown to operate via induction of RPN4 transcription.

Ramos, P.C., Marques, A.J., London, M.K. und Dohmen R.J. (2004)

“Role of C-terminal extensions of subunits beta2 and beta7 in assembly and activity of eukaryotic proteasomes.”

J Biol Chem **279**(14): 14323 - 14330

Abstract:

A close inspection of the crystal structure of the yeast 20 S proteasome revealed that a prominent connection between the two beta-rings is mediated by the subunit beta7/Pre4. Its C-terminal extension intercalates between the beta1/Pre3 and beta2/Pup1 subunits on the opposite ring. We show that the interactions promoted by the beta7/Pre4 tail are important to facilitate the formation of 20 S particles from two half-proteasome precursor complexes and/or to stabilize mature 20 S proteasomes. The deletion of 19 residues from the beta7/Pre4 C terminus leads to an accumulation of half-proteasome precursor complexes containing the maturation factor Ump1. The C-terminal extension of beta7/Pre4, which forms several hydrogen bonds with beta1/Pre3, is in addition required for the post-acidic activity mediated by the latter subunit. Deletion of the C-terminal tail of beta7/Pre4 results in an inhibition of beta1/Pre3 propeptide processing and abrogation of post-acidic activity. Our data obtained with yeast strains that expressed the mature form of Pre3 lacking its propeptide suggest that interactions between the Pre4 C terminus and Pre3 stabilize a conformation of its active site, which is essential for post-acidic activity. Deletion of the C-terminal extension of beta2/Pup1, which wraps around beta3/Pup3 within the same beta-ring, is lethal, indicating that this extension serves an essential function in proteasome assembly or stability.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. R. Jürgen Dohmen betreut worden.

Dormagen, Oktober 2004

Markus London

Teilpublikationen im Rahmen dieser Arbeit:

London M.K., Keck B.I., Ramos P.C. und Dohmen R.J. (2004)

FEBS Lett **567**(2-3): 259-264

Ramos P.C., Marques A.J., **London M.K.**, und Dohmen R.J. (2004)

J Biol Chem **279**(14): 14323 - 14330

Lebenslauf

Markus Konrad Justin London

Roßlenbroichstr. 12, 41541 Dormagen

Geburtstag: 20.12.1973

Geburtsort: Neuss

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1980-1984 St. Peter-Grundschule Neuss - Rosellen

1984-1993 Norbert Gymnasium Knechtsteden, Dormagen

Berufsausbildung

10/1993 bis 10/1998 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf,
Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie bei
Prof. Dr. C.P. Hollenberg mit dem Thema
„Untersuchung sekretionslimitierender Faktoren in der Hefe
Saccharomyces cerevisiae“

11/1998 bis 01/1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Mikrobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

seit 03/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Genetik der
Universität zu Köln bei Herrn Prof. Dr. R.J. Dohmen,
Promotion mit dem Thema
„Regulation der Proteasombiogenese in *Saccharomyces
cerevisiae*“

Zivildienst

02/1999 bis 02/2000 Institut für Transplantationsdiagnostik und
Zelltherapie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf