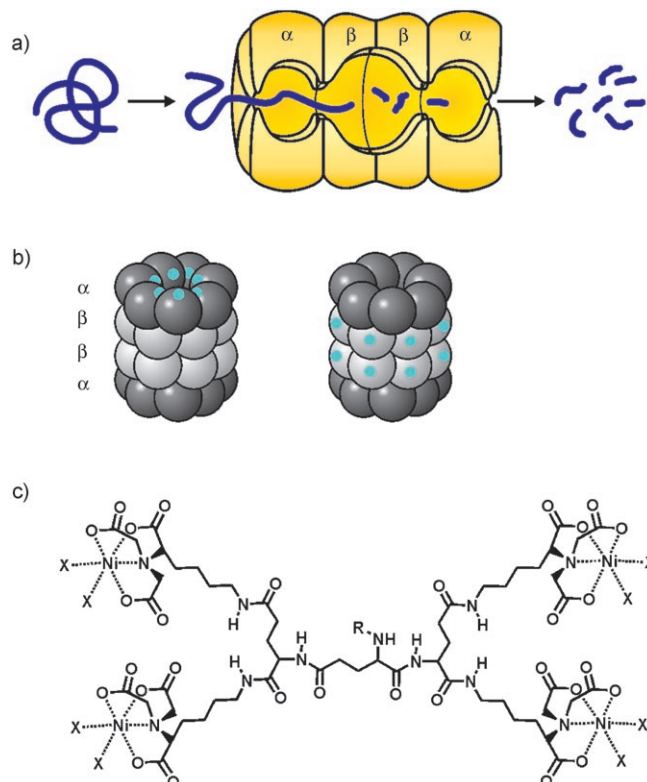


Signaltransduktion und Apoptose, und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung.

Die fassförmige Struktur des 20S-Proteasoms (700 kDa) besteht aus vier gestapelten Ringen von jeweils sieben Untereinheiten ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$), die drei Nanokompartimente einschließen. Die zentrale Degradationskammer setzt sich aus den beiden inneren Ringen zusammen, die aus sieben β -Untereinheiten bestehen. Die beiden äußeren Ringe sind aus sieben dicht gepackten α -Untereinheiten aufgebaut und schließen zwei Vorkammern ein (Schema 1a).^[2] Der Sub-



Schema 1. a) Substratabbau durch den 20S-Proteasomkomplex. Proteine werden innerhalb des 20S-Proteasoms abgebaut und als Peptide freigesetzt. Substrateintritt und Produktaustritt erfolgen durch beide Öffnungen des Proteasoms. Der Eintritt in den Komplex wird durch die N-terminalen Regionen der α -Untereinheiten reguliert. b) His-Tags (türkis) wurden entweder an den N-terminalen Enden der α -Untereinheiten (α N-His₆-Proteasom, links) oder an den C-terminalen Enden der β -Untereinheiten (β C-His₆-Proteasom, rechts) des 20S-Proteasoms von *T. acidophilum* eingeführt. c) Chemische Struktur von Nickel(II)-beladenem tetrakisNTA. R = H, Carboxyfluorescein oder ATTO565; X = Koordinationsstellen, die entweder durch Wasser oder durch Histidinreste besetzt sind.

Nanobiotechnologie

DOI: 10.1002/ange.200600644

Kontrolle der Aktivität des 20S-Proteasoms durch synthetische Torwächter**

Katrin Schulze, Alart Mulder, Ali Tinazli und Robert Tampé*

Der 26S-Proteasomkomplex ist die zentrale Degradationsmaschinerie in eukaryotischen Zellen. Er besteht aus dem proteolytisch aktiven Kernkomplex – dem 20S-Proteasom – und den 19S- oder 11S-Regulationspartikeln (RPs). Im Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselprozess übernimmt der Proteasomkomplex den Abbau von unerwünschten und funktionsgestörten Proteinen.^[1] Darüber hinaus reguliert er verschiedene Schlüsselprozesse in Zellen, z.B. Transkription,

strateintritt in diesen multikatalytischen Enzymkomplex wird wahrscheinlich durch die N-terminalen Enden der α -Untereinheiten bestimmt. Im latenten Zustand sind diese N-terminalen Regionen über eine Vielzahl vernetzter Wechselwirkungen miteinander verbunden, sodass der Eintritt von Substraten an beiden Seiten des Proteasoms erschwert wird. Dabei wirken die N-terminalen Enden nur als Hindernis für Proteinsubstrate; sie behindern dagegen nicht den Eintritt und Abbau von kurzen Polypeptiden durch die Verengung.^[3]

[*] K. Schulze, Dr. A. Mulder, A. Tinazli, Prof. R. Tampé
Institut für Biochemie, Biozentrum
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt (Deutschland)
Fax: (+49) 69-798-29495
E-Mail: tampe@em.uni-frankfurt.de

[**] Wir danken Drs. Silke Hutschenreiter, Suman Lata und Jacob Piehler für hilfreiche Diskussionen und Unterstützung sowie Gerhard Spatz-Kümbel für exzellente fachliche Hilfe. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft und das Bundesministerium für Bildung und Forschung haben diese Arbeit unterstützt.

Mittels Anlagerung von RPs wie PA700, PA28 oder PAN wird der Proteasomkomplex durch Öffnen der Eingänge in einen aktiven Zustand überführt, in dem nun der prozessive Abbau von Proteinen uneingeschränkt möglich ist.^[4,5]

Bei den α -Untereinheiten aus Archaea sind die N-terminalen Enden unstrukturiert und ermöglichen den Substrateintritt durch zwei Eingänge von ca. 13 Å Durchmesser auch ohne spezielle Regulatoren.^[6] Durch den Bruch der D_7 -Symmetrie des 20S-Proteasoms von *Thermoplasma acidophilum* mittels ortsspezifischer, einheitlich orientierter Immobilisierung an Nitrilotriessigsäure(NTA)-Grenzflächen wurde die Bedeutung dieser beiden Öffnungen sowohl für den Substrateintritt als auch für den Produktaustritt demonstriert.^[7]

Hier zeigen wir erstmals den Einsatz von kleinen synthetischen Verbindungen, die gewissermaßen als Torwächter die proteolytische Aktivität des Proteasomkomplexes kontrollieren. Ein multivalenter Chelatorkopf (multivalent chelator head, MCH) mit vier NTA-Gruppen (*tetrakis*NTA, Schema 1c) wird zur Vernetzung der Histidin-Markierungen (His-Tags) verwendet, die entweder an den N-terminalen Regionen der α -Untereinheiten rund um die beiden Öffnungen (α N-His₆-Proteasom) oder an den C-Termini der β -Untereinheiten an der Seite des Proteasoms (β C-His₆-Proteasom, Schema 1b) lokalisiert sind.^[8] Über seine Nickel(II)-Zentren bildet der MCH mit His-Tags stabile Komplexe, die Affinitäten im nanomolaren Bereich aufweisen.^[9]

Als erstes wurde die Bindung von fluoreszierendem *tetrakis*NTA an das 20S-Proteasom von *T. acidophilum* durch Gelfiltrations-Chromatographie untersucht. Das α N-His₆-Proteasom wird bei einem Retentionsvolumen V_R von 1.44 mL eluiert (ca. 700 kDa, Abbildung 1a). Nach Inkubation mit einem 10fachen Überschuss von *tetrakis*NTA(Fluorescein) zeigt der Elutionspeak des 20S-Proteasoms (optische Dichte (OD) = 280 nm) eine weitere Absorption bei 495 nm und eine leichte Verschiebung zu niedrigerem V_R (1.41 mL). Beide Beobachtungen weisen auf eine stabile Fluoreszenzmarkierung hin. Ungebundenes *tetrakis*NTA(Fluorescein) wird bei einem V_R von 1.94 mL eluiert (ca. 2 kDa, Abbildung 1b). Für Proteine ohne His-Tags^[10] oder in Gegenwart von Ethylendiamintetraacetat (EDTA²⁻; 10 mM) oder Imidazol (100 mM) konnte keine Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden, was die ortsspezifische Bindung des *tetrakis*NTA belegt. Eine nahezu komplette Dissoziation (70–80 %) des MCH/Proteasom-Komplexes wird durch Einwirkung von 50 mM Imidazol erreicht, was die Reversibilität der Wechselwirkung zeigt (Abbildung 1c). Für β C-His₆-Proteasomkomplexe wurden analoge Ergebnisse erzielt (Daten nicht gezeigt).

Um die Zahl der an den isolierten Proteasomkomplex gebundenen MCHs zu ermitteln, wurde die *tetrakis*NTA-Konzentration über die charakteristische Absorption des verwendeten Fluorophors und die Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure(BCA)-Test^[11] bestimmt. Wir konnten beobachten, dass zwei (± 0.8) *tetrakis*NTAs an einen α N-His₆-Proteasomkomplex binden, was bedeutet, dass ein *tetrakis*NTA an jedem Eingang angelagert ist. Für das β C-His₆-Proteasom wurden Stöchiometrien von 1:3 (± 0.2) erhalten; dieses höhere Markierungsverhältnis lässt sich durch die

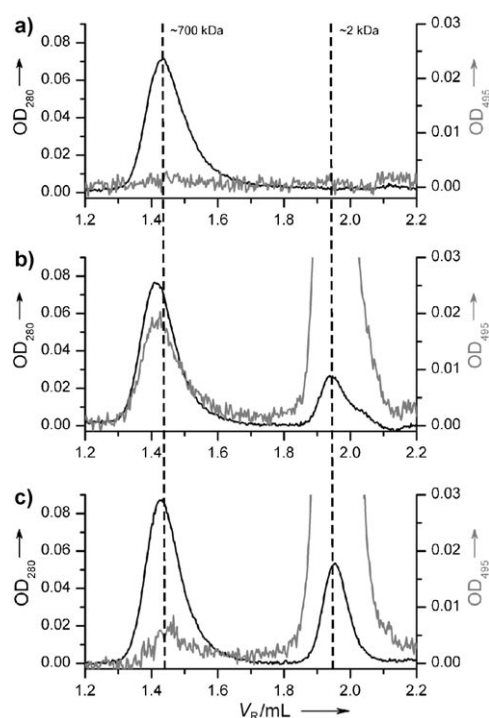


Abbildung 1. Die stabile Komplexbildung von *tetrakis*NTA(Fluorescein) mit dem 20S-Proteasom von *T. acidophilum* wurde mittels Gelfiltration untersucht. α N-His₆-Proteasom ohne (a) und mit (b) einem 10fachen Überschuss von *tetrakis*NTA(Fluorescein). c) Isolierung von freigesetztem 20S-Proteasom durch Zugabe von 50 mM Imidazol zum Laufpuffer. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz) und 495 nm (grau) detektiert.

weniger dicht gepackten Histidin-Sequenzen des β C-His₆-Proteasoms erklären.^[8]

Um weitere Beweise für die Spezifität der Wechselwirkung zwischen MCH und His-Tag zu erhalten, wurden *E. coli*-Zelllysate, die etwa 4300 verschiedene Genprodukte^[12] enthalten, mit *tetrakis*NTA(ATTO565) inkubiert und mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Nativ-PAGE) und Fluoreszenzanalyse untersucht (Abbildung 2). Der Vergleich mit isoliertem α N- oder β C-His₆-Proteasom zeigt, dass die fluoreszierende Bande bei ca. 700 kDa (roter Pfeil) von den fluoreszenzmarkierten Proteasomen stammt. Wegen der zusätzlichen negativen Ladungen des *tetrakis*NTA wandern die markierten 20S-Proteasome etwas weiter als die unmarkierten (schwarzer Pfeil). In Zelllysaten, die keine rekombinanten 20S-Proteasome enthalten, konnte keine Markierung beobachtet werden, was die hohe Selektivität und Spezifität der Markierung belegt.

Die Peptidase-Aktivität des 20S-Proteasoms gegenüber kleinen Peptidsubstraten wurde mithilfe eines In-Gel-Substrat-Überschichtungsexperiments mit Suc-LLVT-AMC untersucht,^[13] bei dem die proteolytische Spaltung dieses nichtfluoreszierenden Peptids zur Freisetzung von fluoreszierendem Amino-4-methylcumarin (AMC) führt.^[14] Fluoreszenzaufnahmen des überschichteten Gels zeigen, dass sowohl die freien als auch die markierten Proteasomkomplexe aktiv sind. Die Assoziation der MCHs hat somit keinen signifikanten Einfluss auf die Peptidase-Aktivität des Pro-

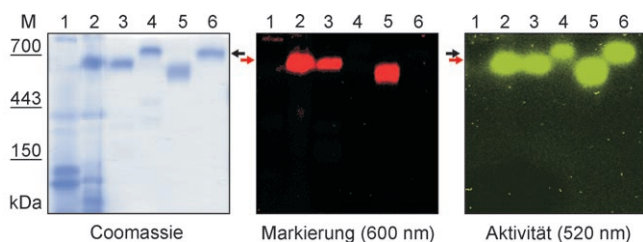


Abbildung 2. Spezifische Markierung des 20S-Proteasoms innerhalb eines kompletten Zelllysats, analysiert mittels Nativ-PAGE und Fluoreszenzanalyse. Zelllysate (140 µg *E. coli*-Proteine) oder isolierte 20S-Proteasomkomplexe (4 µg in Puffer A; siehe Experimentelles) wurden mit *tetrakisNTA*(ATTO565) (17.1 pmol in den Spuren 1, 2, 3, 5) inkubiert. Zelllysate ohne (Spur 1) und mit Expression (Spur 2) von α N-His₆-Proteasomen. Markierte und unmarkierte α N-His₆-Proteasome (Spuren 3 und 4) und β C-His₆-Proteasome (Spuren 5 und 6). Die Proteine wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 angefärbt (links). Das *TetrakisNTA*(ATTO565) wurde bei λ_{em} = 600 nm detektiert (Mitte). Die Aktivitäten der 20S-Proteasome wurden bei λ_{em} = 520 nm durch ein Überschichtungsexperiment mit 100 µM Suc-LLVT-AMC (Suc = Succinyl) nachgewiesen (rechts). Schwarzer und roter Pfeil: unmarkiertes bzw. markiertes Proteasom. M: Molekülmassenstandards.

teasomkomplexes. Diese Befunde sind in Einklang mit der Beobachtung, dass der Eintritt von kleinen Peptiden in die Degradationskammer unabhängig von der Anordnung der N-terminalen Enden der α -Untereinheiten ist.^[5]

Das Überschichtungsexperiment zeigt ausschließlich die Aktivitäten von einzelnen Peptidase-Schnittstellen. Zur Untersuchung der prozessiven proteolytischen Aktivität des Proteasomkomplexes müssen jedoch proteinartige Substrate eingesetzt werden, weshalb wir den Einfluss von *tetrakisNTA* auf den Abbau von mehrfach Fluorescein-markiertem Casein durch das 20S-Proteasom untersuchten (Abbildung 3). Die Spaltung des Caseins führt zu einem Anstieg des vorher gelöschten Fluoreszenzsignals^[14] und ermöglicht so einen direkten Vergleich der Aktivitäten des freien und des komplexierten 20S-Proteasoms. Die beiden unmarkierten, rekombinanten 20S-Proteasome weisen vergleichbare Aktivitäten auf (Abbildung 3, schwarze Kurven und Balken). Die Aktivität des α N-His₆-Proteasoms wird durch die Inkubation mit *tetrakisNTA* vollkommen blockiert, wogegen dies bei dem β C-His₆-Proteasom selbst durch einen 1000fachen molaren Überschuss von *tetrakisNTA* nicht gelang (Abbildung 3, rote Kurven und Balken). Diese Befunde belegen, dass die Bindung der MCHs an die His-Tags der α -Untereinheiten des 20S-Proteasoms zu einer spezifischen, vollständigen Unterbindung des Eintritts von Proteinen in die Degradationskammer führt.

Offensichtlich führt die Anlagerung der MCHs an das α N-His₆-Proteasom zu einer Umstrukturierung der His-Tags in der Nähe der Eingänge in den Proteasomkomplex, wodurch der prozessive Proteinabbau verhindert wird. Bei Abwesenheit von Nickel(II)-Ionen und/oder in Gegenwart von EDTA²⁻ wird die proteolytische Aktivität des α N-His₆-Proteasoms durch die MCHs nicht beeinflusst, was die spezifische Bindung und Kontrolle über die enzymatische Aktivität demonstriert. Zugewetztes Imidazol konkurriert mit den His-Tags um die Bindung und kann somit zur Reaktivierung des blockierten Proteasoms genutzt werden. Das Entfernen der

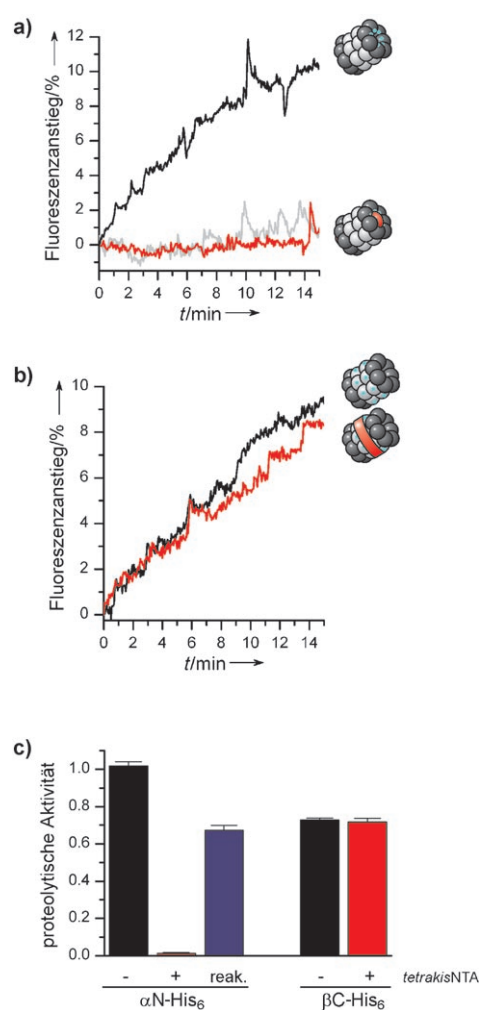


Abbildung 3. Echtzeitabbau von Fluorescein-markiertem Casein (100 nm) durch das 20S-Proteasom (10 nm) in Puffer A bei 60 °C. a) Aktivität des α N-His₆-Proteasoms vor (schwarze Kurve) und nach Inkubation mit 140 nM *tetrakisNTA* (graue Kurve), verglichen mit dem äquilibrierten Fluorescein-markierten Casein. b) Aktivität des β C-His₆-Proteasoms vor (schwarze Kurve) und nach Inkubation mit 10 µM *tetrakisNTA* (rote Kurve). c) Proteolytische Aktivitäten der rekombinanten 20S-Proteasome mit (rote Balken) und ohne (schwarze Balken) *tetrakisNTA* sowie die Aktivität von reaktiviertem (reak.) α N-His₆-Proteasom nach Behandlung mit 50 mM Imidazol (blauer Balken).

synthetischen Torwächter und die Isolierung des freien α N-His₆-Proteasoms wurde mittels Gelfiltration erreicht (Abbildung 1c). Das isolierte, reaktivierte α N-His₆-Proteasom zeigt 70–80 % seiner ursprünglichen proteolytischen Aktivität. Dies stimmt gut mit der Menge an unkomplexiertem Proteasom überein, das nach der Gelfiltration erhalten werden konnte (Abbildung 3c). Die Inaktivierung des 20S-Proteasoms durch *tetrakisNTA* ist folglich reversibel, und die inhärente, proteolytische Aktivität wird durch die Komplexbildung und Dekomplexierung nicht beeinflusst.

Die Verwendung von *tetrakisNTA* bietet dank dessen hoch spezifischer Bindungseigenschaften im nanomolaren Bereich eine elegante Strategie zur Markierung von Proteinen selbst in kompletten Zelllysaten. Die hohe Stabilität der Wechselwirkung zwischen MCH und His-Tag ermöglicht die

Visualisierung und einfache Quantifizierung von His-markierten Proteinen durch Nativ-PAGE und Fluoreszenzanalyse. Die reversible Hemmung des α N-His₆-Proteasoms für Proteinsubstrate durch das *tetrakis*NTA ist ein Beleg, dass der MCH auch für die spezifische Kontrolle und gezielte Manipulation von makromolekularen Maschinen genutzt werden kann. Die hohe Spezifität und Bindungsaffinität sollte im Prinzip die In-vivo-Markierung und Inaktivierung des 20S-Proteasoms ermöglichen; dies dürfte angesichts dessen zentraler Rolle in zahllosen zellulären Prozessen ein großes Interesse wecken.

Experimentelles

Multivalenter Chelatorkopf (MCH): Das *tetrakis*NTA wurde wie zuvor beschrieben synthetisiert.^[9] Carboxyfluorescein (Fluka) oder ATTO565-*N*-Hydroxysuccinimid-Ester (ATTO-TEC) wurden in *N,N*-Dimethylformamid (DMF) an die Aminogruppe des MCH gekuppelt. Zunächst wurden die fluoreszierenden MCHs durch C₁₈-HPLC mit umgekehrten Phasen gereinigt, und anschließend wurde mit Nickel(II)-Ionen beladen. Der Überschuss an Nickel wurde durch Anionenaustausch-Chromatographie abgetrennt (HiTrap Q, GE Healthcare). Die Konzentration an *tetrakis*NTA wurde über die Absorption des entsprechenden Fluorophors bestimmt.

20S-Proteasom: Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteasomkomplexe erfolgten wie beschrieben.^[7,8] Um stabile Komplexe mit dem MCH zu erhalten, wurde das 20S-Proteasom mit einem 10fachen Überschuss an *tetrakis*NTA 3 h auf Eis in Puffer A (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) inkubiert (Hepes = *N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure).

Gelfiltrationsstudien: Für die Gelfiltrationen wurde eine Superose-6-PC-3.2-Säule (GE Healthcare) in Puffer A mit einem Fluss von 50 μ L min⁻¹ bei 10 °C verwendet. Es wurden jeweils 50 μ L einer 0.8 μ M Lösung vom 20S-Proteasom in Puffer A aufgetragen. Um das *tetrakis*NTA vom 20S-Proteasom zu entfernen, wurde das markierte 20S-Proteasom 0.5 h auf Eis mit 50 mM Imidazol in Puffer A inkubiert. Das reaktivierte Proteasom wurde über Gelfiltration mit 50 mM Imidazol im Puffer A isoliert.

Nativ-PAGE: Sowohl die Nativ-PAGE als auch die Substrat-Überschichtungsexperimente wurden im Wesentlichen wie beschrieben durchgeführt, allerdings wurde ein Sammelgel mit einem Polyacrylamidanteil von 3.5% verwendet.^[13] Die EDTA²⁻-Konzentration wurde auf 100 μ M reduziert, um eine Beeinflussung der MCH/His-Tag-Wechselwirkung zu vermeiden. Das Gel wurde mit Zellysaten, die 140 μ g *E. coli*-Proteine enthielten, oder mit jeweils 4 μ g gereinigtem α N- oder β C-His₆-Proteasom mit (17.1 pmol) fluoreszierendem und ohne fluoreszierendes *tetrakis*NTA in Puffer A beladen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einer 100 μ M Lösung von Suc-LLVT-AMC (Bachem) in Tris-Puffer (30 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, pH 7.8) 20 min bei 37 °C überschichtet, um die Aktivität der 20S-Proteasome zu untersuchen (Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, DTT = 1,4-Dithiothreitol).

Abbau von Fluorescein-markiertem Casein: Die Aktivitäten von markierten und von freien 20S-Proteasomen wurden wie zuvor beschrieben untersucht.^[7,14] Zur Markierung wurde ein 14- oder 1000facher molarer Überschuss an *tetrakis*NTA eingesetzt. Die 20S-Proteasome wurden in einer Endkonzentration von 10 nM zu einer 100 nM Lösung von Fluorescein-markiertem Casein in Puffer A bei 60 °C gegeben. Der Anstieg im Fluoreszenzsignal wurde innerhalb von 15 min bei einer Wellenlänge von 495 nm detektiert.

Eingegangen am 17. Februar 2006

Online veröffentlicht am 21. Juli 2006

Stichwörter: Fluoreszenz · Inhibitoren · Protein-Engineering · Proteinmarkierungstechniken · Proteomik

- [1] a) D. Voges, P. Zwickl, W. Baumeister, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 1015; b) A. L. Goldberg, *Nature* **2003**, 426, 895; c) M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter, T. Clausen, R. Huber, *ChemBioChem* **2005**, 6, 222; d) A. Ciechanover, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6095; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5944; ; e) A. Herskho, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6082; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5932.
- [2] a) M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, 386, 463; b) M. Groll, M. Bajorek, A. Kohler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman, D. Finley, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 1062.
- [3] A. Forster, F. G. Whitby, C. P. Hill, *EMBO J.* **2003**, 22, 4356.
- [4] a) M. Groll, H. Brandstetter, H. Bartunik, G. Bourenkow, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **2003**, 327, 75; b) F. G. Whitby, E. I. Masters, L. Kramer, J. R. Knowlton, Y. Yao, C. C. Wang, C. P. Hill, *Nature* **2000**, 408, 115; c) M. Groll, R. Huber, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, 35, 606.
- [5] D. M. Smith, G. Kafri, Y. Cheng, D. Ng, T. Walz, A. L. Goldberg, *Mol. Cell* **2005**, 20, 687.
- [6] a) J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, 268, 533; b) W. Baumeister, A. Lupas, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 273.
- [7] S. Hutschenreiter, A. Tinazli, K. Model, R. Tampé, *EMBO J.* **2004**, 23, 2488.
- [8] A. Thess, S. Hutschenreiter, M. Hofmann, R. Tampé, W. Baumeister, R. Guckenberger, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 36321.
- [9] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10205.
- [10] C. van der Does, C. Presenti, K. Schulze, S. Dinkelaker, R. Tampé, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 5694.
- [11] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, E. K. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, 150, 76.
- [12] F. R. Blattner, G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, Y. Shao, *Science* **1997**, 277, 1453.
- [13] S. Hua, W. Y. To, T. T. Nguyen, M. L. Wong, C. C. Wang, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, 78, 33.
- [14] T. N. Akopian, A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 1791.