

Characterization of proteasome precursor complexes

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) stellt einen essentiellen Protein-Abbaumechanismus in eukaryotischen Zellen dar – Fehlfunktionen dieses Systems stehen in Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen. Ein zentraler Bestandteil des UPS ist das 26S-Proteasom, ein ca. 2,5 MDa großer, multimerer Protease-Komplex, welcher aus einer 20S-Untereinheit, dem katalytischen Kernkomplex (20S core particle, CP), besteht, an die ein oder zwei 19S-Regulatorkomplexe (19S regulatory particles, RP) angehängt sein können. Die Assemblierung des Proteasoms ist ein geordneter Prozess, für den zahlreiche Chaperone benötigt werden. Es wird angenommen, dass die Assemblierung durch die Bildung eines aus 7 definierten α -Untereinheiten bestehenden Rings initiiert wird. Eine entscheidende Zwischenstufe im Verlauf der Bildung des Kernpartikels ist der 15S-Vorläuferkomplex (15S precursor complex, PC), welcher sowohl die Chaperone Ump1 und Pba1-Pba2 enthält als auch 13 von 14 α - und β -Untereinheiten. Der Einbau der β 7-Untereinheit führt schließlich zur Dimerisierung zweier 15S-Komplexe und zur Bildung des 20S-Komplexes. Obwohl die Kristallstrukturen des 20S-Kernkomplexes sowie des Pba1-Pba2-20S-Komplexes bereits bekannt sind, ist die strukturelle Rolle der Chaperone Ump1 und Pba1-Pba2 während der frühen und späten Phase der Assemblierung des 20S-Kernkomplexes bisher unklar. Durch verschiedene biochemische und biophysikalische Analyseverfahren wurde in dieser Arbeit die Struktur des 15S-Vorläuferkomplexes charakterisiert und mit denen späterer Vorläuferkomplexe Pba1-Pba2-20S aus der *pre1-1*-Mutante, welcher die unprozessierten β -Untereinheiten und Ump1 enthält, sowie mit dem wiederhergestellten Pba1-Pba2-20S-Komplex (Stadtmueller et al., 2012) verglichen. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit den Laboratorien von Dr. Petra Wendler und Dr. Franz Herzog (Gene Center München) durchgeführt. Ebenso wurde ein Komplex in Zellen, in denen kein funktionales Pba1-Pba2 vorkommt, biochemisch analysiert. Dieser Komplex scheint ein früher Vorläufer auf dem Weg zum 15S-Vorläuferkomplex zu sein.

Die vorliegende Arbeit zeigt signifikante strukturelle Veränderungen innerhalb der α - und β -Ringe auf dem Weg vom 15S- zum 20S-Komplex auf. Während sich das Pba1-Pba2 Heterodimer im 15S-Vorläuferkomplex in einer zum Teil eingebetteten Position im Zentrum des α -Rings befindet, wechselt es in eine erhöhte Position im späten unreifen Pba1-Pba2-20S aus der *pre1-1* Mutante. Es konnte gezeigt werden, dass das

Pba1-Pba2-Chaperon nach der Reifung des 20S-Kernkomplexes aus dem α -Ring abgelöst wird und somit im Rahmen der Bildung eines weiteren Proteasoms wiederverwendet werden kann. Im 15S-Vorläuferkomplex liegt Ump1 größtenteils unstrukturiert vor und kleidet die Innenseite des Komplexes aus, wobei es mit mehreren proteasomalen α - und β -Untereinheiten interagiert. Das N-terminale Ende des Ump1-Chaperons ist hierbei an der Öffnung des α -Rings exponiert, während das C-terminale Ende im Inneren des Komplexes eingebettet ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dem N-Terminus von Ump1 eine mögliche Sensorfunktion bei der Dimerisierung zweier 15S-Vorläuferkomplexes zukommen könnte