

Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktoren des von Hippel-Lindau Tumorsuppressors

Dissertation der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom Chemikerin
Claudia Bex aus Leverkusen
Juli 2005

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Claudia Bex
München, den 27. Juli 2005

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Dezember 2000 und Juli 2005 unter der Anleitung von Dr. Alexander Buchberger am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am 27. Juli 2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Charles N. David

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System	2
2.2. Cullin Ubiquitin Ligasen	5
2.3. Der von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor	8
2.4. HIF und die Regulation durch Sauerstoff	10
2.5. Weitere Funktionen von VHL	15
2.6. Zielsetzung der Arbeit	18
3. Ergebnisse	19
3.1. Expression des GST-VCB Komplexes	19
3.2. Ein funktionaler Assay zur Evaluierung der VHL-Interaktoren	20
3.3. Der GST-VCB Komplex hat spezifische Bindungspartner	21
3.4. VHL bindet den transkriptionellen Repressor Daxx	23
3.5. Weitere durch Massenspektrometrie identifizierte VHL-Interaktoren	37
3.6. Der Mechanismus der HIF1 α -Erkennung durch VHL kann in <i>S. cerevisiae</i> rekonstituiert werden	39
3.7. Charakterisierung der gefundenen Bindungspartner	42
3.8. Diacylglycerolkinase iota (DGK ι)	45
3.9. Andere VHL- Bindungspartner	52
4. Diskussion	59
4.1. Der transkriptionelle Repressor Daxx und VHL	59
4.2. Diacylglycerol Kinase iota und VHL	62
4.3. Weitere Faktoren im VHL-Netzwerk	65
4.4. Alternative Funktionen von VHL	67
5. Material und Methoden	68
5.1. Computeranalysen	68
5.2. Mikrobiologische Arbeiten	68
5.3. Zellbiologische Methoden	72
5.4. Molekularbiologische Methoden	75
5.5. Proteinbiochemische Methoden	79
5.6. Assays	86
5.7. Immunfluoreszenz	88
5.8. Verwendete Plasmide	89
5.9. Verwendete Antikörper	91
6. Literaturverzeichnis	92
Abkürzungsverzeichnis	
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Zusammenfassung

Die Inaktivierung des von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressors spielt eine Rolle in der Entstehung von verschiedenen gut- und bösartigen Tumoren mit hoher Gewebespezifität. Als substraterkennende Untereinheit des CBC^{VHL} Ubiquitin Ligase Komplexes steuert VHL den sauerstoffabhängigen Abbau des Transkriptionsfaktors HIF1/2 α . HIF1/2 α aktiviert die Transkription einer Vielzahl von Faktoren, die für den Energiehaushalt der Zelle und die Blutgefäßneubildung von entscheidender Bedeutung sind. Die Akkumulation von HIF1/2 α führt zu deren konstitutiver Expression und fördert somit das Wachstum von Tumoren durch eine verbesserte Nährstoffversorgung. Der sauerstoffabhängige Mechanismus der HIF-Erkennung wird durch die Aktivität einer neuen Familie von Prolylhydroxylasen reguliert, die möglicherweise ihrerseits eine Reihe von zellulären Substraten haben. Trotz der guten Korrelation zwischen bestimmten, den HIF-Abbau beeinflussenden VHL-Mutationen und dem Auftreten von verschiedenen Krankheitssubtypen sind noch nicht alle Phänotypen im Zusammenhang mit VHL erklärbar. Vor allem die Identifizierung neuer Substrate für den CBC^{VHL} Komplex ist für ein umfassendes Verständnis der VHL-Krankheit von Interesse.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Methoden zur Identifizierung neuer Substrate von VHL angewendet. Durch Affinitätschromatographie mit einem rekombinanten Komplex aus VHL, Elongin B und Elongin C (VCB) konnte Daxx als neuer Interaktor von VHL identifiziert werden. Daxx bindet Elongin B/C-unabhängig an VHL, und seine Stabilität wird nicht durch VHL reguliert. Zudem bildet Daxx einen Komplex mit dem VHL-Substrat HIF1 α . Dies weist auf eine mögliche Funktion von VHL neben seiner Rolle als Ubiquitin Ligase hin, z.B. in der Regulation von Daxx als transkriptionellem Repressor.

In einem funktionalisierten „TwoHybrid“-Screen konnte der Mechanismus der HIF-Regulation in *S. cerevisiae* rekonstituiert werden. Dies ermöglichte die Identifizierung weiterer potentieller VHL-Substrate, unter anderem Diacylglycerol Kinase iota (DGK ι). DGK ι weist zwei Erkennungsmotive für Prolylhydroxylasen auf und wird in Gehirn und Retina exprimiert. In diesen Organen kommt es bei VHL-Patienten zur Entstehung von Hämangioblastomen. DGK ι wird *in vivo* ubiquityliert und bindet sowohl an VHL, als auch an zwei der drei bekannten Prolylhydroxylasen. Mit Mutanten von DGK ι konnte allerdings gezeigt werden, dass Bindung und Ubiquitylierung nicht über den gleichen Mechanismus erfolgen wie bei HIF1 α . Möglicherweise spielen Ubiquitylierung und VHL-Bindung getrennte Rollen in unterschiedlichen zellulären Prozessen.

Es wird zunehmend deutlicher, dass VHL nicht nur eine Komponente des CBC^{VHL} Komplexes bildet, sondern weitere Funktionen in der Zelle erfüllt. VHL spielt eine Rolle in der Assemblierung der Fibronectinmatrix, der Regulation von Mikrotubulistabilität und -dynamik und der Transkriptionskontrolle. Eine weitere Charakterisierung des nicht-degradativen Einflusses von VHL auf die in dieser Arbeit beschriebenen Bindungspartner ist nötig, um die zelluläre Wirkungsweise von VHL vollständig zu verstehen.

2. Einleitung

2.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System

Fast alle zellulären Prozesse werden durch die Verfügbarkeit und Aktivität der an ihnen beteiligten Proteine reguliert. Die Konzentration von Proteinen in der Zelle wird durch Änderungen in der Proteinsynthese oder der Abbaurate reguliert. Die Aktivität von Proteinen kann durch ihre zelluläre Lokalisation, ihre Konformation oder verschiedene kovalente Modifikationen beeinflusst werden. Post-translationale Modifikationen wie Zucker- und Lipidreste werden in der Regel während des Reifeprozesses der Proteine irreversibel angefügt, während Phosphorylierung und Acetylierung reversible Modifikationen sind, die eine schnelle Regulation als Antwort auf ein bestimmtes Signal ermöglichen.

Eine ebenso bedeutende Rolle spielt die post-translationale Modifikation durch Ubiquitin und Ubiquitin-verwandte Proteine (Ubiquitin-likes, UBLs). Hierbei handelt es sich um eine Familie kleiner Proteine, die in eukaryotischen Zellen hochkonserviert sind. Wie bei der Acetylierung werden Ubiquitin und UBLs kovalent an die ϵ -Aminogruppe von Lysinseitenketten des Zielproteins gebunden. Durch diese post-translationale Modifikation wird die Stabilität, Lokalisation oder Aktivität dieser Proteine beeinflusst. Trotz teilweise geringer Ähnlichkeit auf Sequenzebene besitzen Ubiquitin und seine Verwandten eine stark homologe Struktur, den sogenannten „Ubiquitin-fold“. Die meisten werden als inaktives Propeptid translatiert und exponieren erst nach proteolytischer Prozessierung ein C-terminales Doppelglyzinmotiv, über das die Konjugation an Substratproteine erfolgt (vgl. Abb. 1). Ubiquitin, SUMO und Nedd8 sind in allen Eukaryoten konserviert; Nedd8 ist am engsten mit Ubiquitin verwandt. Hub1 ist ebenfalls nahe mit Ubiquitin verwandt, kann aber vermutlich nicht an Zielproteine konjugiert werden, da das C-terminale Doppelglyzinmotiv durch ein Doppelyrosinmotiv ersetzt ist. Die linearen Diubiquitin-Analoga Fat10 und ISG15 sind evolutionär jünger und kommen nur bei Säugetieren vor. Atg8 und Atg12 sind deutlich größer als Ubiquitin und weichen in ihrer Sequenz so stark ab, dass ihre Verwandtschaft erst nach der Charakterisierung des Bindungsmechanismus an ihre Substrate deutlich wurde. Ubiquitin-ähnliche Strukturen kommen auch als isolierte Domänen innerhalb größerer Proteine vor (Ubiquitin-Domänen-Proteine, UDPs). Sie werden nicht konjugiert, sondern fungieren möglicherweise als Signal für die Erkennung durch ubiquitinbindende Proteine.

Der biochemische Mechanismus der Konjugation von Ubiquitin und UBLs ist stark konserviert. Der Transfer von Ubiquitin benötigt die Aktivität eines Ubiquitin-aktivierenden (E1), eines Ubiquitin-konjugierenden (E2) und eines Ubiquitin-ligierenden (E3) Enzyms. In einer ATP-abhängigen Reaktion bildet das Ubiquitin einen energiereichen Thioester mit einem Cysteinrest des E1. In einer Transesterifizierung wird Ubiquitin auf einen Cysteinrest im aktiven Zentrum des E2 übertragen. Im letzten, E3-vermittelten Schritt, wird Ubiquitin mit seinem C-terminalen Glyzinrest über eine Isopeptid-Bindung an einen Lysinrest des Substrates gekoppelt (Abb. 1). Jedes UBL besitzt ein spezifisches E1, ein E2 und eine geringe Anzahl von E3 Enzymen. Lediglich

für Ubiquitin sind mehrere E2s bekannt (11 in *S. cerevisiae* und mehr in höheren Organismen), sowie eine große Anzahl verschiedener E3s (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Die Substratspezifität der Konjugation wird vor allem durch die Bildung distinkter E2/E3 Komplexe und die Erkennung spezifischer Bindemotive auf der Substratoberfläche durch die E3 Ligase vermittelt.

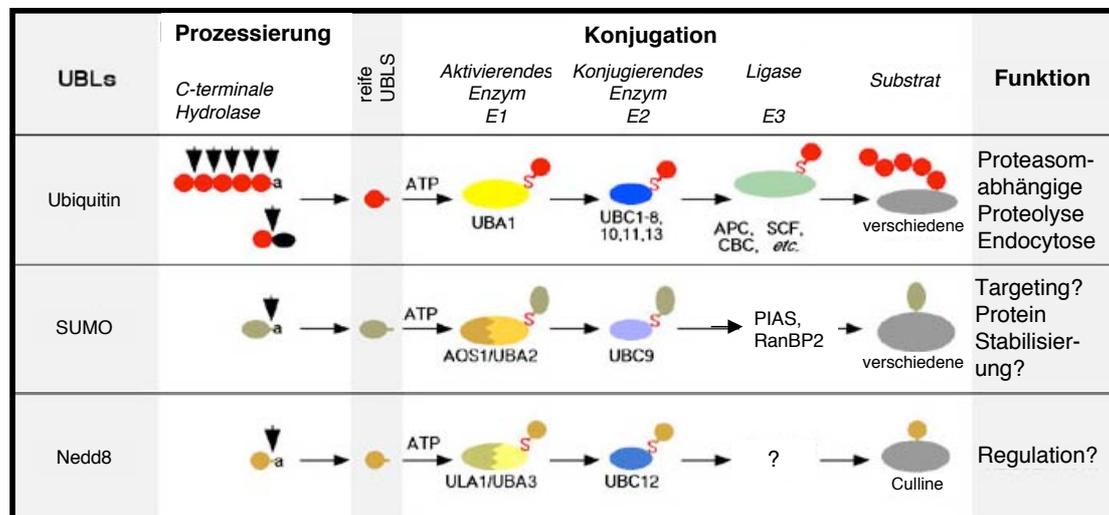


Abb. 1: Prozessierung und Konjugation von Ubiquitin und Ubiquitin-verwandten Proteinen. Die Vorläuferformen von Ubiquitin und UBLs werden am C-Terminus von Hydrolasen prozessiert und über aktivierende (E1), konjugierende (E2) sowie ligierende (E3) Enzyme an Substratproteine geknüpft. Als Beispiel sind hier die Konjugationsmechanismen für Ubiquitin, SUMO und Nedd8 dargestellt.

Die am besten charakterisierte Funktion der Ubiquitylierung ist als Signal für die proteasomale und lysosomale Prozessierung und den Abbau von Substratproteinen. Sie spielt aber auch eine wichtige Rolle in nicht-proteolytischen Prozessen wie DNA-Reparatur, transkriptioneller Regulation oder Endozytose. Gleichermäßen bewirkt auch eine Modifikation durch SUMO nicht den Abbau des Substrates, sondern reguliert seine Lokalisation und Interaktion mit anderen Proteinen. Die Modifikation durch Nedd8 beeinflusst die Aktivität seiner Substrate, der Culline, einer Familie von Ubiquitin-Ligasen. Atg8 und Atg12 spielen eine Rolle in der Makroautophagie. Während Atg12 ein weiteres Protein in diesem Prozess modifiziert, wird Atg8 kovalent an Phosphatidylethanolamin gebunden und kann dadurch selbst an Membranen binden.

Im Falle von Ubiquitin ist die Bildung von polymeren Ketten durch die Ligation eines Ubiquitinmoleküls an einen Lysinrest des zuvor ligierten Ubiquitins möglich. Die Anzahl der konjugierten Ubiquitine und die verwendete Lysinseitenkette bestimmen dabei das weitere Schicksal des Substrats. Monoubiquitylierung und Kettenbildung über Lys63 spielen eine Rolle in nicht-proteolytischen Prozessen, die Verknüpfung über Lys48 und Lys29 führt in der Regel zum irreversiblen Abbau des modifizierten Proteins durch das 26S Proteasom. Eine Ubiquitinkette von mindestens vier Resten wird durch das 26S Proteasom erkannt, welches die Ubiquitinkette abspaltet,

das Substrat in Abhängigkeit von ATP entfaltet und durch die im Inneren angeordneten proteolytischen Untereinheiten zu kleinen Peptiden degradiert. Auch die endoproteolytische Prozessierung von Substraten durch das Proteasom nach der Ubiquitylierung ist bekannt, bei der stabile Proteindomänen nicht degradiert werden (z.B. NF- κ B in Säugetieren und Spt23 in Hefe), sondern in ihre aktive Form überführt werden.

Das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert den selektiven Abbau von Proteinen, die für die Zelle schädlich sein können oder ihre biologische Funktion erfüllt haben. Dazu gehören fehlerhaft gefaltete oder falsch modifizierte Proteine (z.B. mutierte Proteine), Regulatoren des Zellzyklus (Cycline, CDK Inhibitoren), Transkriptionsfaktoren oder ihre Inhibitoren (I κ B, β -catenin) oder Proteine in Signaltransduktionswegen (Rezeptoren von Wachstumsfaktoren). Da es sich um einen irreversiblen Prozess handelt, ist die korrekte Erkennung und Modifizierung von Substraten durch Ubiquitin Ligasen sehr wichtig. Die Fehlregulation des Proteinabbaus ist eine häufige Ursache von Krankheiten. So führt z.B. die Deletion einer einzigen Aminosäure in CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) dazu, dass dieses Protein von Ubiquitin Ligasen im ER erkannt und abgebaut wird (Gelman und Kopito, 2003). Das Fehlen von CFTR führt zur Entstehung von Mukoviszidose, einer unheilbaren Stoffwechselerkrankung, die zu einem frühen Tod führt. Das Protein Parkin ist eine E3 Ligase, deren Inaktivierung durch Nitrosylierung mit der Entstehung von Parkinson in Verbindung gebracht wird (Cookson, 2004).

Die E3 Ligasen werden in drei generelle Klassen eingeteilt: Homologous to E6-AP Carboxy Terminus (HECT), Really Interesting New Gene (RING) und UFD2 homology (U-Box) Proteine, wobei die Klasse der RING E3s mit Abstand die meisten Mitglieder hat. Die Ubiquitin Ligasen der HECT-Familie wie E6-Associated Protein (E6-AP) oder Rsp5 besitzen selbst enzymatische Aktivität. Sie rekrutieren das Ubiquitin-beladene E2 und bilden einen Thioester mit Ubiquitin an einem konservierten Cysteinrest innerhalb der HECT-Domäne, bevor sie das Ubiquitin auf das Substrat übertragen. Ihre Struktur ist flexibel, möglicherweise um aufeinanderfolgende Konjugation mehrerer Ubiquitinreste zu erleichtern.

Die Mitglieder der RING-Familie sind katalytisch inaktiv, d.h. sie gehen keine Thioesterbindung mit Ubiquitin ein. Sie besitzen ein konserviertes Zink-Binde-Motiv mit acht Cystein- und Histidinresten, die zwei Zinkionen koordinieren. Diese RING-Domäne wird dazu benutzt, das E2 Enzym zu rekrutieren und in räumliche Nähe zum Substrat zu bringen, welches ebenfalls an die Ubiquitin Ligase bindet. Ubiquitin wird direkt vom E2 übertragen. Die starre Konformation der RING E3 Ligasen verstärkt dabei die katalytische Aktivität des E2 Enzyms („catalysis by proximity“). RING E3 Ligasen kommen sowohl als Monomer (z.B. c-Cbl), als auch als hetero-oligomere Komplexe vor. Ein gutes Beispiel hierfür sind die SCF(Skp1-Cullin1-F-Box)-verwandten Komplexe.

Die U-Box Proteine bilden eine kleine Gruppe von E3s, deren Struktur stark mit den RING-Proteinen verwandt ist. Die Zink-koordinierenden Seitenketten fehlen bei der U-Box, stattdessen führen große hydrophobe Aminosäurereste zur Stabilisierung einer RING-ähnlichen Struktur. U-Box

Proteine fungieren als „Elongationsfaktor“ (E4) für von anderen E3s vermittelte Reaktionen (Ufd2, CHIP) (Pickart und Eddins, 2004), die Substrate sind also bereits mono-ubiquitylierte Proteine.

2.2. Cullin Ubiquitin Ligasen

Die Cullin E3 Ubiquitin Ligasen bilden eine Familie von heterooligomeren Komplexen, deren modulare Architektur durch ihre Kombinationsmöglichkeiten die spezifische Erkennung einer Vielzahl unterschiedlicher Substrate ermöglicht. Sie regulieren so die Stabilität von Schlüsselproteinen in Zellzyklus (p27, CyclinD/E), Signaltransduktion (Notch1/4, β -catenin), Transkription (HIF1 α /2 α , I κ B α) und anderen zentralen zellulären Prozessen.

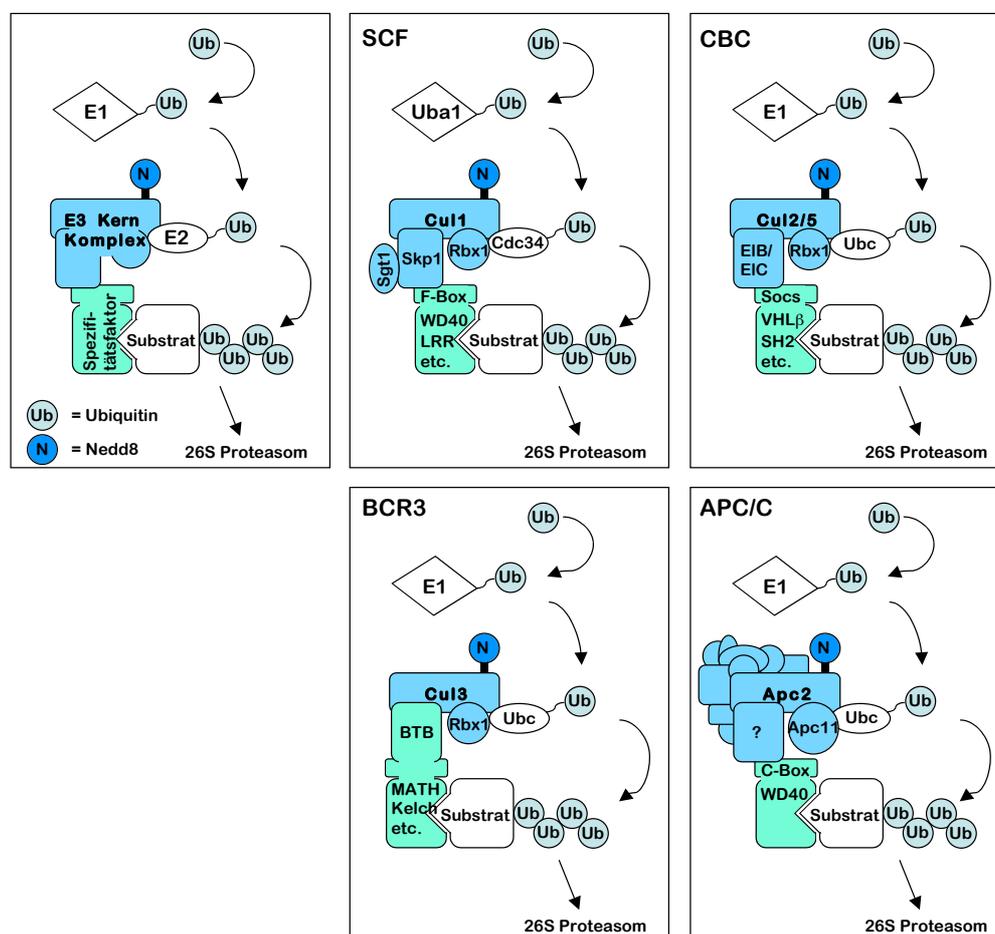


Abb. 2: Organisation der Cullin E3 Ubiquitin Ligasen. Links oben ist der prinzipielle Aufbau der Komplexe dargestellt. Der Kernkomplex besteht aus einem Protein der Cullin-Familie, dem RING-H2-Protein Rbx1 und weiteren strukturellen Untereinheiten, die den Adaptor für die Bindung des Spezifitätsfaktors bilden. Die für die Interaktion mit den Substraten des Komplexes relevanten Domänen sind aufgeführt. Die Culline werden durch Nedd8 (N) modifiziert. Der Kernkomplex rekrutiert das Ubiquitin-beladene E2, während das Substrat durch den Spezifitätsfaktor erkannt und gebunden wird. Nachfolgend sind die am besten charakterisierten Cullin-Komplexe und der verwandte APC/C Komplex dargestellt. SCF, Skp1-Cullin1-F-Box; CBC, Cullin2-Elongin B/C; BCR3, BTB-Cullin3-Rbx1; APC/C, anaphase-promoting complex/ cyclosome (adaptiert nach Willems et al., 2004).

In diesen Komplexen bilden die Proteine der Cullin-Familie und ihre Homologe (mindestens neun in Säugetieren und vier in Hefe) die Plattform sowohl für die Assemblierung von variablen Untereinheiten, die für die spezifische Substraterkennung verantwortlich sind, als auch für die Bindung des RING-H2-Proteins Rbx1. Hierbei handelt es sich um eine Variante des RING-Motivs, in der ein zusätzliches Zinkion durch zwei Histidine koordiniert wird. Das homologe Rbx2 ist zu 51% mit Rbx1 identisch und bildet spezifisch Heterodimere mit Cullin5. Eine weitere Untereinheit des Kernkomplexes bilden die strukturell ähnlichen Proteine der Skp1-, Elongin C- oder BTB-Domänen-Familie. Sie interagieren mit spezifischen Cullinen und rekrutieren ihrerseits substraterkennende Faktoren mit unterschiedlichen Protein-Protein-Interaktionsmotiven. Abbildung 2 verdeutlicht den grundlegenden strukturellen Aufbau der Cullin-Komplexe. Im Falle des SCF Komplexes mit Cullin1 gibt es verschiedene substratbindende Proteine der F-Box Familie (allein 21 in *S.cerevisiae*), Cullin2-Komplexe werden mit VHL, MUF1, LRR1 oder FEM1B gebildet, wobei bisher nur Substrate für VHL identifiziert wurden (Kamura et al., 2004). Die Cullin3-enthaltenden Komplexe vereinen Kernadaptor und Substratbindung in einem Protein der BTB-Domänen-Familie. Cullin5 bindet ebenso wie Cullin2 an Elongin B/C, die substraterkennende Untereinheit ist hier allerdings ein SOCS-Box Protein. Außerdem scheint Cullin5 Rbx2 gegenüber Rbx1 als RING Protein zu bevorzugen (Kamura et al., 2004).

Aufgrund von Datenbankanalysen wird die Anzahl der unterschiedlichen Spezifitätsfaktoren im Menschen auf ca. 100 F-Box-Proteine, 50 SOCS/BC-Box-Proteine und über 400 Mitglieder der BTB-Familie geschätzt (Petroski und Deshaies, 2005). Zusätzlich zu dem verwendeten Spezifitätsfaktor wird die Substraterkennung durch post-translationale Modifikationen der Substrate beeinflusst. Bei der Substraterkennung durch F-Box Proteine spielen Phosphorylierung oder Glykosylierungsstatus eine Rolle; für die Erkennung durch VHL ist die Oxidation eines Prolinrestes innerhalb eines bestimmten Erkennungsmotives von Bedeutung.

Cullin und Cullin-verwandte	Spezifitätsfaktor / Komponente des Kernkomplexes	Namen der Komplexe
CUL1	F-Box Protein / SKP1	SCF, CDL1
CUL2	VHL-Box Protein / ElonginBC	VCB, CBC, ECS, SCF2, CDL2
CUL3	BTB-Domänen Protein	BCR3, SCF3, CDL3
CUL4A	Rezeptor / DDB1	VDC, DCX, SCF4, CDL4
CUL4B	?	noch nicht charakterisiert
CUL5	SOCS-Box Protein / ElonginBC	SCF5, CDL5
CUL7	FBX29 / SKP1	SCF7, CDL7
APC2	verschiedene	APC/C
PARC	direkte Bindung an p53	-

Tabelle 1: Cullin-Ubiquitin-Ligasen und verwandte Komplexe. Noch nicht alle Komplexe sind in ihrer Struktur analysiert. Die in der Literatur verwendeten Namen der einzelnen Komplexe sind angegeben.

Der APC/C Komplex ist ein entfernter Verwandter der SCF Ligasen, mit einer Cullin-ähnlichen Untereinheit Apc2 und einer RING-Untereinheit Apc11, jedoch keinem Skp1/Elongin C-Homolog. Die Regulation des APC/C erfolgt primär über die Zusammensetzung seiner elf verschiedenen Untereinheiten und die Bindung regulatorischer Faktoren. Einen Überblick über die verschiedenen Cullin Ubiquitin Ligasen und die verwendete Nomenklatur gibt Tabelle 1.

Die meisten Culline können an einem konservierten Lysinrest am C-Terminus durch das Ubiquitin-verwandte Protein Nedd8 kovalent modifiziert werden. Die Deletion von Nedd8 führt zu embryonaler Lethalität bei Säugetieren, Entwicklungsstörungen in Nematoden und Lethalität in *S. pombe*; in *S. cerevisiae* hingegen ist das Homologe Rub1 nicht essentiell. Die Modifikation erleichtert die E2 Rekrutierung, erhöht die Ubiquitylierungsaktivität und stabilisiert den Komplex. Die Konjugation von Nedd8 an Culline ist reversibel und wird durch den inhibitorischen Faktor CAND1 beeinflusst. CAND1 interagiert mit nicht-neddylierten Cullinen und schirmt diese von der Nedd8-Konjugationsmaschinerie ab. Im Falle von Cul1 kommt es dadurch zu einer Dissoziation von Skp1. Eine mögliche Rolle von CAND1 könnte darin liegen, Komponenten des E3-Ligase-Komplexes vor Auto-Ubiquitylierung zu schützen, indem sie von den Cullinen dissoziiert werden, solange kein Substrat zur Verfügung steht. Nur Culline, die nicht an CAND1 binden, können einen aktiven E3 Komplex bilden und durch Nedd8 modifiziert werden. Welche zellulären Signale den Neddylierungszustand der Culline beeinflussen ist noch nicht geklärt (Willems et al., 2004).

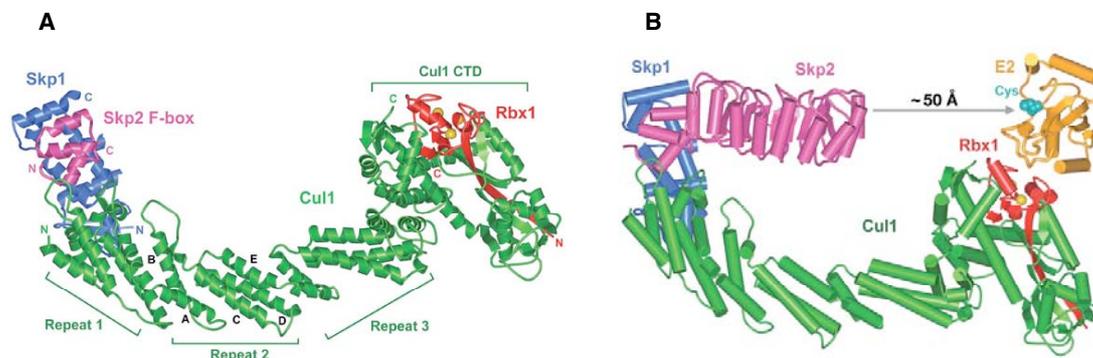


Abb. 3: Struktur des SCF^{Skp2}-Komplexes (Zheng et al., 2002). **A** Cul1 (grün) befindet sich in einer langgestreckten Konformation. Die Buchstaben A bis E bezeichnen die Helices des mittleren der drei Cullin Repeats. Am N-Terminus befinden sich Skp1 (blau) und das F-box Protein Skp2 (magenta). Die C-terminale Domäne von Cul1 bindet an Rbx1 (rot). Die von Rbx1 koordinierten Zn²⁺-Ionen sind gelb dargestellt. **B** Modell der reaktiven Konformation. Das E2 (gelb) bindet in ca. 50 Å Entfernung vom Substrat Skp2 an Rbx1.

Strukturelle Informationen über die Culline lassen sich aus der Kristallstruktur von SCF^{Skp2} gewinnen (Zheng et al., 2002), die vermutlich charakteristisch für alle Cullin-Ligasen ist. Cul1 besitzt eine gebogene, langgezogene Struktur mit einem N-terminalen Stiel aus drei sich wiederholenden Fünf-Helix-Bündeln (Cullin Repeat, CR) und einer globulären

C-terminalen Domäne. Skp1 bindet an CR1, während Rbx in 100Å Entfernung an die globuläre Domäne bindet (Abb. 3A). Die starre Konformation des N-Terminus bringt E2 und Substrat in die richtige Position für den Ubiquitin-Transfer (Abb. 3B). Die Insertion eines flexiblen Linkers in den Stiel zerstört die E3 Aktivität *in vitro*.

2.3. Der von Hippel-Lindau-Tumorsuppressor

Die substraterkennende Untereinheit des CBC Komplexes ist das BC-Box-Protein VHL. VHL steht für von Hippel-Lindau-Syndrom, eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch Mutationen im VHL Tumorsuppressorgen verursacht wird. In der familiären VHL-Krankheit erbt der Betroffene ein mutiertes VHL-Allel von einem Elternteil. Eine zusätzlich erworbene somatische Mutation führt zur Entstehung multipler gut- und bösartiger Tumore und Zysten in unterschiedlichen Geweben, vor allem Hämangioblastome im Zentralnervensystem und der Retina, Klarzellkarzinome der Niere und Phäochromozytome der Nebennierenrinde. Entsprechend des klinischen Phänotyps wird die VHL-Krankheit in verschiedene Untergruppen eingeteilt (Tabelle 2). Der Krankheitstyp 2 unterscheidet sich vom Typ 1 durch das zusätzliche Auftreten von Phäochromozytomen und wird in drei unterschiedliche Subtypen unterteilt. Das Krankheitsbild bei Typ 2A Patienten umfasst Hämangioblastome und Phäochromozytome, beim Typ 2B treten zusätzlich noch Klarzellkarzinome auf. Patienten mit einer Typ 2C Erkrankung entwickeln ausschließlich Phäochromozytome. Zusätzlich zur Keimbahn-Inaktivierung ist die somatische Inaktivierung beider VHL-Allele die häufigste Ursache für spontan auftretende Klarzellkarzinome der Niere. VHL ist damit ein klassisches Beispiel für Knudsons „Two-Hit“ Modell.

Klasse	Beobachteter Tumortyp		
	Hämangioblastome	Klarzellkarzinome	Phäochromozytome
Typ 1	+	+	-
Typ 2A	+	-	+
Typ 2B	+	+	+
Typ 2C	-	-	+

Tabelle 2: Klinische Einteilung der VHL Krankheit. „+“ bezeichnet ein hohes Risiko für das Auftreten der angegebene Tumore, „-“ bezeichnet kein oder geringes Risiko.

Von Hippel-Lindau tritt in etwa einem von 35.000 Individuen auf und führt bei mehr als 90% der Betroffenen zur Entwicklung von Tumoren bis zum 65. Lebensjahr. Meist zeigen sich die ersten Symptome jedoch schon zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr. Die bösartigen Klarzellkarzinome bilden die häufigste Todesursache bei VHL-Patienten, während die gutartigen Hämangioblastome durch ihre Lokalisation im Zentralnervensystem schwere

Symptome wie Koordinationsschwierigkeiten, Lähmungen oder Erblindung verursachen.

Die homozygote Deletion von VHL in Mäusen führt zu embryonaler Lethalität zwischen den Embryonalstadien E10.5 und E12.5 aufgrund von Fehlentwicklungen des Blutgefäßsystems der Plazenta und von Blutungen in Plazenta und Embryo (Gnarra et al., 1997). Heterozygote Mäuse entwickeln sich normal und zeigen kein erhöhtes Risiko der Tumorbildung. VHL-negative Zelllinien aus menschlichem Tumorgewebe besitzen die Fähigkeit zur Tumorbildung nach Transplantation in Mäuse, die durch die stabile Transfektion von VHL unterdrückt wird (Iliopoulos et al., 1995).

Das VHL-Protein existiert in zwei Isoformen. Die lange Isoform (pVHL₃₀) umfasst 213 Aminosäuren und hat in der SDS-Page ein Laufverhalten entsprechend einer scheinbaren Masse von 30 kDa. Der N-Terminus ist vermutlich unstrukturiert und enthält eine je nach Spezies unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen eines GxEx-Motives. Der C-Terminus umfasst eine größere β -Domäne, bestehend aus sieben β -Faltblättern (aa63-154) und einer α -Helix (aa193-204), und eine kürzere α -Domäne (aa155-192) aus drei Helices, die durch kurze Linker miteinander verbunden sind. Die α -Domäne ist primär für die Bindung an Elongin C verantwortlich, während die Substratbindestelle in der β -Domäne liegt. Die kurze Form (pVHL₁₉) entsteht durch die Verwendung eines alternativen Translationsinitiationsstarts bei Met54. Beide Isoformen bilden funktionelle CBC Komplexe. Eine exklusive Rolle für die lange Isoform von VHL ist bisher nicht bekannt, allerdings spielt die Phosphorylierung des N-Terminus von pVHL₃₀ vermutlich eine Rolle in nicht degradativen Funktionen von VHL (siehe unten).

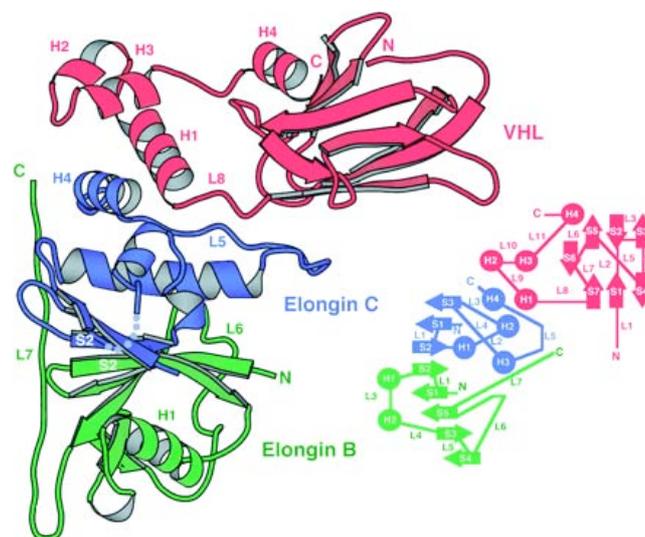


Abb. 4: Struktur des VHL-Elongin C-Elongin B-Komplexes (Stebbins et al., 1999). Links ist die Tertiärstruktur des ternären Komplexes aus pVHL₁₉, Elongin B und Elongin C(17-112) dargestellt. Die Helix H1 und L8 bilden die Hauptbindungsstelle für Elongin C in der α -Domäne von VHL. In diesem Modell bildet Elongin B keinen direkten Kontakt zu VHL aus. Rechts eine schematische Darstellung der einzelnen Sekundärstrukturelemente des Komplexes. VHL rot; Elongin C blau; Elongin B grün.

Etwa die Hälfte aller bekannten VHL-Mutationen betrifft einzelne Aminosäuren, deren Seitenketten die Bindung zu Elongin C vermitteln und damit entscheidend für die Bildung eines funktionalen E3 Komplexes sind. Eine weitere Region, in der viele Punktmutationen beobachtet werden, befindet sich in der β -Domäne und ist verantwortlich für die Bindung von Substraten (Abb. 5). Diese Punktmutationen führen in der Regel zu einer Typ 2 Erkrankung, während ein Typ 1 Phänotyp auf den vollständigen Verlust aller VHL-Funktionen durch Deletionen, strukturzerstörende Mutationen oder Inaktivierung der VHL-Transkription durch Promotorhypermethylierung zurückzuführen ist.

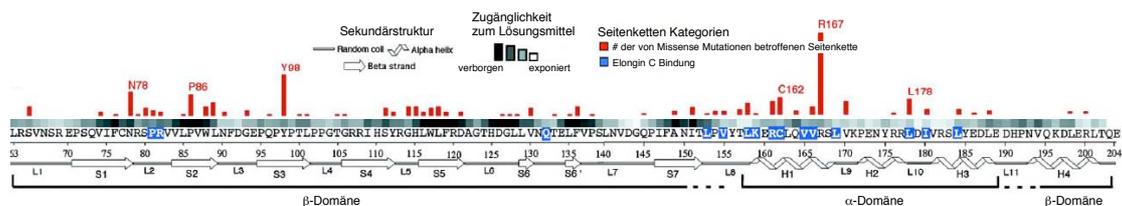


Abb. 5: „Hotspots“ der VHL-Mutationen. Rote Balken zeigen häufig bei VHL-Erkrankungen beobachtete Aminosäureaustausche an. Mutationen in der α -Domäne verhindern die Bildung des E3-Komplexes (z.B. C162S, R167W), Mutationen in der β -Domäne verringern die Fähigkeit zur Substratbindung (z.B. Y98H, Y112H). In Verbindung mit der VHL-Erkrankung sind nur in Einzelfällen Mutationen in den ersten 54 Aminosäuren (pVHL₃₀) bekannt.

VHL wird während der gesamten Entwicklung und in allen Zelltypen exprimiert und lokalisiert diffus im Zytosol oder in einem diskreteren, punktförmigen Muster im Zellkern. Unterschiede in der Zelldichte (Lee et al., 1996) oder dem extrazellulärem pH (Mekhail et al., 2004) haben einen Einfluss auf die Expression und die Lokalisation von VHL. Die lange und die kurze Isoform haben möglicherweise eine Präferenz für Zytosol bzw. Zellkern (Hergovich et al., 2003); jedoch scheinen die Erkennung und der Abbau von HIF1/2 α durch pVHL₁₉ im Zytosol zu erfolgen. Das zytosolische Chaperonin TRiC ist *in vivo* für die korrekte Faltung von VHL und seine Inkorporation in den VCB-Subkomplex verantwortlich. Mutationen, welche die Bindung an TRiC inhibieren, destabilisieren VHL; Mutanten in der Elongin C-Bindestelle bleiben an TRiC gebunden und bilden keinen Ligase Komplex.

2.4. HIF und die Regulation durch Sauerstoff

Die am besten charakterisierte Funktion von VHL (als Teil des CBC^{VHL} E3 Komplexes) ist die sauerstoffabhängige Erkennung des Transkriptionsfaktors HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor) und dessen Degradation. HIF1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, bestehend aus der nukleären, stabilen Untereinheit HIF1 β (ARNT) und einer zytosolischen Untereinheit HIF1 α , deren Stabilität durch die Sauerstoffkonzentration in der Zelle reguliert wird. HIF1 α gehört zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-PAS (eine

konservierte Region in Per, Arnt und Sim) Transkriptionsfaktoren und besitzt zwei Transaktivierungsdomänen, die N-terminale (NAD) von aa481 bis 603 und die C-terminale Transaktivierungsdomäne (CAD) von aa776 bis 826, die für die volle HIF-Aktivität synergistisch wirken müssen (Mazure et al., 2004).

HIF aktiviert vor allem Gene, die eine wichtige Rolle in der Nährstoffversorgung und Vaskularisierung von Geweben spielen, wie z.B. Erythropoietin (Epo), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) und Glucose-Transporter-1 (GLUT1), durch die Bindung an spezifische Promotorsequenzen, den sogenannten HIF-Responsive Elements (HREs) (vgl. Abb. 7).

Die Aktivität von HIF1 α wird durch verschiedene post-translationale Modifizierungen wie Phosphorylierung und Acetylierung reguliert. Eine Schlüsselrolle spielt die sauerstoffabhängige Oxidation von bestimmten Aminosäureseitenketten durch verschiedene Hydroxylasen, die sowohl die Aktivität als auch die Stabilität von HIF1 α beeinflussen. Die Modifikation von zwei Prolinresten zu Hydroxyprolin bewirkt eine rasche, VHL-abhängige Degradation von HIF1 α durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Unter normalen Sauerstoffbedingungen ist HIF1 α sehr instabil und besitzt eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten. Bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) wird HIF1 α stabilisiert und in den Zellkern importiert, wo es durch Dimerisierung mit HIF1 β den aktiven Transkriptionsfaktor bildet.

Die Destabilisierung wird durch zwei Regionen im Protein vermittelt, den sauerstoffabhängigen Degradations-Domänen (oxxygen-dependent degradation domain, ODDD), die zentral im Protein angeordnet sind und von denen die hintere Domäne mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne überlappt. Die ODDDs enthalten ein konserviertes LxxLAP-Motiv, dessen Prolinseitenketten, Pro402 und Pro564, durch die Aktivität von Enzymen der Familie der Prolylhydroxylasen (PHDs) in C4-Position zu Hydroxyprolin oxidiert werden können. Diese modifizierten Prolinseitenketten sind das Erkennungssignal für VHL, welches durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoff des Hydroxyprolins und Ser111 und His115 in VHL eine hochaffine Bindung zu HIF1 α eingeht und dieses als Substrat an den CBC^{VHL} Komplex rekrutiert. Durch die Bindung von VHL an TBP-1 (Tat-binding protein-1), ein Protein der 19S regulatorischen Untereinheit des Proteasoms, wird die Substraterkennung möglicherweise eng an den Abbau gekoppelt (Corn et al., 2003).

Die PHDs, von denen im Menschen bisher drei Isoformen identifiziert wurden, gehören zur Klasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. In der von ihnen katalysierten Reaktion wird molekularer Sauerstoff von einem Fe²⁺-Ion im aktiven Zentrum gespalten und ein Sauerstoffatom auf den Prolinrest von HIF1 α übertragen, während das andere Sauerstoffatom durch die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat zu Succinat und Kohlendioxid umgewandelt wird. Dadurch unterscheiden sie sich von Oxygenasen der Häm-Familie, bei denen durch die unterschiedliche Reaktionsgeometrie nur ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen wird. Die geringe Affinität der PHDs für Sauerstoff machen diese zu einem effektiven Sauerstoffsensor. In Geweben mit normaler Sauerstoffsättigung

(Normoxie) wird HIF1 α effizient modifiziert und anschließend von VHL erkannt. Bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) wird HIF1 α nicht oxidiert, da das Substrat (molekularer Sauerstoff) fehlt, wodurch die Bindung an VHL und die nachfolgende Ubiquitylierung verhindert wird.

Eine weitere sauerstoffabhängige Regulation der HIF-Aktivität erfolgt durch die Bindung des transkriptionellen Ko-Aktivators p300/CBP. Durch die Oxidation von Asn803 in der Bindestelle von HIF1 α durch eine weitere 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase, Factor Inhibiting HIF (FIH), wird die Bindung des Ko-Aktivators verhindert (Lando et al., 2002). Diese Repression der transkriptionellen Aktivität von HIF spielt möglicherweise eine Rolle in der Reoxygenierung von Gewebe, da die enzymatische Aktivität von FIH über einen weiten Konzentrationsbereich an Sauerstoff stabil ist. FIH kann die Inhibition von HIF bei mittlerem Sauerstoffgehalt gewährleisten, wenn die PHDs inaktiviert sind und VHL durch die mit längerer Hypoxie einhergehende Übersäuerung im Nukleolus abgesondert ist, ein effektiver Abbau durch Ubiquitylierung also nicht möglich ist. So wird die Aktivität von HIF möglicherweise auf kurze Phasen akuten Sauerstoffmangels beschränkt.

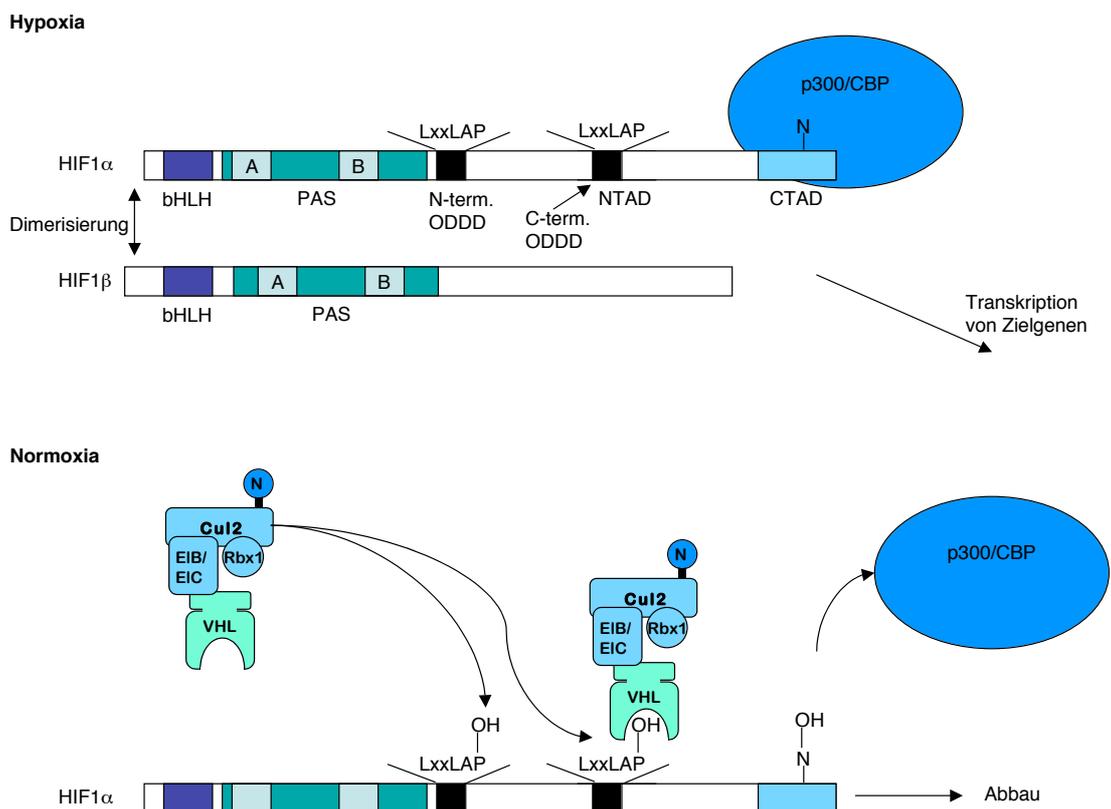


Abb. 6: Sauerstoffregulation von HIF1 α . In Abwesenheit von Sauerstoff dimerisiert HIF1 α über seinen N-Terminus mit dem stabilen HIF1 β . Der unmodifizierte C-Terminus rekrutiert den transkriptionellen Koaktivator p300/CBP, die Transkription findet statt. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1 α an zwei Prolinseitenketten oxidiert, was zur Erkennung durch den CBC^{VHL} Komplex und rasche Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System führt. Zusätzlich verhindert die Oxidation eines Asparaginrestes am C-Terminus die Bindung von p300/CBP und reprimiert so zusätzlich die Transkription.

Neben HIF1 α existieren noch zwei weitere Homologe der sauerstoffabhängigen Untereinheit, HIF2 α und HIF3 α . Die Domänenstruktur von HIF2 α ist mit der von HIF1 α vergleichbar und die Regulation erfolgt durch die gleichen Mechanismen. Im Falle von HIF3 α gibt es nur eine ODDD-ähnliche Domäne, die ebenfalls den proteolytischen Abbau vermittelt. Zusätzlich erfolgt eine Regulation durch alternatives Splicen der HIF3 α mRNA. Dabei entsteht unter anderem ein verkürztes Protein, IPAS (inhibitory PAS protein), welches mit HIF1 α inaktive Heterodimere bildet und so eine dominant negative Rolle in der HIF-Transkription ausübt (Makino et al., 2002).

Der Mechanismus der sauerstoffabhängigen Degradation von HIF1 α ist in höheren mehrzelligen Organismen konserviert. Homologe von VHL, HIF1 α und PHDs wurden in *C. elegans* und *D. melanogaster* identifiziert. Dort regulieren sie durch die sauerstoffabhängige Degradation von HIF1 α Prozesse wie die Stress- und Wärmetoleranz (Shen et al., 2005) bzw. die Larvaentwicklung (Lavista-Llanos et al., 2002).

Im Menschen spielt HIF eine Schlüsselrolle in der malignen Progression von Tumoren. Durch das rasche Zellwachstum in Tumorgeweben kommt es bereits nach kurzer Zeit zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen im Tumor, da die Distanz einzelner Zellen zum nächsten Blutgefäß zu groß wird oder das vom Tumor zur Selbstversorgung gebildete Gefäßsystem durch häufige Fehlbildungen nicht ausreicht. Der Tumor begegnet dieser Unterversorgung mit einer Reihe zellulärer und systemischer Veränderungen z.B. dem Wechsel des Zellmetabolismus zu anaerober Oxidation oder Anregung der Blutgefäßneubildung. Entscheidende Faktoren, deren Expression in vielen Tumorzellen hochreguliert ist, sind dabei vor allem Enzyme der Glykolyse und Glukosetransporter (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, GLUT1), anti-apoptotische Proteine, Faktoren für die Invasion sowie Wachstumsfaktoren (VEGF, TGF, PDGF-B). Ihre Expression wird durch HIF positiv reguliert, weshalb dieser Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle für das Wachstum von Tumoren spielt (Abb. 7).

Obwohl HIF1 α für die Expression der meisten Gene verantwortlich ist, die in Entartungen der VHL-Krankheit fehlreguliert sind, führt die konstitutive Expression von HIF1 α nicht zur Tumorentstehung. (Maranchie et al., 2002). Im Widerspruch zu der Rolle von VHL als ein negativer Regulator von HIF1 α beobachtet man in VHL^{-/-}-Plazenten eine stark reduzierte VEGF-Konzentration (Gnarra et al., 1997). In konditionalen VHL knock-outs oder HIF1 α -Überexpressionsmodellen kommt es zur Entstehung von Hämangioblastom-ähnlichen Blutgefäßveränderungen, nicht jedoch zur Bildung von Tumoren (Elson et al., 2001). Zwischen einzelnen Mauslinien werden große phänotypische Unterschiede beobachtet (Haase, 2005).

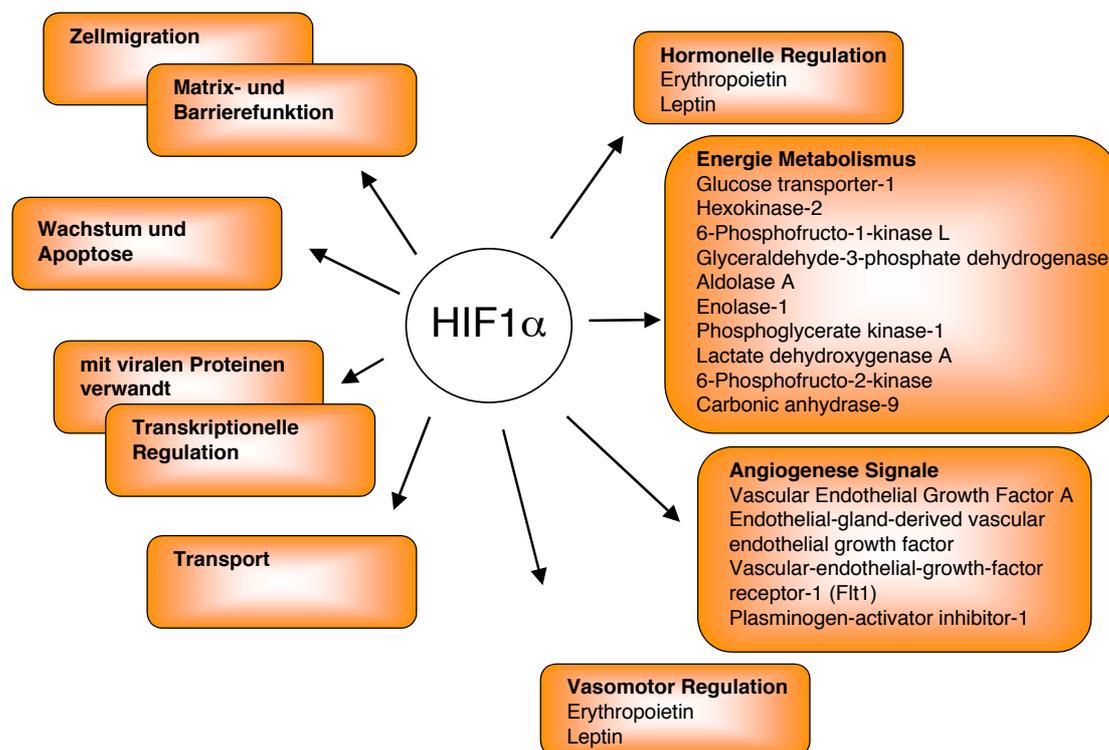


Abb. 7: Transkriptionelle Ziele von HIF1 α . Für die Tumorentstehung sind vor allem die Regulation von Angiogenese und Glukosemetabolismus von Bedeutung (adaptiert nach Schofield und Ratcliffe, 2004).

Die Inaktivierung des Dimerisierungspartners HIF1 β und damit die Repression von sowohl HIF1 α - als auch HIF2 α -Funktion in einem VHL-defizienten Mausmodell ist ausreichend zur Unterdrückung der Tumorentstehung, was eine wichtige Rolle für HIF2 α vermuten lässt, dessen Zielgene noch weitgehend unbekannt sind und nur teilweise mit denen von HIF1 α überlappen (Rankin et al., 2005). Interessanterweise zeigen HIF1 α , HIF2 α und HIF1 β während der embryonalen Entwicklung ein distinktes Expressionsprofil, in dem HIF2 α ein starkes Vorkommen in Blutgefäßen aufweist, was möglicherweise den Phänotyp der vaskulären Fehlbildung bei VHL^{-/-}-Mäusen erklärt (Jain et al., 1998). In Chondrozyten, Thymozyten und aus Stammzellen abgeleiteten Teratokarzinomzellen führt die Deletion von VHL zu einer verringerten Zellproliferation, vermutlich da in diesen Zelltypen kein oder nur geringe Mengen an HIF2 α exprimiert werden (Haase, 2005) und die Überexpression von HIF1 α alleine auch pro-apoptotische Faktoren aktiviert. Um die genauen Mechanismen der Tumorentstehung bei der VHL-Krankheit zu verstehen, werden von mehreren Arbeitsgruppen Studien mit Kombinationen von verschiedenen Deletionen in knock-out Mäusen durchgeführt.

2.5. Weitere Funktionen von VHL

Die bekannten Daten über VHL reichen nicht aus, um die beobachteten Phänotypen in der VHL-Erkrankung auf molekular- und zellbiologischer Ebene zu erklären. Unter den zehn am häufigsten mutierten Aminosäuren haben lediglich sieben eine offensichtliche Auswirkung auf die HIF-Degradation, entweder durch den Verlust der Elongin C Bindung oder den Austausch von für die Koordination der HIF-Bindetasche relevanten Seitenketten. Diese Mutationen führen je nach Substitution zu einer Erkrankung des Typs 2A oder 2B, die sich durch die Prädisposition für Hämangioblastome, Phäochromozytome und ein niedriges bzw. hohes Risiko für die Entwicklung von Klarzellkarzinomen auszeichnet. Allerdings führen auch Mutationen des Typs 1, die sich mit Deletionen oder strukturellen Defekten von VHL korrelieren lässt, zwangsläufig zu einem Defekt in der HIF-Degradation. Hier lässt sich ein klinischer Phänotyp ohne die Entwicklung von Phäochromozytomen beobachten. Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlichen HIF-Stabilisierung liegen, da Mutanten des Typs 2A und 2B noch eine Restaktivität in der Ubiquitylierung besitzen. Unterschiedliche Konzentrationen von HIF bewirken vermutlich eine differentielle transkriptionelle Aktivierung von HIF-Zielgenen. Beim Typ 2C entwickeln die Betroffenen ausschließlich Phäochromozytome und besitzen eine funktionierende HIF-Regulation. Da Phäochromozytome bei vollständigem Verlust von VHL (Typ 1 Erkrankung) nicht auftreten, wird ihre Entstehung möglicherweise durch eine durch die Mutation neu entstandene oder verstärkte VHL-Aktivität („gain-of-function“-Mutation) bedingt. Da sowohl HIF als auch VHL in den meisten Geweben exprimiert werden, ist der Mechanismus der sauerstoffabhängigen Degradation vermutlich überall konserviert. Dennoch treten bei der VHL-Krankheit Entartungen nur in sehr wenigen Organen auf. Diese Beobachtungen legen die Existenz weiterer Funktionen von VHL neben der Regulation von HIF nahe.

Bisher konnte kein überzeugender Beweis für die Existenz weiterer VHL-Substrate erbracht werden. Mehrere Arbeitsgruppen versuchten, in einem „Two-Hybrid“-Screen mit VHL weitere Kandidaten für die VHL-abhängige Ubiquitylierung zu identifizieren. Dabei wurde eine Untereinheit der RNA-Polymerase II, hsRPB7, und zwei neue deubiquitinierende Enzyme, VDU1 und 2 (VHL-interacting deubiquitinating enzyme) als mögliche Substrate identifiziert (Li et al., 2002; Na et al., 2003). Ein Problem dieses experimentellen Ansatzes ist sicherlich die Instabilität und fehlende Assemblierung von isoliertem VHL, die eine physiologische Konformation bei Expression in Hefe unwahrscheinlich macht. Zwar wurde für hsRPB7 *in vitro* und unter Überexpressionsbedingungen eine schwache Ubiquitylierung gezeigt (Na et al., 2003), jedoch ist die Auswirkung von VHL auf die Stabilität in Tumorzelllinien gering. Die Bindung von hsRPB7 wurde außerdem mit einer in 786-O Zellen vorkommenden verkürzten VHL-Version gezeigt, die *in vivo* instabil ist und rasch abgebaut wird. Für VDU wurden keine physiologischen Bedingungen untersucht.

Die Publikation des Erkennungsmotives LxxLAP für VHL auf HIF1 α ermöglichte die Datenbanksuche nach ähnlichen Sequenzen (Kuznetsova et

al., 2003). Ein Protein mit diesem Motiv ist die große Untereinheit der RNA-Polymerase II, hsRPB1. Die Bindung der hyperphosphorylierten Form von hsRPB1 an VHL kann durch UV-Bestrahlung induziert werden, was auf eine mögliche Rolle von VHL in UV-induzierter Apoptose hindeutet. Allerdings scheint das Fehlen von VHL nicht zu einer Akkumulation der hyperphosphorylierten Form zu führen, obwohl hsRPB1 ubiquityliert wird. Die Schwierigkeit bei diesem Ansatz wird bei genauerer Betrachtung der Struktur der HIF1 α -Bindestelle deutlich: Bei der Bindung an VHL befindet sich das Erkennungsmotiv auf HIF1 α in einer langgestreckten Konformation, in der die Interaktion hauptsächlich von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoffatom der Hydroxyprolinseitenkette und zwei Aminosäureresten des VHL bestimmt wird (Hon et al., 2002; Min et al., 2002). Man kann sich deshalb vorstellen, dass unterschiedliche Peptide an VHL binden können, wenn diese modifiziert und entfaltet sind. *In vivo* wird die Spezifität der Bindung möglicherweise durch weitere Bindestellen, aber auch durch die Substratspezifität der Prolylhydroxylasen bestimmt. Für die drei bekannten modifizierenden Enzyme konnte in einer Studie mit unterschiedlichen Peptiden mit Variationen im LxxLAP-Motiv gezeigt werden, dass lediglich das Alanin in -1 Position und eine Folge saurer Aminosäuren c-terminal von Prolin wichtig für die Modifizierung sind (Li et al., 2004). Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Voraussage von möglichen VHL-Substraten anhand des Erkennungsmotivs nicht eindeutig möglich ist.

Seit einiger Zeit wird eine wachsende Zahl von VHL-Interaktoren beschrieben, deren Stabilität nicht durch VHL-vermittelten proteasomalen Abbau reguliert wird. Die Bindung von VHL an Mikrotubuli spielt eine Rolle in der Regulation von Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli (Hergovich et al., 2003; Lolkema et al., 2004). Die Depolymerisationsgeschwindigkeit der Mikrotubuli nach Zugabe von Nocodazol wird durch VHL *in vitro* und *in vivo* beeinflusst. Während VHL-Mutationen des Krankheitstyps 2B und Wildtyp VHL Mikrotubuli nach Nocodazol-Zugabe stabilisieren, scheinen Mutationen des Typs 2A einen destabilisierenden Einfluss zu haben. Die Bindung von VHL an Mikrotubuli erfolgt ohne Rekrutierung von Cul2 und Rbx1, möglicherweise jedoch als Teil des VHL-Elongin B/C-Subkomplexes. Die Grundlage dieser VHL Funktion ist unbekannt.

In Immunpräzipitationsexperimenten mit HA-VHL aus einer VHL-negativen Zelllinie wurde gezeigt, dass VHL an Fibronectin bindet und für die korrekte Ausbildung der extrazellulären Matrix wichtig ist (Ohh et al., 1998). Diese Interaktion ist anscheinend von der Neddylierung von VHL an Lys159 abhängig (Stickle et al., 2004) und führt nicht zu einem Abbau von Fibronectin. Die Beobachtung, dass keine der tumorrelevanten VHL-Mutanten mit Fibronectin interagiert, korreliert mit der Tatsache, dass alle Subtypen der VHL-Krankheit Defekte in der extrazellulären Matrix der betroffenen Zellen aufweisen. Die Affinität von pVHL₃₀ zu Fibronectin wird durch die Phosphorylierung von drei Serinresten in den GxEEEx-Repeats durch Casein Kinase 2 (CK2) reduziert. Mutationen in diesen Phosphorylierungsstellen führen umgekehrt zu einer starken Bindung und einer intrazellulären Akkumulation von Fibronectin (Lolkema et al., 2005). In der Zelle ist möglicherweise die genaue Regulation der Affinität von VHL für Fibronectin

durch verschiedene post-translationale Modifikationen für die korrekte Ausbildung der extrazellulären Matrix wichtig. Der Mechanismus, mit dem VHL die Assemblierung von Fibronectin reguliert, ist jedoch unbekannt. Auch interagiert normalerweise nur eine geringe Subpopulation an VHL mit Fibronectin, vermutlich in vesikulären Kompartimenten. Vielleicht spielt VHL dort eine Rolle im Abbau von missgefalteten Fibronectinmolekülen im Zusammenhang mit ER-assoziiierter Degradation (ERAD).

Einige Berichte sehen VHL im Zusammenhang mit der Repression von HIF1 α -abhängiger und -unabhängiger Transkription. Das KRAB-A Domänen Protein VHL α K (pVHL-associated KRAB-A) bildet mit VHL und KAP1/TIF- β einen heterooligomeren Komplex, der die Transkription von HIF1 α unabhängig von proteasomaler Degradation reguliert (Li et al., 2003). Die Bindung von VHL an den transkriptionellen Co-Aktivator Sp1 inhibiert die Transkription von VEGF in verschiedenen Zelllinien (Mukhopadhyay et al., 1997). Die entsprechende Studie wurde unter normoxischen Bedingungen durchgeführt, unter denen die Repression von VEGF vermutlich hauptsächlich auf das Fehlen von HIF1 α zurückzuführen ist. Die Überexpression von Sp1 führt zur Expression von VEGF unter normoxischen Bedingungen. Deshalb stellt die Inhibition durch VHL möglicherweise einen Mechanismus dar, die Transkription von HIF-regulierten Genen durch Faktoren zu verhindern, die ähnliche Promotorregionen erkennen.

Eine zelluläre Subpopulation der atypischen Protein Kinasen C (aPKC) δ , λ , und ζ interagiert nach Aktivierung durch Phorbolester oder Serum-Entzug mit VHL und wird dadurch an der Translokation zur Membran gehindert (Okuda et al., 1999; Pal et al., 1997). Ob diese Inhibition der PKC-Aktivität auch die Degradation durch den CBC^{VHL} Komplex beinhaltet, ist noch offen. Atypische PKCs spielen eine Rolle in der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellpolarität und könnten zusammen mit VHL eine Funktion in der Kontaktinhibition und Einschränkung der Zellbeweglichkeit ausüben.

Die Interaktionen mit FIH-1 und TBP-1 haben einen Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von HIF1 α und sind im Zusammenhang mit der Rolle von VHL als E3 Ligase zu sehen (Corn et al., 2003; Mahon et al., 2001).

2.6. Zielsetzung der Arbeit

Die sauerstoffabhängige Modifikation und Degradation von HIF1 α stellt einen völlig neuartigen post-translationalen Regulationsmechanismus dar. Die Konservierung dieses Mechanismus in höheren Eukaryonten und die Komplexität der beteiligten Komponenten wirft die Frage nach weiteren Proteinen auf, die einer ähnlichen Regulation unterworfen sind. Man kann erwarten, dass diese ebenfalls über die Bindung an VHL erkannt und abgebaut werden. Im Zusammenhang mit der Tumorsuppressorfunktion von VHL ist die Identifizierung weiterer Substrate von Interesse, die an der Entstehung der von Hippel-Lindau-Krankheit beteiligt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von neuen Substraten des CBC^{VHL} Ubiquitin Ligase Komplexes und die funktionale Charakterisierung der Interaktion. Die Substrate sollten in zwei unterschiedlichen Systemen durch ihre Bindung an einen Subkomplex der Ubiquitin Ligase, den VCB-Komplex, identifiziert werden. Nur innerhalb dieses Komplexes kann VHL seine native, substraterkennende Konformation einnehmen. In einem ersten Ansatz wurde der VCB-Subkomplex aus *E. coli* aufgereinigt, um ihn in einer Affinitätsreinigung mit Lysaten aus humanen Zelllinien einzusetzen und bindende Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren. Außerdem sollte ein „Two-Hybrid“-Screen mit VHL in der Anwesenheit von Elongin B/C durchgeführt werden. Dazu musste zunächst eine Methode entwickelt werden, mögliche Substrate an der für die Bindung wichtigen Prolinseitenkette durch die funktionale Expression des entsprechenden Enzyms in einem „Two-Hybrid“-Hefestamm *in vivo* zu modifizieren. Dieser Hefestamm, in dem der Mechanismus der Substraterkennung durch VHL rekonstituiert wurde, sollte für einen Screen mit einer cDNA-Bibliothek verwendet werden. Nachfolgend sollte mit verschiedenen Methoden die Funktionalität der gefundenen Interaktionen überprüft und der zelluläre Zusammenhang *in vivo* genauer untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1. Expression des GST-VCB Komplexes

Um neue VHL-Substrate zu identifizieren, wurde zunächst der Ansatz gewählt, Bindungspartner von VHL aus 293T Zellen durch Affinitätschromatographie zu isolieren. Dazu sollten Lysate aus dieser humanen Zelllinie gewonnen und mit gereinigtem, immobilisiertem VCB-Komplex inkubiert werden. Anschließend sollten die an den Komplex bindenden Proteine durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde zunächst der VCB-Komplex, bestehend aus pVHL₁₉, Elongin B und Elongin C(aa17-112), nach einem abgewandelten Protokoll von (Stebbins et al., 1999) in *E. coli* exprimiert und über eine N-terminale Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusion an pVHL₁₉ gereinigt. Die hier verwendete kurze VHL-Isoform zeigt die volle Ubiquitylierungsaktivität *in vivo* und *in vitro*. Von der N-terminalen Deletion in Elongin C ist unter Berücksichtigung der Kristallstruktur keine Beeinträchtigung der Funktion zu erwarten. Die Deletion erhöht jedoch die Löslichkeit des VCB-Komplexes in *E. coli*. Als Kontrollen wurde GST alleine sowie ein Komplex aus Elongin B, Elongin C und GST-SOCS 2(29-198) (2BC-Komplex) aufgereinigt. Die Proteine der SOCS-Familie sind wie VHL substraterkennende Untereinheiten von Ubiquitin Ligase Komplexen. Sie binden ebenfalls an Elongin B/C, assemblieren jedoch in einen Cullin 5-Komplex und besitzen eine andere Substratspezifität als VHL.

Das Auftreten von bestimmten Mutationen im VHL Tumorsuppressorgen korreliert mit einer fehlenden oder stark reduzierten Funktion in der Ubiquitylierung des am besten charakterisierten Substrates HIF1/2 α . Vor allem die bekannten Mutationen in der Substratbindedomäne sind in diesem Zusammenhang interessant. Sie lassen sich nutzen, um in dem gewählten biochemischen Ansatz VHL-Substrate von Bindungspartnern mit anderer Funktion zu unterscheiden, die über eine andere Bindestelle mit VHL interagieren. Eine der häufigsten Mutationen ist der Austausch von Tyrosin 98 zu Histidin oder Asparagin, von dem man aufgrund der Kristallstruktur und der beobachteten Stabilisierung von HIF1 α annehmen konnte, dass die Substratbindung stark beeinträchtigt ist. Es treten durch die Mutation jedoch keine starken konformationellen Änderungen innerhalb des VCB-Komplexes auf (K. Knauth, MPI für Biochemie, persönliche Mitteilung). Für diesen Ansatz wurden deshalb zusätzlich VCB-Komplexe mit den pVHL₁₉ Mutanten Y98H und Y98N aufgereinigt. Alle Komplexe ließen sich unter vergleichbaren Bedingungen löslich exprimieren und in wenigen Schritten (vgl. 5.5.8) mit hoher Reinheit isolieren (Abb. 8). Die gereinigten Komplexe wurden bei -80°C gelagert und waren über einen Zeitraum von mehreren Jahren stabil. Für biochemische Untersuchungen wurden stets frisch aufgetaute Proteinkomplexe verwendet.

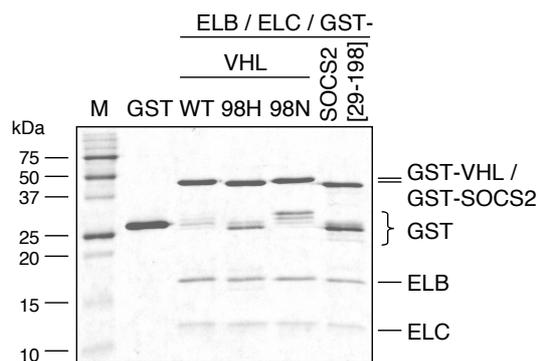


Abb. 8: Gereinigte Proteinkomplexe. Für die Affinitätschromatographie verwendete ternäre Komplexe wurden als GST-Fusion mit ca. 95% Reinheit aufgereinigt. Es wurden jeweils 1µg Gesamtprotein durch SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie gefärbt. Die einzig signifikante Verunreinigung der Komplexe besteht aus GST. M Marker, WT Wildtyp, 98H pVHL₁₉ Y98H, 98N pVHL₁₉ Y98N. ELC Elongin C, ELB Elongin B.

3.2. Ein funktionaler Assay zur Evaluierung der VHL-Interaktionen

Um im Rahmen dieser Arbeit gefundene Bindungspartner von VHL hinsichtlich ihrer Rolle als Substrat des CBC^{VHL}-Komplexes zu evaluieren, wurde ein funktionaler *in vitro* Assay für die Ubiquitylierung etabliert. Als Quelle für den E3 Komplex dienten 293T Zellen, aus denen der gesamte E3 Komplex nach Überexpression von Flag-pVHL₁₉ und HA-Cul2 (Rbx1, Elongin B und Elongin C liegen in ausreichenden Mengen endogen vor) isoliert wurde. Die Reinigung des Komplexes und die nachfolgende *in vitro* Ubiquitylierungsreaktion erfolgten nach dem Protokoll von (Miller et al., 2005). Mit dieser Methode kann *in vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes HIF1α ubiquityliert werden, wie an dem Auftreten hochmolekularer HIF1α-Reaktionsprodukte ersichtlich ist (Abb. 9).

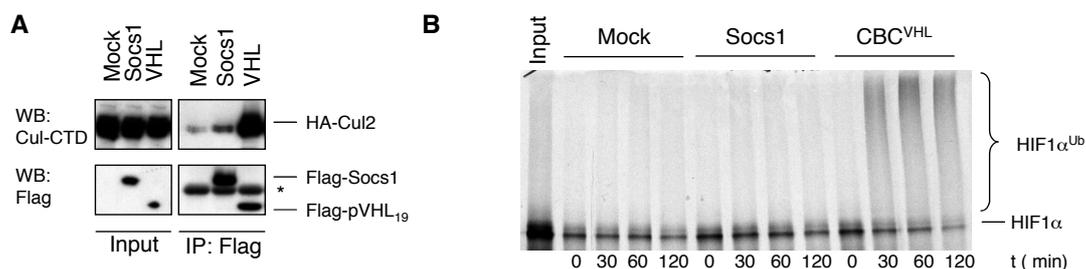


Abb. 9: Der CBC^{VHL} Komplex wurde aus 293T Zellen gereinigt und für die Ubiquitylierung von HIF1α eingesetzt. 293T Zellen wurden mit 6,5µg pcDNA-HA-Cul2 und je 4,5µg Flag-VHL, Flag-Socs1 oder Leervektor transfiziert. Der E3 Ligase Komplex wurde durch Anti-Flag Immunpräzipitation isoliert (A) und zusammen mit *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem HIF1α, rekombinantem E1, E2, Ubiquitin und ATP bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot aus der Reaktion entnommen und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Ubiquitylierte Proteine wurden durch SDS-Page und Autoradiogramm analysiert (B). Der Stern in A markiert die Leichtkette des Flag-M2 Antikörpers.

3.3. Der GST-VCB Komplex hat spezifische Bindungspartner

In ersten Vorexperimenten in kleinem Maßstab wurden verschiedene Zelllinien durch Affinitätsreinigung mit rekombinanten GST-Komplexen untersucht. Dazu wurden Lysate aus ^{35}S -markierten Zellen gewonnen und mit Glutathion Sepharose inkubiert, die mit GST, GST-VCB (Wildtyp oder Y98H) oder GST-2BC beladen war. Die gebundenen, radioaktiv markierten Proteine wurden mittels SDS-Page und Autoradiographie untersucht. In Abb. 10 sind die Ergebnisse aus drei solchen Experimenten gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass GST-VCB neben einer Anzahl unspezifischer Bindungspartner, die auch mit GST interagierten, mehrere spezifische Interaktoren hat. Für 293T (Abb. 10A) und A498 (Abb. 10B) Zellen wurden zum Vergleich Proteine über GST-2BC gereinigt.

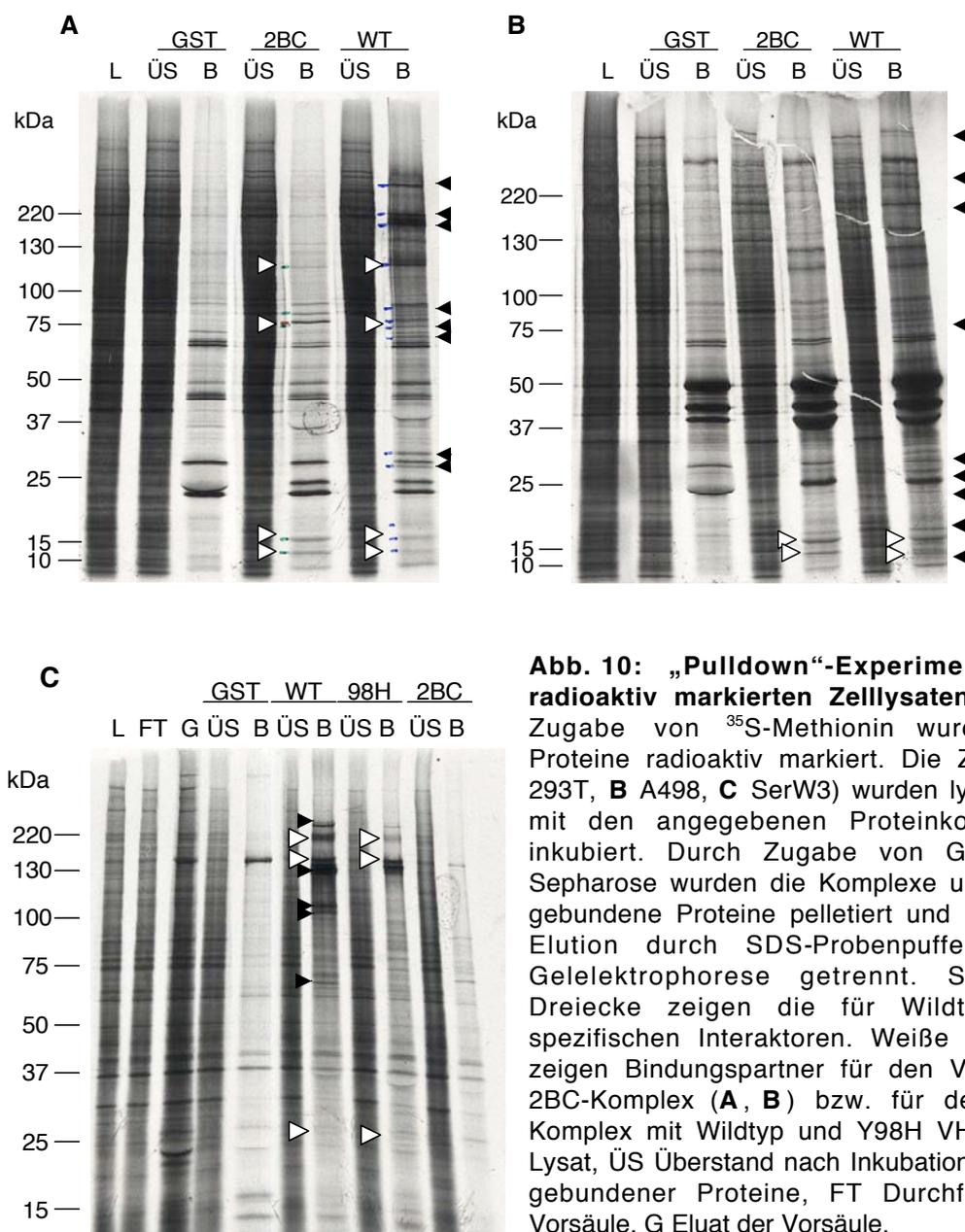


Abb. 10: „Pull-down“-Experimente mit radioaktiv markierten Zelllysaten. Durch Zugabe von ^{35}S -Methionin wurden alle Proteine radioaktiv markiert. Die Zellen (**A** 293T, **B** A498, **C** SerW3) wurden lysiert und mit den angegebenen Proteinkomplexen inkubiert. Durch Zugabe von Glutathion Sepharose wurden die Komplexe und daran gebundene Proteine pelletiert und nach der Elution durch SDS-Probenpuffer mittels Gelelektrophorese getrennt. Schwarze Dreiecke zeigen die für Wildtyp VHL spezifischen Interaktoren. Weiße Dreiecke zeigen Bindungspartner für den VCB- und 2BC-Komplex (**A**, **B**) bzw. für den VCB-Komplex mit Wildtyp und Y98H VHL (**C**). L Lysat, ÜS Überstand nach Inkubation, B Eluat gebundener Proteine, FT Durchfluss der Vorsäule, G Eluat der Vorsäule.

Es zeigte sich, dass einige Bindungspartner mit denen von GST-VCB überlappen. Hierbei handelt es sich möglicherweise um Elongin B und C (bei 12 und 15kDa), die mit den nicht markierten rekombinanten Proteinen des Komplexes austauschen oder um Cullin 2 bzw. 5, die durch ähnliche apparente Molekulargewichte (ca. 75kDa) im Gel nicht zu unterscheiden sind. Für Abb. 10C wurde das Lysat aus SerW3 Zellen zunächst mit einer GST-beladenen Matrix vorinkubiert, um den unspezifischen Hintergrund zu minimieren. Anschließend wurde das Lysat mit GST, GST-VCB (Wildtyp und Y98H) oder GST-2BC inkubiert. Durch die Vorinkubation wurden in der GST-Kontrolle deutlich weniger Proteine gebunden. Auch hier zeigte sich ein teilweise spezifisches, teilweise überlappendes Bandenmuster für die unterschiedlichen Komplexe (Abb. 10C).

Für die massenspektroskopische Bestimmung einzelner Proteine ist dieser Ansatz jedoch nicht geeignet. Deshalb wurde das Experiment unter vergleichbaren Bedingungen in größerem Maßstab mit HEK293T Zellen wiederholt. Hierbei handelt es sich um eine etablierte Laborzelllinie, die sich aufgrund ihres schnellen Wachstums und ihrer Herkunft aus embryonalen Nierenzellen (in Nierenzellen werden auch VHL-Tumore beobachtet) für diesen Ansatz besonders eignet. 293T Zellen exprimieren selbst geringe Mengen endogenes VHL. Darum wurde das Zelllysate in der Anwesenheit von Proteasom-Inhibitoren gewonnen, um potentielle VHL-Substrate vor der Degradation zu schützen und anzureichern. VHL-negative Zelllinien wären möglicherweise besser für dieses Experiment geeignet, wurden jedoch aus mehreren Gründen nicht verwendet. Zum einen erwartet man in diesen Zellen eine starke Akkumulation von HIF1/2 α , das durch seine hochaffine Bindung an VHL die Identifikation weiterer Bindungspartner erschwert. Zusätzlich können andere VHL-Substrate auch ohne VHL negativ in ihrer Expression reguliert sein, falls ihre Überexpression für die Zelle toxisch ist. In Tumorzellen beobachtet man oft einen solchen indirekten Einfluss auf verschiedene Proteine, die mit der krebsauslösenden Mutation nichts zu tun haben. Letztendlich war auch die einfache Handhabbarkeit der 293T Zellen ausschlaggebend.

Die Isolierung von VHL-Interaktoren erfolgte analog zu den Vorversuchen nach 5.5.7. Das Lysat wurde durch Präinkubation mit immobilisiertem GST von Proteinen befreit, die unspezifisch an die Matrix binden. Für die Identifizierung der Substrate wurde die Bindung an GST, GST-VCB Wildtyp und GST-VCB Y98H verglichen. Die spezifisch gebundenen Proteine wurden mit Probenpuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch SyproRuby™ angefärbt. Spezifisch GST-VCB-bindende Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert (Abb. 11). Eine signifikante Übereinstimmung der massenspektroskopischen Daten wurde mit Peptiden folgender Proteine erzielt: Daxx, DLC1, Tubulin, Kollagen α 1(VI), HBO1, GAB2 und Plakophilin 3 (PKB3). Außerdem wurden Peptide aus den durch Sequenzanalyse vorhergesagten Proteinen MGC15388 und FLJ22329 gefunden. Mit Ausnahme von Kollagen α 1(VI) banden alle Proteine an beide VHL Formen. Überraschenderweise zeigte Kollagen α 1(VI) eine Präferenz für die Y98H Mutante und konnte nur dort identifiziert werden. Das bekannte Substrat HIF1 α konnte massenspektrometrisch nicht identifiziert werden,

konnte jedoch im Western Blot durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die gewählte Methode nicht geeignet ist, um Interaktoren mit sehr geringer Abundanz zu identifizieren. Einige aussichtsreiche Kandidaten wurden näher untersucht.

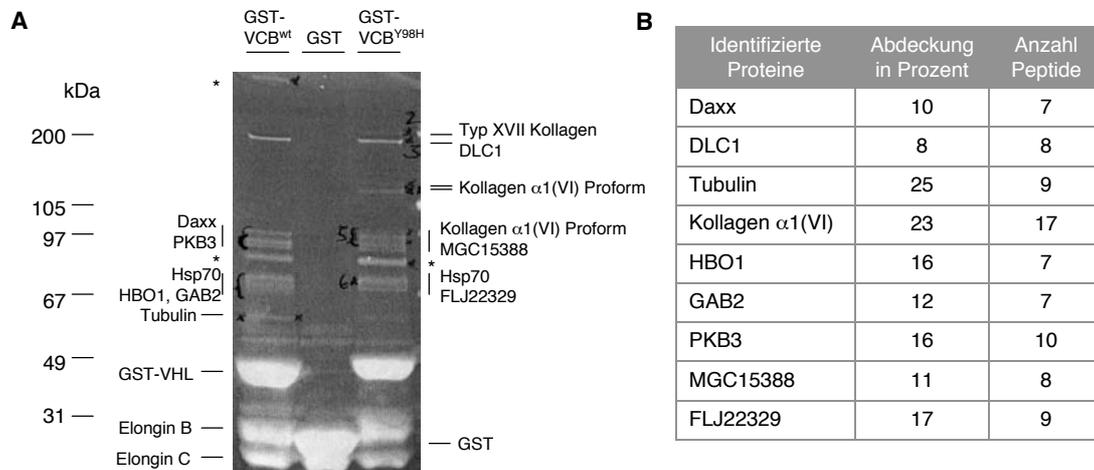


Abb.11: Pulldown aus 293T Zellen für die massenspektrometrische Untersuchung. VHL-bindende Proteine wurden wie im Text beschrieben mittels Affinitätschromatographie mit rekombinantem VCB-Komplex aus 293T Zellen isoliert. **A** Proteine wurden durch SDS-Page aufgetrennt und mit SyproRuby™ gefärbt. Der Stern markiert eine nicht proteinhaltige Verunreinigung. **B** Übersicht über die identifizierten Proteine. Die Identifikation erfolgte mit Hilfe der Software Peptident, Mascot und ProFound.

3.4. VHL bindet den transkriptionellen Repressor Daxx

Bei einem der identifizierten Proteine handelt es sich um den transkriptionellen Repressor Daxx. Dieses Protein wurde zuerst als Faktor in der Fas-induzierten Apoptose beschrieben, wo es als Reaktion auf apoptotische Stimuli an die sogenannte Todes-Domäne des Fas-Rezeptors bindet (Yang et al., 1997). Diese Rolle von Daxx ist allerdings umstritten, vor allem da der größte Teil von Daxx nukleär lokalisiert ist. Im Zellkern pendelt Daxx zwischen Chromatin oder Centromeren und einem speziellen nukleären Kompartiment, den „PML nuclear bodies“ (NBs) hin und her. Diese „nuclear bodies“ dienen vermutlich als Speicherkompartimente, in denen Transkriptionsfaktoren und Repressoren in ihrer inaktiven Form zurückgehalten werden, bis sie durch entsprechende Signale aktiviert werden. Daxx ist in der Lage, verschiedene Proteine in die „nuclear bodies“ zu rekrutieren und dadurch ihre Funktion zu inhibieren. Zusätzlich fungiert Daxx auch außerhalb der NBs als starker transkriptioneller Repressor. Je nach Zelltyp bindet Daxx beispielsweise an Pax3, Pax5 oder Ets-1 und inhibiert ihre Transkriptionsaktivität (Takahashi et al., 2004). Der Tumorsuppressor p53 wird ebenfalls durch die Bindung an Daxx inhibiert. p53 aktiviert sowohl Gene, die eine Rolle in der Zellproliferation spielen, als auch pro-apoptotische Gene, wobei spezifisch letztere von der Repression durch Daxx ausgenommen sind. Daxx spielt also auch hier eine Rolle in der Regulation der Apoptose.

Interessanterweise hat Daxx auch antiapoptotische Funktionen, wie durch Studien mit siRNA und in knockout Mäusen gezeigt wurde. Die Deletion von Daxx führt zu schweren embryonalen Fehlbildungen, die auf massive Apoptose während E7,5 und 8,5 der Embryogenese zurückzuführen sind. Die Depletierung von zellulärem Daxx durch siRNA bewirkt ebenfalls eine verstärkte Apoptose und führte zur Identifikation von E2F1 und NF- κ B als weitere Ziele der Daxx-vermittelten Repression (Michaelson und Leder, 2003). Eines der Zielgene von HIF1 α unter hypoxischen Bedingungen ist der von Daxx reprimierte Transkriptionsfaktor Ets-1 (Oikawa et al., 2001). Ets-1 wiederum kooperiert mit HIF2 α und reguliert die Aktivierung des VEGF-Rezeptors Flk1 (Elvert et al., 2003). Aufgrund diesen Zusammenhangs und einer möglichen Rolle in apoptotischen Signalwegen ist Daxx ein besonders interessanter VHL-Interaktor.

3.4.1. Daxx und VHL interagieren *in vivo*

Um die Interaktion zwischen VHL und Daxx näher zu charakterisieren, wurde Daxx zunächst in einem gerichteten „Two-Hybrid“-Test zusammen mit VHL untersucht. Dabei wurde ein „normaler“ Hefereporterstamm mit einem Reporterstamm verglichen, in dem zusätzlich Elongin B und Elongin C exprimiert werden (zur näheren Erläuterung des verwendeten Hefesystems siehe Abschnitt 3.6. und Pause et al., 1999). Aus Abb. 12 geht hervor, dass Daxx in beiden Fällen mit pVHL₃₀ interagiert, im Gegensatz zur Kontrolle Cullin2, das für die Bindung an VHL die Untereinheiten Elongin B und C benötigt.

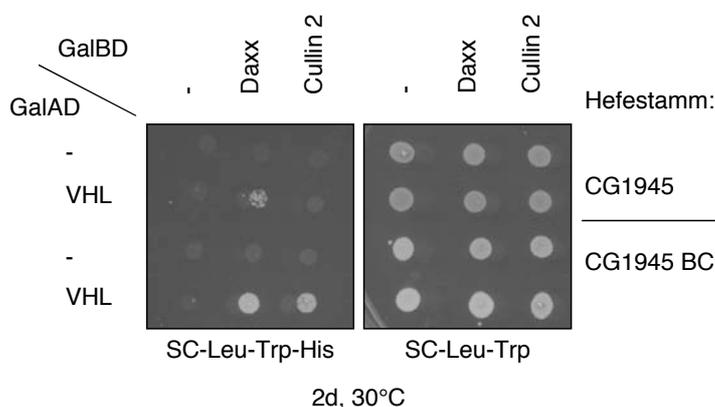


Abb. 12: „TwoHybrid“-Analyse von Daxx. pVHL₃₀ und Daxx wurden auf ihre Interaktion in An- bzw. Abwesenheit von Elongin B/C untersucht. Dazu wurden in Hefezellen gleichzeitig die angegebenen GalAD- und GalBD-Fusionen exprimiert. Die linke Abbildung zeigt das Wachstum auf der Selektionsplatte für die Interaktion. Die rechte Platte dient als Wachstumskontrolle. Als Kontrolle für eine Elongin B/C-abhängige Bindung an VHL wurde GalBD-Cullin2 verwendet. GalAD Aktivierungsdomäne, GalBD DNA-Bindedomäne.

Dies zeigt, dass Daxx für die Bindung an VHL den ternären VCB-Komplex nicht benötigt. Allerdings ist anzumerken, dass die Hefezellen auf der

Selektionsplatte in Abwesenheit der Elongine schlechter wuchsen, was auf eine schwächere Interaktion zwischen Daxx und VHL schließen lässt. Der Grund hierfür könnte die fehlende konformationelle Stabilität von VHL in diesem Hefestamm sein. Ohne Bindungspartner ist VHL auch in humanen Zellen instabil, da es sich nicht korrekt falten kann. Möglicherweise stabilisiert Daxx pVHL₃₀ durch die Bindung, wobei nur ein Teil in seine native Konformation überführt wird. In Anwesenheit von Elongin B und C liegt im Vorhinein deutlich mehr nativ gefaltetes VHL vor, das mit Daxx interagieren kann (vgl. Pause et al., 1999).

Als nächstes sollte die Interaktion in humanen Zellen gezeigt werden. Dazu wurden Daxx und HA-VHL in 293T Zellen überexprimiert und VHL mit einem HA-Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 13). Daxx interagiert sowohl mit pVHL₁₉ als auch mit pVHL₃₀, genau wie mit den bekannten Bindungspartnern HA-Ets1 und HA-YY1. Die Wechselwirkung mit pVHL₁₉ ist deutlich schwächer als mit der langen Isoform von VHL. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da Daxx über seine Wechselwirkung mit dem VCB-Komplex aus pVHL₁₉ identifiziert wurde. Allerdings wurde in jenem Ansatz eine sehr hohe lokale Konzentration des VCB Komplexes eingesetzt und konzentrierte Lysate verwendet, was die Bindung an pVHL₁₉ verstärkte. Im Folgenden wurde, wenn nicht anders angegeben, in Experimenten mit Daxx stets pVHL₃₀ eingesetzt.

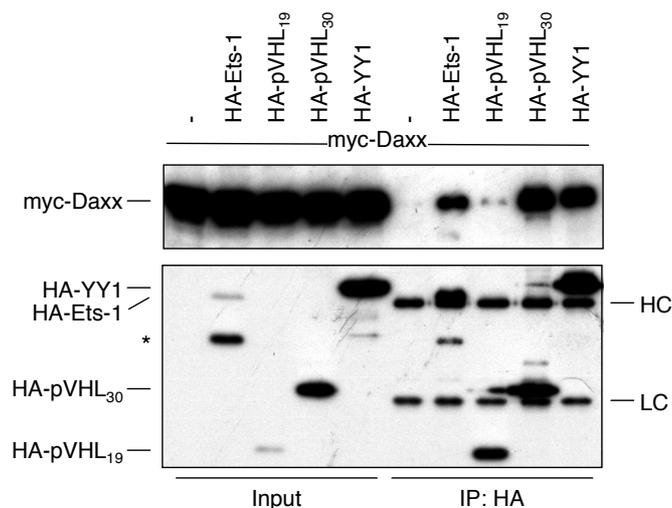


Abb. 13: Immunpräzipitation von Daxx mit pVHL. 293T Zellen wurden mit je 6,5µg Plasmid zur Expression der angegebenen Proteine transfiziert. pVHL₁₉ und pVHL₃₀ sind beide in der Lage, Daxx zu präzipitieren. Die Wechselwirkung mit pVHL₁₉ ist jedoch deutlich schwächer als mit pVHL₃₀. Der Stern markiert ein stabiles Abbauprodukt von HA-Ets-1. HC, LC: Schwer- und Leichtkette des Antikörpers.

3.4.2. Daxx ist ein Substrat für die Ubiquitylierung

Um zu untersuchen, ob VHL durch die Bindung an Daxx dessen Degradation vermittelt, wurde zunächst untersucht, ob Daxx *in vivo*

ubiquityliert ist. Dazu wurde Daxx zusammen mit His-Ubiquitin in 293T Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden 36 bis 48h nach der Transfektion 3,5h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert, um ubiquitylierte Proteine anzureichern. Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen lysiert und die Ubiquitinkonjugate durch Affinitätschromatographie mit Nickel-NTA Agarose gereinigt (s. 5.5.6). Als Kontrolle für die Spezifität des Pulldowns wurde HA-markiertes Ubiquitin eingesetzt. Nach Elution und Trennung über Gelelektrophorese konnte Daxx durch Western Blot nachgewiesen werden. Daxx wird *in vivo* durch Ubiquitin modifiziert (Abb. 14, Spur 1). Die Überexpression von Flag-pVHL₃₀ hatte keinen eindeutigen Einfluss auf die Ubiquitylierung von Daxx. In einigen Fällen führte sie zu keiner weiteren Verstärkung der Daxx-Ubiquitylierung, in einigen Experimenten, wie dem hier gezeigten, führte sie zu einer vollständigen oder teilweisen Inhibierung der Ubiquitylierung (vgl. Spuren 1 und 5). Hierbei könnte es sich um unspezifische Effekte handeln, möglicherweise führt VHL durch die Bindung an Daxx auch zu dessen Stabilisierung (s. auch Abb. 15 und 16)

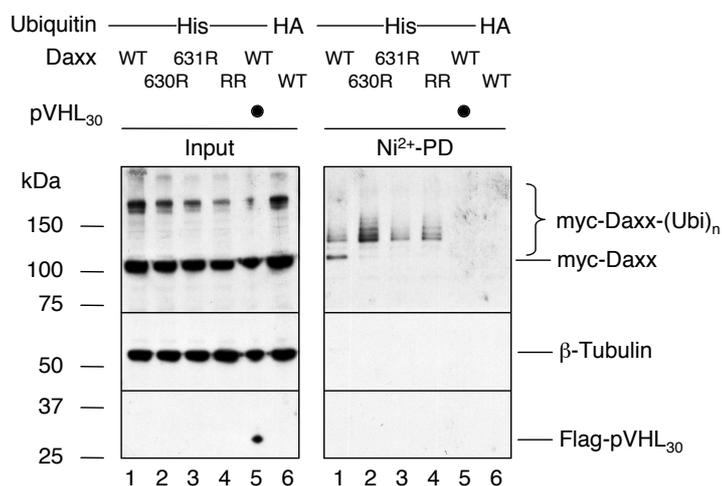


Abb. 14: Daxx ist Substrat für die Ubiquitylierung *in vivo*. 293T Zellen wurden mit 10 µg pcDNA-His- oder pcDNA-HA-Ubiquitin und 6,5 µg des angegebenen Daxx Konstrukts als N-terminale myc-Fusion transfiziert. Der Stern markiert die zusätzliche Transfektion mit 4,5 µg Flag-pVHL₃₀. Nach einem Pulldown mit Ni-NTA unter denaturierenden Bedingungen konnte durch His-Ubiquitinketten modifiziertes Daxx im Western Blot mit einem anti-Daxx Antiserum nachgewiesen werden. HA-Ubiquitin fungierte als Negativ-Kontrolle. WT Wildtyp, RR 630R/631R.

In Daxx wurden bereits zwei Lysinreste identifiziert, an denen das Protein SUMOyliert wird (Jang et al., 2002). Die SUMOylierung beeinflusst möglicherweise die Repressoraktivität von Daxx. In diesem Zusammenhang könnte die Ubiquitylierung an der gleichen Lysinseitenkette antagonistisch wirken, ähnlich wie im Falle von IκBα (Kracklauer und Schmidt, 2003). Aus diesem Grund wurde im Nickel-Pulldown neben Wildtyp Daxx auch die entsprechenden SUMOylierungsmutanten K630R, K631R und KK630/631RR untersucht (Spuren 2-4). Die Mutation der Akzeptorlysine für die Modifikation

durch SUMO war nicht in der Lage, die Ubiquitylierung von Daxx aufzuheben. Dies zeigt, dass für die Konjugation von Ubiquitin andere Seitenketten verwendet werden.

Als nächstes sollte die Stabilität von Daxx in einer VHL-negativen Zelllinie mit der in einer VHL-positiven Zelllinie, in der pVHL₃₀ stark überexprimiert wird, verglichen werden. Dazu wurden Lysate aus Zellen der Klarzellkarzinomzelllinie 786-O und der entsprechenden stabil transfizierten Zelllinie 786-O HA-VHL (Iliopoulos et al., 1995) im Western Blot verglichen (Abb. 15, Spuren 1, 2). Im Gleichgewichtszustand ließen sich nur geringe Unterschiede in der Gesamtmenge an zellulärem Daxx detektieren, wobei VHL keinen destabilisierenden Einfluss auf Daxx hatte, sondern im Gegenteil eine geringfügige Akkumulation von Daxx in der VHL-positiven Zelllinie zu beobachten war. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Kotransfektion von VHL und Daxx für Koimmunpräzitations- und Pulldown-Experimente keinen negativen Einfluss auf die Stabilität von Daxx hatte (s. Input-Banden in Abb. 13 und 14).

Mit einem monoklonalen anti-HA Antikörper wurde HA-VHL aus 786-O HA-VHL Zellen und 786-O Zellen als Negativkontrolle immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-Page und WB auf die Anwesenheit von endogenem Daxx untersucht. Es konnte kein endogenes Daxx im Präzipitat nachgewiesen werden. (Abb. 15, Spuren 3,4). Dies könnte einerseits ein Problem der Empfindlichkeit sein: Möglicherweise interagiert unter physiologischen Bedingungen nur eine geringe Subpopulation von Daxx mit VHL. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Bindung bei Überexpression beider Proteine auf eine unspezifische Interaktion zwischen teilweise entfalteten Proteinen zurückzuführen ist.

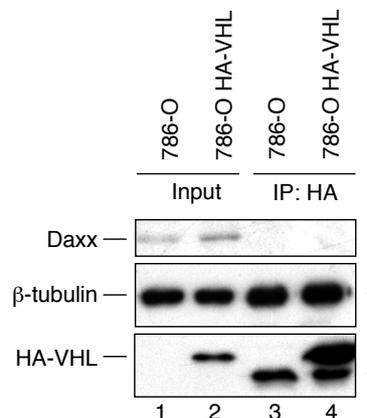


Abb. 15: Daxx in VHL-negativen und -positiven Zelllinien. HA-pVHL₃₀ wurde aus ca. 1mg Zelllysate mit einem anti-HA Antikörper präzipitiert. Gebundene Proteine wurden durch SDS-Page und Western Blot auf die Anwesenheit von Daxx untersucht (3,4). Zum Vergleich sind je 1 μ g Lysat aufgetragen (1,2). Ein Stern markiert die leichte und schwere Kette des Antikörpers.

3.4.3. VHL spielt keine Rolle in bekannten Funktionen von Daxx

Nach den bisherigen Beobachtungen erscheint es unwahrscheinlich, dass VHL eine Rolle in der Ubiquitylierung von Daxx und seinem regulierten Abbau durch das 26S Proteasom spielt. Vermutlich ist der CBC^{VHL} Komplex nicht die E3 Ligase für Daxx oder modifiziert nur eine geringe Subpopulation, die mit Antikörpern gegen endogenes Daxx in 786-O Zellen nicht detektierbar ist. Möglicherweise erfolgt die Ubiquitylierung von endogenem Daxx erst nach einem äußeren Stimulus oder einer post-translationalen Modifikation. Die beobachtete Ubiquitylierung in 293T Zellen ist möglicherweise auf die starke Überexpression zurückzuführen. Neben der Degradation könnte VHL jedoch auch durch alternative, CBC^{VHL} -unabhängige Mechanismen die Funktion von Daxx beeinflussen. Dies sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zunächst wurde der Einfluss von VHL auf die zelluläre Lokalisation von Daxx untersucht. Dazu wurden Immunfluoreszenzen mit der VHL-negativen Zelllinie 786-O und der davon abgeleiteten, stabil transfizierten Zelllinie 786-O HA-VHL durchgeführt. Die Lokalisation von Daxx in „nuclear bodies“ wurde durch die Anwesenheit von VHL nicht beeinflusst (Abb. 16). Die Expression von HA-VHL führt jedoch zu einer leichten Akkumulation von Daxx, da sich eine Verstärkung des Signals beobachten ließ. Dieser Effekt war bereits im Western Blot zu sehen (Abb. 15)

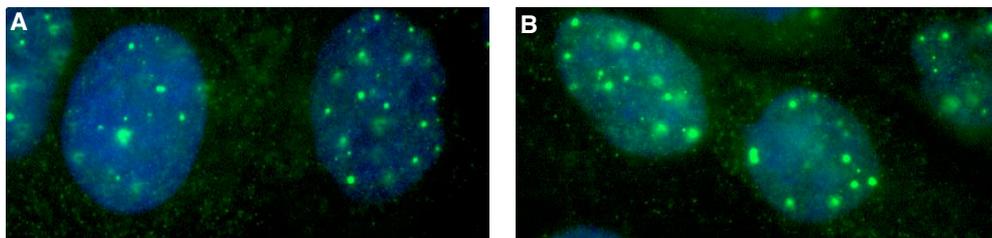


Abb. 16: Die Lokalisation von endogenem Daxx ist unabhängig von VHL. 786-O (A) und 786-O HA-VHL (B) Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit Anti-Daxx Antikörper (Daxx-01) inkubiert. Die Anwesenheit von VHL hat keinen Einfluss auf die Daxx-Lokalisation in „PML nuclear bodies“. DNA wurde durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

Die Lokalisation von Daxx ist vom Stadium des Zellzyklus und unterschiedlichen externen Stimuli abhängig. Während Daxx meist in „nuclear bodies“ zu finden ist, relokalisiert es zum Ende der S-Phase transient an Heterochromatin, bevor es in G2 wieder in NBs lokalisiert (Ishov et al., 2004). Anfänglich wurde berichtet, dass geringe Mengen von Daxx auch im Zytosol zu finden sind, wo Daxx z.B. nach Rezeptor-Stimulation an die zytosolische Todes-Domäne des Fas-Rezeptors bindet (Yang et al., 1997). Um zu untersuchen, ob VHL einen Einfluss auf die Rekrutierung von Daxx an diesen Todesrezeptor hat, wurden verschiedene Zelllinien mit Fas Ligand stimuliert. Die verwendeten Konzentrationen waren ausreichend, um in den Zellen Apoptose zu induzieren (vgl. Tabelle 3). Die Stimulation führte jedoch nicht zu einer Relokalisation von Daxx in 786-O, 786-O HA-VHL oder HeLa Zellen

(Daten nicht gezeigt). Daxx konnte nur in „nuclear bodies“ beobachtet werden, bei starker Überexpression ist zusätzlich eine diffuse nukleäre Verteilung zu sehen (vgl. Abb. 17). Diese Beobachtung ist konsistent mit späteren Berichten, nach denen die Rolle von Daxx in der Fas-induzierten Apoptose nicht in der direkten Bindung an den Fas-Rezeptor, sondern in der Regulation apoptotischer Gene in diesem Signalweg liegt (Torii et al., 1999).

Im Rahmen der Studien mittels Immunfluoreszenz fiel auf, dass die Überexpression von Daxx z.B. in HeLa Zellen zu einer Relokalisation von endogenem VHL in den Zellkern führte (Abb. 17 obere Reihe). Wurde zusätzlich noch pVHL₁₉ überexprimiert (untere Reihe), akkumulierte es fast vollständig im Kern. Dies gilt sowohl für pVHL₁₉ als auch für pVHL₃₀ (nicht gezeigt). Während Daxx eine sehr starke Anreicherung an den „nuclear bodies“ zeigte, war VHL nahezu gleichmäßig im Kern verteilt.

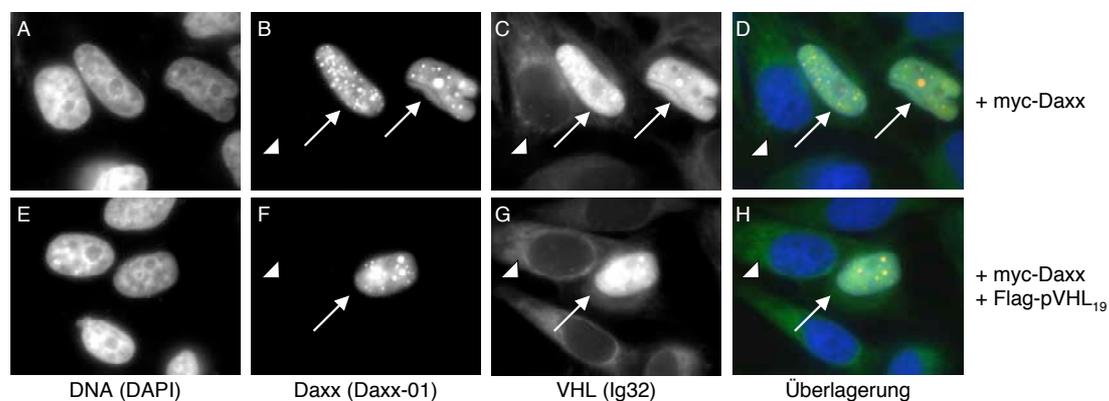


Abb. 17: Die Überexpression von Daxx bewirkt eine nukleäre Akkumulation von VHL. 293T Zellen wurden mit myc-Daxx transfiziert und die zelluläre Lokalisation von Daxx und VHL durch Immunfluoreszenz detektiert. **A, E** DAPI-Färbung, **B, F** Anti-Daxx Antikörper (Daxx-01) **C, G** Anti-VHL Antikörper (Ig32) **D, H** Overlay. Sowohl endogenes VHL (**A-D**) als auch überexprimiertes pVHL₁₉ (**E-H**) akkumulieren im Zellkern und kolokalisieren dort mit überexprimiertem Daxx (transfizierte Zellen, weiße Pfeile). In Zellen mit geringer Daxx Expression (nicht transfizierte Zellen, weiße Dreiecke) ist VHL primär im Zytosol lokalisiert. Aufgrund der geringen zellulären Konzentration im Vergleich zu den transfizierten Zellen ist in den hier gezeigten Expositionen endogenes Daxx nicht detektierbar.

Aufgrund der beobachteten Lokalisation von Daxx und VHL im Zellkern sollte als nächstes untersucht werden, ob VHL die Funktion von Daxx als Regulator der Transkription beeinflusst. Neben einer spezifischen Repressoraktivität durch die Bindung an bestimmte Transkriptionsfaktoren inhibiert Daxx auch ganz allgemein die Transkription, wenn es durch eine Fusion mit der DNA-Bindedomäne des Gal4 Transkriptionsfaktors (GalBD) an DNA gebunden wird (Hollenbach et al., 1999). Aus diesem Grund wurde zunächst ein Reporterkonstrukt (Glühwürmchen-Luziferase) mit einer Gal4-Bindestelle in einem TK-Promotor zusammen mit steigenden Konzentrationen eines Expressionsplasmids für GalBD-Daxx in HeLa Zellen transfiziert. Zur Normierung der Luziferase-Aktivität auf die Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein Plasmid für die konstitutive Expression von Renilla Luziferase

kotransfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und die enzymatische Aktivität beider Luziferasen bestimmt. Daxx hatte einen konzentrationsabhängigen, negativen Einfluss auf die Basalaktivität dieses Reporters (Abb. 18 links). Die Expression von pVHL₃₀ in diesen Zellen hatte keinen eindeutigen Effekt. Wurde pVHL₃₀ alleine mit dem Reporter transfiziert, zeigte sich eine partielle Repression des Reporters, die jedoch nicht mit der Menge an transfiziertem VHL korrelierte (Abb. 18 Mitte). Die gleichzeitige Expression von Daxx und pVHL₃₀ führte bei geringen VHL-Konzentrationen zu einer stärkeren Repression des Reporters als mit Daxx alleine, bei höheren Konzentrationen ließ sich jedoch eine relative Zunahme der Luziferase-Aktivität beobachten (Abb. 18 rechts).

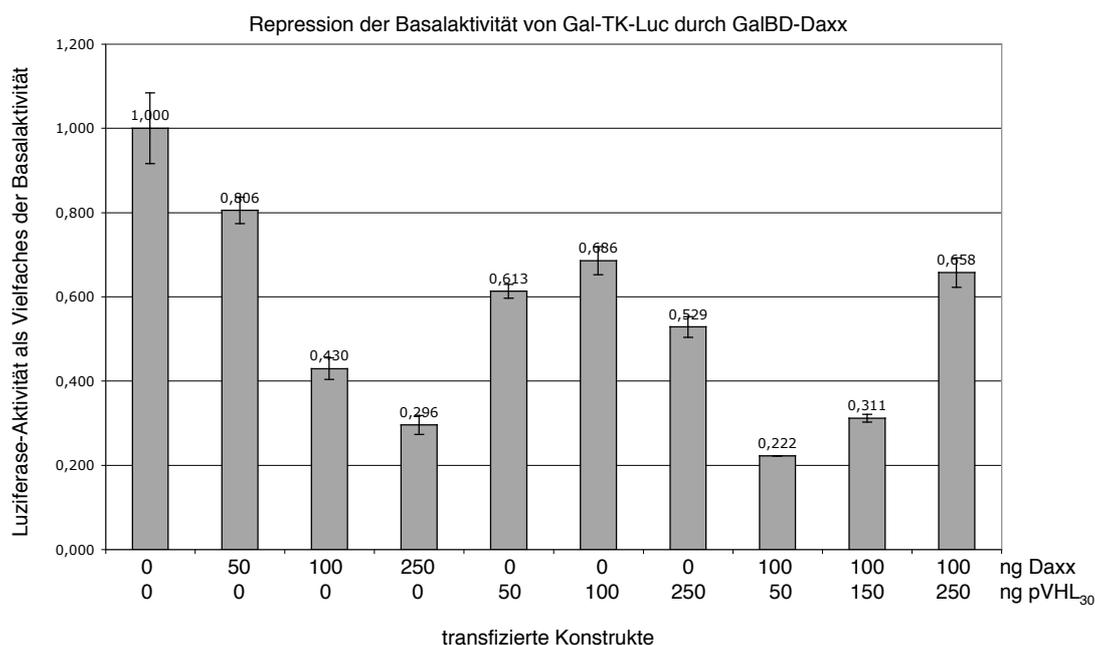


Abb. 18: Einfluss von Daxx und VHL auf die basale Gal4-abhängige Expression. Hela Zellen wurden mit dem Luziferase-Reporterplasmid Gal4-TK-Luc und den angegebenen Mengen an DNA für die Expression von Daxx und pVHL₃₀ transfiziert. Nach 48h Stunden wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die gemessene Aktivität wurde auf die Transfektionseffizienz normiert und die basale Aktivität des Reporters gleich eins gesetzt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Doppelbestimmungen dargestellt.

Der Grund für den unterschiedlichen Einfluss von VHL ist nicht leicht verständlich. Unter Berücksichtigung der Immunfluoreszenz-Experimente, bei denen die Überexpression von Daxx zu einer Relokalisation von VHL in den Zellkern führte, liegt VHL möglicherweise in diesem Experiment in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten vor. Die Repression der basalen Transkription ist vielleicht der indirekte Effekt einer erhöhten VHL-Konzentration im Zytosol. In Anwesenheit von überexprimiertem Daxx liegt VHL größtenteils im Zellkern vor und könnte dort einen Einfluss auf die Daxx-reprimierte Transkription ausüben. Da der TK-Promotor kein direktes Ziel von

Daxx ist, können in diesem Reportersystem nur indirekte Einflüsse beobachtet werden, die durch die Rekrutierung allgemeiner, Daxx-bindender Faktoren an die DNA entstehen (z.B. Histondeacetylasen).

Aufgrund der möglicherweise unspezifischen Effekte von VHL auf die Transkription und der geringen Reporteraktivierung in diesem System sollte als nächstes der Einfluss von VHL auf die Repression eines bekannten, durch Daxx regulierten Transkriptionsfaktors untersucht werden. Das Hauptziel von Daxx sind Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie. Deshalb wurde als Reporterkonstrukt ein Plasmid mit einer Ets-1-Bindestelle im Promotor von Bcl-2 verwendet (Chen und Boxer, 1995). Durch die Überexpression von Ets-1 ließ sich der Reporter stark aktivieren. Diese Ets-1-abhängige Aktivierung ließ sich durch Expression steigender Mengen an Daxx linear reprimieren (Daten nicht gezeigt). Leider ließ sich der Einfluss von VHL in diesem System nicht untersuchen, da die Vielzahl der für die Expression aller Faktoren benötigten Plasmide zu einer schwankenden Transfektionseffizienz führte. Zusätzlich ließ sich eine unspezifische Repression des Ets-1-Reporters nach der Transfektion mit mehreren Plasmiden beobachten. So wurde der Reporter auch durch die Überexpression von GFP stark reprimiert. Der Versuch, Reporterassays mit diesem System in VHL-defizienten Zellen durchzuführen, scheiterte an der sehr schlechten Transfektionseffizienz dieser Zelllinien (<10%).

Eine spezifische Aktivierung von Genen wird häufig durch kooperative Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an unterschiedliche Promotor-Elemente erreicht. So wird beispielsweise eine verstärkte Aktivierung des vascular endothelial growth factor Rezeptor-2 (Flk-1) nach gleichzeitiger Bindung von Ets-1 und HIF2 α beobachtet (Elvert et al., 2003). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, welchen Einfluss Daxx auf die Regulation von HIF-Zielgenen hat. Hierzu wurde ein Reportersystem verwendet, bei dem Luziferase unter der Regulation eines „HIF-responsive-element“ (HRE) steht (Wood et al., 1998). Durch steigende Mengen an transfiziertem HIF1 α -Plasmid konnte der Reporter aktiviert werden (Abb. 19 links). Dabei zeigte Wildtyp HIF1 α , das von endogenem VHL in Hela Zellen unter normoxischen Bedingungen erkannt und abgebaut wird, eine geringere Fähigkeit zur Aktivierung des Reporters als die HIF1 α Mutante PPAG, bei der beide für die Degradation essentiellen Prolinseitenketten zu Alanin bzw. Glyzin mutiert sind. Nach der Transfektion von 500ng VHL-Plasmid war eine deutliche Repression des Reporters (Faktor 3 bei HIF1 α Wildtyp und Faktor 4,5 bei HIF1 α PPAG) zu beobachten. Dies zeigt, dass VHL auch eine CBC^{VHL}-unabhängige Rolle als Regulator der Transkription spielen kann (Li et al., 2003), da dieser Effekt auch bei der HIF1 α -Mutante zu beobachten war (Abb. 19 rechts).

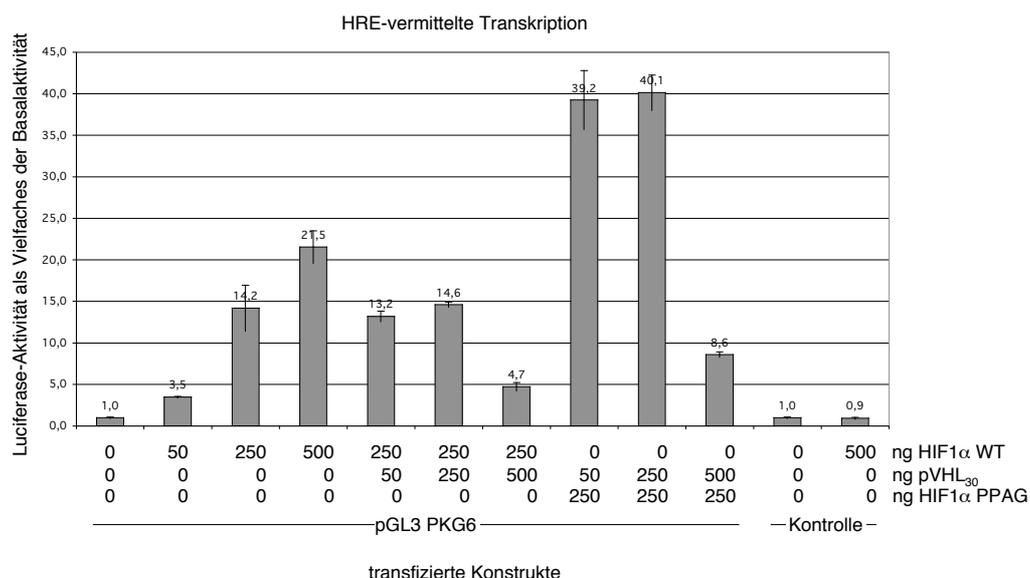


Abb. 19: VHL reprimiert die HIF1 α -Aktivität. Hela Zellen wurden mit dem Luziferase-Reporterplasmid pGL3-PKG6 und den angegebenen Mengen an DNA für die Expression von WT HIF1 α oder nicht-degradierbarem HIF1 α PPAG und pVHL₃₀ transfiziert. Nach 48h Stunden wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein Reporterplasmid ohne HIF1 α -Bindestelle (Kontrolle). Die gemessene Aktivität wurde auf die Transfektionseffizienz normiert und die basale Aktivität des Reporters gleich eins gesetzt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Doppelbestimmungen dargestellt.

Leider war auch in diesem System keine eindeutige Aussage bezüglich der Rolle von Daxx möglich, da die Experimente widersprüchliche, z.T. nicht reproduzierbare Ergebnisse lieferten. Während die Transaktivierungsassays die jeweils bekannten Funktionen von VHL und Daxx bestätigten, ermöglichten sie keine Aussage bezüglich eines wechselseitigen Einflusses von Daxx und VHL auf die Transkription. Für die HIF1 α -abhängige Regulation der Transkription spielen eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle. Neben der Degradation durch den CBC^{VHL} Komplex beeinflusst auch die Bindung von HIF1 β und weiteren Kofaktoren die HIF-Aktivität. Aufgrund des komplexen Zusammenspiels aller Faktoren ist es unwahrscheinlich, in einem Transaktivierungsassay eine physiologische Regulation beobachten zu können. Die Transfektion zusätzlicher Komponenten (HIF1 β , Cul2) erscheint nicht sinnvoll, da mit unspezifischen Effekten zu rechnen ist und sich die *in vivo* Stöchiometrie der einzelnen Faktoren nicht kontrollieren lässt.

Aus diesem Grund sollte mit biochemischen Methoden überprüft werden, ob HIF1 α , Ets-1 und Daxx in einem gemeinsamen Komplex vorliegen. Um diese Frage zu beantworten wurde HIF1 α zusammen mit myc-Daxx oder myc-Luziferase in 293T Zellen überexprimiert und die Epitop-markierten Proteine mit anti-myc Beads aus den Lysaten isoliert. HIF1 α wurde durch Daxx, nicht jedoch durch Luziferase präzipitiert (Abb. 20A). Zusätzlich konnte die Bindung von HIF1 α an Ets-1 demonstriert werden. Dazu wurden HA-Ets-1 oder HA-Cul2 zusammen mit HIF1 α überexprimiert und mit anti-HA Beads

präzipitiert. HIF1 α band sowohl an Ets-1 als auch in geringem Maße an Cul2 (Abb. 20B), wobei letztere Interaktion vermutlich durch den endogenen VCB-Komplex vermittelt wurde. Als Positivkontrolle wurde die Interaktion mit HA-pVHL₁₉ verwendet. Obwohl in den Transaktivierungsassays kein Hinweis auf eine Rolle von Daxx in der VHL-abhängigen Regulation von HIF1 α gefunden wurde, ist die Interaktion von HIF1 α mit Daxx und Ets-1 ein Hinweis darauf, dass die Aktivität von HIF1 α neben dem Abbau durch VHL bei hohen Sauerstoffkonzentrationen einerseits und der Stabilisierung und Dimerisierung mit HIF1 β bei Hypoxie andererseits noch durch weitere Faktoren beeinflusst werden kann. Unter welchen zellulären Bedingungen eine solche zusätzliche Regulation eine Rolle spielen könnte, ist unklar.

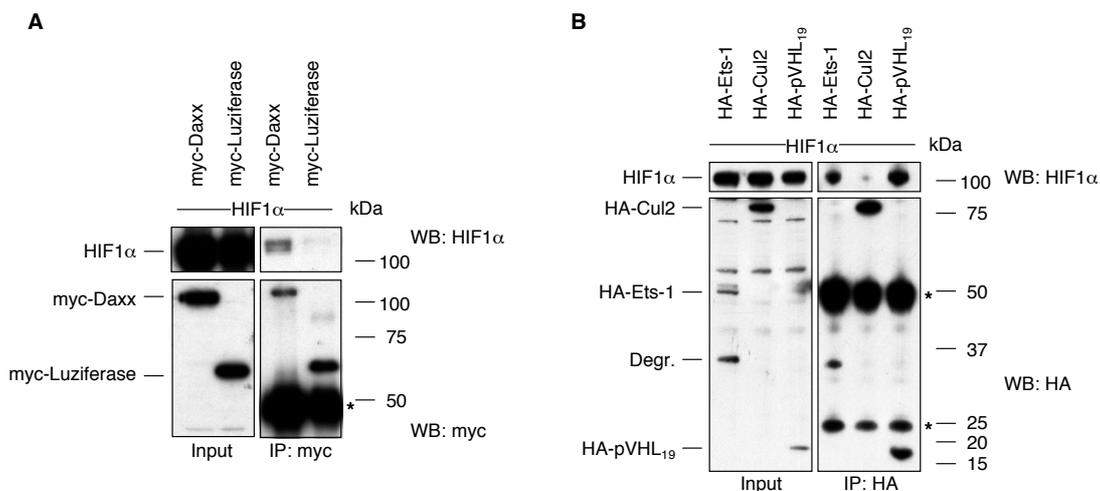


Abb. 20: HIF1 α bindet an Daxx und Ets-1. **A** 293T Zellen wurden mit je 8 μ g HIF1 α und 8 μ g myc-Daxx oder 5 μ g myc-Luciferase transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die getaggtten Proteine mit je 35 μ l anti-myc Beads (Santa Cruz) präzipitiert. Gebundenes HIF1 α wurde durch Western Blot gegen HIF1 α detektiert. Der Stern markiert die Schwereketten des Antikörpers. **B** 293T Zellen wurden mit je 8 μ g HIF1 α und 8 μ g HA-Ets-1, 8 μ g HA-Cul2 oder 6,5 μ g HA-pVHL₁₉ transfiziert. Nach 40h wurden die Proteine mit je 35 μ l anti-HA Beads (Santa Cruz) aus dem Lysat präzipitiert. Gebundenes HIF1 α wurde durch Western Blot gegen HIF1 α detektiert. Sterne markieren die Leicht- und Schwereketten des Antikörpers. Degr.: Abbauprodukt von HA-Ets-1.

Neben einer möglichen Rolle in der Regulation der Transkription wurde auch eine potentielle Funktion von VHL und Daxx in der Apoptose näher untersucht. Man unterscheidet in der Apoptose zwischen zwei Hauptsignalwegen. Während der extrinsische Signalweg über die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren zur Aktivierung von Caspase 8 führt, wird bei dem intrinsischen Signalweg Caspase 9 durch die Ausschüttung proapoptischer Proteine aus den Mitochondrien (Cytochrom C, SMAC etc.) infolge unterschiedlicher Stress-Signale, z.B. DNA-Schäden oder Hypoxie, aktiviert. Als erstes wurde die VHL-negative Zelllinie 786-O mit einer HA-VHL exprimierenden Zelllinie in Bezug auf ihre Reaktion auf verschiedene

apoptotische Stimuli untersucht. Dazu wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von Todesrezeptor-Liganden (TRAIL, TNF), Etoposid, FasLigand oder Antikörpern gegen den Fas-Rezeptor über Nacht inkubiert. Etoposid stimuliert den intrinsischen Signalweg, während die anderen Liganden und Antikörper den extrinsischen Signalweg aktivieren. Am nächsten Tag wurden die lebenden Zellen mit Kristallviolett angefärbt und die Konzentration ermittelt, bei der die Hälfte der Zellen überlebt hatte (ED_{50}). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Zelllinie Apoptose Inducer	786-O	786-O HA-VHL
TRAIL	1 μ g/ml	0,125 μ g/ml
TNF	kein Effekt	kein Effekt
Etoposid	125 μ M	16 μ M
FasLigand	3,2ng/ml	0,8ng/ml
FasAb poly	kein Effekt	kein Effekt
FasAb mono	kein Effekt	kein Effekt

Tabelle 3: Die VHL-negative Zelllinie 786-O ist weniger sensitiv gegenüber apoptotischen Stimuli. 786-O HA-VHL Zellen sind im Vergleich mit 786-O Zellen achtmal sensitiver gegenüber TRAIL und Etoposid und viermal sensitiver gegenüber FasLigand. Angegeben sind die ED_{50} -Werte.

Für den apoptotischen Stimulus TRAIL zeigte sich eine deutlich geringere Sensitivität der VHL-negativen Zellen. Hier führte die Inkubation mit 1 μ g/ml TRAIL für 16h zu Apoptose in ca. 50% der Zellen, während bei der Zelllinie 786-O HA-VHL bereits eine Konzentration von 125ng/ml ausreichend war, um in der Hälfte der Zellen Apoptose zu induzieren. Auch in Anwesenheit von Etoposid und FasLigand zeigten 786-O Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber den VHL-positiven Zellen. Hier wurden 125 μ M bzw. 3,2ng/ml gegenüber 16 μ M und 0,8ng/ml zur Induktion der Apoptose benötigt. Bei den anderen Stimuli war in diesem Experiment keine Apoptose zu beobachten. Die fehlende Induktion der Apoptose durch $TNF\alpha$ steht im Widerspruch zu Qi und Ohh (2003), die eine erhöhte Sensitivität gegenüber $TNF\alpha$ für die stabil transfizierte 786-O HA-VHL Zelllinie beobachten konnten. Die Stimulation der VHL-negativen 786-O Zellen führte dort zu einer vermehrten Aktivierung von $NF-\kappa B$, das für die Aktivierung anti-apoptotischer Faktoren wie Survivin und Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) verantwortlich ist. In der abgeleiteten Zelllinie 786-O HA-VHL hingegen ist die Aktivierung von $NF-\kappa B$ unterdrückt. Die hier beobachtete Sensitivität der VHL-positiven Zellen gegenüber TRAIL, Etoposid und FasLigand spricht ebenfalls für eine pro-apoptotische Rolle von

VHL sowohl in intrinsischen als auch in extrinsischen apoptotischen Signalwegen. Entweder ist VHL direkt an der Regulation apoptotischer Faktoren beteiligt, oder der beobachtete Effekt ist eine indirekte Folge der HIF-Stabilisierung, z.B. durch die Aktivierung anti-apoptotischer Gene.

In einem weiteren Experiment sollte die Auswirkungen von apoptotischen Stimuli auf VHL und Daxx untersucht werden. Dazu wurden 786-O und 786-O HA-VHL Zellen über Nacht mit dem Todesrezeptor-Liganden TRAIL inkubiert. In Anlehnung an das vorhergehende Experiment wurden unterschiedliche Konzentrationen des Liganden getestet. Die Zellen wurden lysiert und die Lysate mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich für die VHL-positiven Zellen, dass sowohl VHL als auch Daxx in Anwesenheit von TRAIL prozessiert wurden. Schon eine Konzentration von 50ng/ml, die unter dem ED₅₀-Wert für 786-O HA-VHL Zellen liegt, führt zur teilweisen Apoptose-Induktion und Spaltung von Daxx und VHL. Interessanterweise wurde Daxx in den VHL-negativen 786-O Zellen auch bei der zweifachen ED₅₀-Konzentration von 2µg/ml TRAIL nicht prozessiert (Abb. 21), die Spaltung ist also VHL-abhängig. Anhand der Spaltung von Procaspase 3 konnte gezeigt werden, dass in diesen Zellen keine vollständige Apoptose induziert wird. In der Zelllinie 786-O HA-VHL hingegen wird Procaspase 3 in linearer Abhängigkeit von der TRAIL-Konzentration gespalten. Die Prozessierung ist von der Aktivität von Caspasen abhängig, da sie durch Zugabe des pan-Caspase Inhibitors z-VAD-fmk vollständig inhibiert werden konnte.

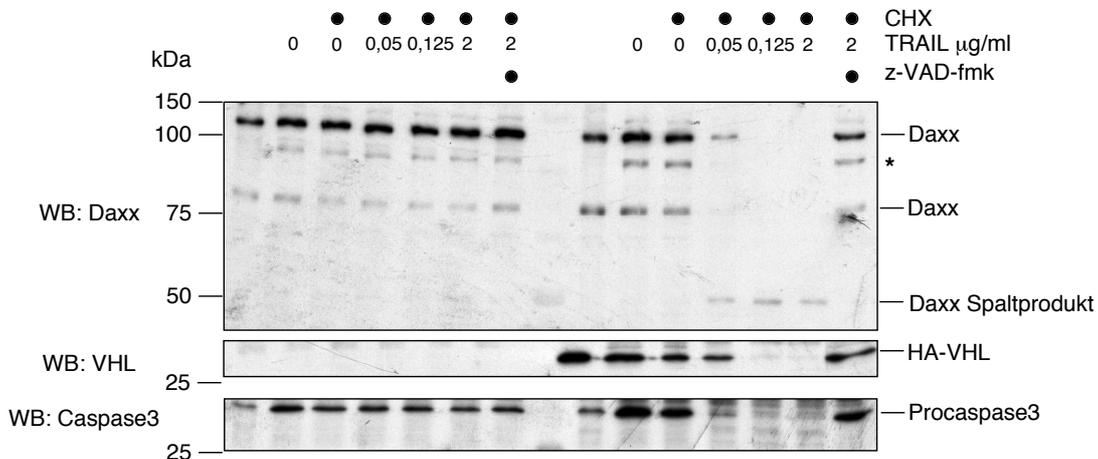


Abb. 21: Spaltung von Daxx in Abhängigkeit von VHL. VHL-negative und -positive Zellen wurden 16h mit den angegebenen Konzentrationen an TRAIL inkubiert und die Auswirkung auf zelluläres VHL und Daxx untersucht. Sowohl VHL als auch Daxx werden in Anwesenheit von TRAIL und Cycloheximid (CHX) prozessiert. Die Induktion der Apoptose wurde durch die Spaltung von Procaspase 3 nachgewiesen. Die Zugabe von 50µM des pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk konnte die Spaltung von Daxx, VHL und Caspase 3 inhibieren. Die mit einem Stern markierte Bande wurde durch die Zugabe von DMSO induziert. Möglicherweise handelt es sich um eine weitere Form von Daxx.

Chen und Chen (2003) konnten eine ähnliche Prozessierung von Daxx nach Induktion von Apoptose beobachten. Jedoch führten sie die Spaltung von Daxx auf proteasomalen Abbau zurück. Um zu überprüfen, ob es sich um eine rein Caspase-abhängige Prozessierung handelt oder das Proteasom eine Rolle in der Spaltung von Daxx spielt, sollte Daxx in einem Caspase-Assay eingesetzt werden. Hierzu wurde *in vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes Daxx zusammen mit 4µg rekombinanten Caspasen 3, 6, 7, 8 oder 9 (C. Pohl) für 1,5h bei 30°C inkubiert. In diesem Assay konnte gezeigt werden, dass Daxx von den Caspasen 3, 6 und 8 prozessiert wird (Abb. 22A). Die Prozessierung von Daxx äußert sich im Falle von Caspase 8 durch das Auftreten mehrerer Zwischenprodukte von ca. 80, 47, 32 und 25kDa im SDS-Gel. Die Caspasen 3 und 6 bewirkten eine schnellere Proteolyse von Daxx, sodass nach der Inkubation nur noch die kleineren Proteolysefragmente zu detektieren waren. Die Caspasen 7 und 9 hingegen konnten Daxx nicht spalten. Bei Caspase 8 handelt es sich um eine sogenannte Initiator-Caspase, die durch extrinsische Signale (z.B. Todesrezeptoren) aktiviert wird. Diese apoptotischen Signale werden durch die proteolytische Spaltung weiterer Moleküle in der Caspase-Kaskade übertragen. Dazu gehören die Effektor-Caspasen Caspase 3, 6 und 7. Bei Caspase 9 handelt es sich um eine weitere Initiator-Caspase, die jedoch durch interne Stimuli wie Stress, DNA-Schäden etc. aktiviert wird. Die *in vitro* Experimente lassen vermuten, dass Daxx in Folge eines externen Stimulus spezifisch durch Caspasen prozessiert wird. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass ein ähnliches Experiment wie in Abb. 21 beschrieben, bei dem der intrinsische Signalweg durch Zugabe von Etoposid stimuliert wurde, nicht zu einer Spaltung von Daxx in 786-O HA-VHL führte (Daten nicht gezeigt).

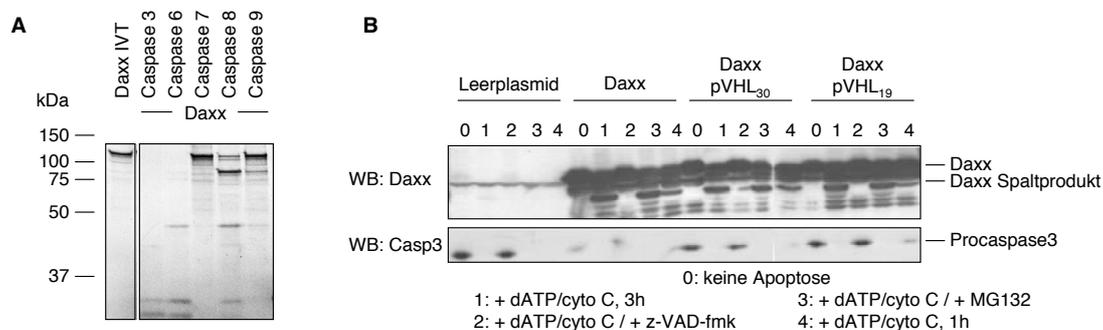


Abb. 22: Die Prozessierung von Daxx ist Caspase-abhängig. **A** *In vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes Daxx wurde mit gereinigten Caspasen inkubiert und anschließend mittels SDS-Page und Autoradiographie analysiert. Daxx wird *in vitro* von Caspase 3, 6 und 8 gespalten. **B** 293T Zellen wurden mit Plasmiden zur Expression der angegebenen Proteine transfiziert und 48h später lysiert. Die Lysate wurden 3h mit dATP/cyto C und den angegebenen Inhibitoren inkubiert und die Spaltung von Daxx durch SDS-Page und Western Blot nachgewiesen (obere Abb.). Die erfolgte Induktion der Apoptose wurde durch die Detektion der Prozessierung von Procaspase 3 nachgewiesen (untere Abb.).

Apoptose lässt sich auch in Zelllysaten durch Zugabe von dATP und Cytochrom C induzieren. 293T Zellen wurden mit Daxx alleine oder zusammen mit pVHL₁₉ oder pVHL₃₀ transfiziert. Nach Zugabe von dATP und Cytochrom C lässt sich eine Prozessierung von Daxx beobachten. Diese ist abhängig von zellulären Caspasen, nicht aber vom Proteasom, da sie durch die Zugabe von Caspase-Inhibitoren, nicht jedoch durch den Proteasom-Inhibitor MG132 verhindert werden kann. Die zusätzliche Expression von pVHL₁₉ oder pVHL₃₀ hat dabei keinen Einfluss auf die Prozessierung (Abb. 22B). Entweder ist endogenes VHL für die Prozessierung von Daxx ausreichend oder die Spaltung ist in diesem Zelltyp VHL-unabhängig.

Die Experimente mit den 786-O Zellen zeigen, dass VHL dort für die apoptotische Spaltung von Daxx benötigt wird. Da diese Spaltung nicht von der Aktivität des Proteasoms abhängt, ist es unwahrscheinlich, dass Daxx durch den VCB-Komplex ubiquityliert und durch das Proteasom endoproteolytisch gespalten wird. Vielmehr konnte klar gezeigt werden, dass Caspasen für die Prozessierung von Daxx verantwortlich sind. Die Rolle von VHL in diesem Prozess ist noch unklar. Neben einem direkten Einfluss auf apoptotische Signalwege besteht die Möglichkeit, dass VHL-negative Zellen mit der Zeit zusätzliche Mutationen akkumulieren, die Apoptose-relevante Prozesse unterbinden. HIF reguliert neben Genen, die das Tumorstadium begünstigen, auch pro-apoptotische Faktoren positiv. Dabei ist eine unterschiedliche Spezifität der beiden HIF-Isoformen HIF1 α und HIF2 α zu beobachten. Während HIF2 α vor allem die Transkription tumorigener Faktoren aktiviert, reguliert HIF1 α pro-apoptotische Gene (Raval et al., 2005). In diesem Zusammenhang stellen Klarzellkarzinomzelllinien wie 786-O möglicherweise eine Besonderheit dar, da sie nur HIF2 α exprimieren. Die durch HIF2 α regulierten Faktoren könnten in diesem Fall dominant gegenüber den HIF-unabhängig aktivierten Proteinen sein, die in der 786-O HA-VHL Zelllinie zur Apoptose führen. Die geringere Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli in den VHL-negativen 786-O Zellen wäre in diesem Fall eine indirekte Folge der Stabilisierung von HIF2 α .

3.5. Weitere durch Massenspektrometrie identifizierte VHL-Interaktoren

Ein weiterer durch Massenspektrometrie identifizierter Bindungspartner von VHL ist Tubulin (Abb. 11). Diese Interaktion wurde zunächst nicht weiter untersucht, da es sich bei Tubulin um ein ubiquitäres Protein handelt, das aufgrund seiner Abundanz häufig als Verunreinigung in massenspektroskopischen Ansätzen zu finden ist. Im Verlauf dieser Arbeit wurden jedoch Daten publiziert, die eine Interaktion zwischen VHL und Tubulin zeigen (Hergovich et al., 2003). VHL beeinflusst die Stabilität und Dynamik von Mikrotubuli. VHL-Mutationen, die dem Krankheitstyp 2B zuzuordnen sind, bewirken eine Stabilisierung von Mikrotubuli in Anwesenheit von depolymerisierenden Agenzien wie Nocodazol, während der Wildtyp und Mutanten des Krankheitstyps 2A nicht stabilisierend wirken. Welche physiologische Rolle VHL an den Mikrotubuli spielt, ist jedoch noch nicht

bekannt. Da keine Bindung von Cul2 an Mikrotubuli beobachtet wurde, fungiert VHL vermutlich nicht als Ubiquitin Ligase, sondern dient zur Rekrutierung von Faktoren an und Transport entlang der Mikrotubuli. Ein Motorprotein der Kinesin-Familie, KIF3A, wurde als Bindungspartner von VHL gefunden (W. Krek, ETH Zürich, persönliche Mitteilung). KIF3A spielt eine Rolle in der Entstehung von Zysten in der Niere, die möglicherweise eine Vorstufe vor der Tumorentstehung darstellen.

Ein weiteres durch Massenspektrometrie identifiziertes Protein war Deleted in liver cancer 1 (DLC1). DLC1 gehört zur Familie der Rho GTPase-aktivierenden Proteine (RhoGAPs). Rho GTPasen spielen eine wichtige Rolle in der Proliferation und der Assemblierung des Zytoskeletts. DLC1 und das homologe Protein der Ratte, p122, modulieren die Aktivität der GTPasen RhoA und Cdc42, nicht jedoch von Rac1 (Homma und Emori, 1995) und lokalisieren an der Spitze von „actin stress fibres“ (den „focal adhesions“) (Kawai et al., 2004). Die Deletion von DLC1 wurde in einer Reihe von Karzinomen (Nieren-, Brust-, Lungen-, Darm- und Prostatakrebs) festgestellt, und die Transfektion von DLC1 in DLC1-negative Tumorzelllinien führt zu einer Inhibition der Proliferation (Ng et al., 2000; Yuan et al., 2004). DLC1 ist also ein Tumorsuppressor und die Regulation der intrazellulären DLC1-Menge durch proteasomale Degradation könnte in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Zur Untersuchung der Bindung von VHL an DLC1 wurden 293T Zellen mit Flag-pVHL₃₀ und myc-DLC1 oder GFP-p122 transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und VHL mit anti-Flag Beads präzipitiert. Gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und durch Western Blot nachgewiesen. Es ließ sich jedoch keine Bindung von DLC1 oder p122 an pVHL₁₉ oder pVHL₃₀ nachweisen. Auch in Pulldown-Experimenten mit rekombinantem VCB-Komplex und DLC1 aus Zelllysaten konnte die Interaktion nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

In Koimmunpräzipitationsexperimenten wurden außerdem die weiteren identifizierten Proteine HBO1, PKB3 und FLJ22329 auf ihre Bindung an VHL untersucht. Während HBO1 und PKB3 nicht mit VHL interagierten, zeigte sich eine schwache Interaktion mit FLJ22329. Dieses Protein ist von *C. elegans* bis zum Mensch konserviert und die enthaltene Glykosyltransferase-Domäne weist auf eine mögliche Funktion in der extrazellulären Matrix hin. Die genaue Sequenz von FLJ22329 ist jedoch nicht bekannt. Während die zunächst veröffentlichten Eintragungen ein Protein mit einer Größe von 27 kDa beschrieben, fanden sich später auch Sequenzen von 622 Aminosäuren Länge (die errechnete Größe von 72 kDa stimmt mit der Höhe der Bande in Abb. 11 überein). Die meisten Eintragungen wurden zwischenzeitlich aus der Datenbank gelöscht. Aus diesem Grund wurde FLJ22329 nicht weiter untersucht, ebenso das uncharakterisierte Protein MGC15388 sowie GAB2.

Ein weiterer identifizierter Bindungspartner für den VCB-Komplex war die Isoform $\alpha 1$ von Kollagen VI. Kollagen enthält eine große Anzahl an Hydroxyprolin-modifizierten Seitenketten, die sich allerdings in Kollagenfibrillen und somit in einer strukturell völlig anderen Umgebung als das Hydroxyprolin von HIF1 α im LxxLAP-Motiv befinden. In Immunpräzipitationsexperimenten konnte eine spezifische Kopräzipitation für diese Isoform, nicht jedoch für Kollagen $\alpha 2(VI)$, $\alpha 3(VI)$ oder Kollagen I, II und III

gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie bei der Interaktion von VHL mit Fibronectin (Ohh et al., 1998) ist die Bedeutung der Bindung einer Komponente der extrazellulären Matrix an eine intrazellulären E3 Ligase nicht leicht verständlich. Zwar ist nicht ausgeschlossen, dass VHL mit Kollagen $\alpha 1(VI)$ während dessen intrazellulärer Reifung in Berührung kommt, genauso gut kann es sich bei der beobachteten Interaktion jedoch um ein Lyseartefakt handeln.

Da Daxx offenbar kein Substrat für den CBC^{VHL}-abhängige Ubiquitylierung ist, und für die anderen Kandidaten eine Bindung an VHL nicht bestätigt werden konnte, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine alternative experimentelle Strategie für die Suche nach „echten“ VHL-Substraten gefunden werden.

3.6. Der Mechanismus der HIF1 α -Erkennung durch VHL kann in *S. cerevisiae* rekonstituiert werden

Die oben beschriebenen Untersuchungen hatten gezeigt, dass VHL offenbar auch Protein-Interaktionen eingeht, ohne dass die Bindungspartner durch Ubiquitylierung und nachfolgende Degradation reguliert werden. Dafür sprach auch die anfängliche Beobachtung, dass die identifizierten Proteine gleichermaßen mit VHL Wildtyp und VHL Y98H interagierten. Für die weitere Fortführung dieser Arbeit wurde deshalb nach einer Strategie gesucht, die es erlaubt, potentielle VHL-Substrate von Bindungspartnern anderer Funktion zu unterscheiden. Unter der Annahme, dass der Bindungsmechanismus für andere Substrate dem für HIF1 α ähnelt, sollte speziell nach Proteinen mit der gleichen Hydroxyprolin-Modifikation gesucht werden. Zu diesem Zweck sollte ein „TwoHybrid“-Screen mit VHL unter Bedingungen durchgeführt werden, die eine effiziente Modifikation der Substrate erlauben. In einem ähnlichen experimentellen Ansatz konnten Toman et al. (2000) zeigen, dass die für die Trimerisierung von Prokollagen nötige Oxidation der Prolinseitenketten in der Hefe stattfindet, wenn man neben Kollagen auch die entsprechende Kollagenhydroxylase in Hefe exprimiert. Unter diesen Bedingungen ließ sich in *S. cerevisiae* funktionales, korrekt trimerisiertes Prokollagen rekombinant herstellen. Dies zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, ein Hydroxylierungssystem in Hefe zu rekonstituieren.

Zu Beginn der Arbeit wurde der Ansatz zunächst verworfen, mithilfe von „TwoHybrid“-Banken nach VHL-Substraten zu suchen, da die Modifikation des Prolinrestes für eine spezifische Interaktion im Falle von HIF1 α zwingend erforderlich ist. In mehreren solcher Screens anderer Arbeitsgruppen wurde HIF1 α als VHL-Interaktor nie gefunden (Li et al., 2003; Zhou et al., 2002). Zum damaligen Zeitpunkt waren die entsprechenden Prolylhydroxylasen noch nicht identifiziert. Es lag nahe zu vermuten, dass in Hefe keine Homologe vorhanden sind, da auch HIF1 α nicht konserviert ist und sauerstoffabhängige Regulationsmechanismen in einem einzelligen Organismus vermutlich nach anderen Prinzipien funktionieren als im Menschen. Mit zunehmendem Verständnis der ablaufenden Reaktionen und der Identifizierung der beteiligten Prolylhydroxylasen bot sich jedoch eine Möglichkeit, einen

entsprechend „funktionalisierten“ Hefe-„TwoHybrid“-Screen mit VHL durchzuführen. Um VHL in seiner nativen, substraterkennenden Konformation in Hefe zu stabilisieren, sollten zusätzlich Elongin B und Elongin C exprimiert werden, da in *S. cerevisiae* nur Elongin C (Elc1) konserviert ist, das dort jedoch keinen Ubiquitin Ligase Komplex bildet, da VHL und Elongin B in der Hefe nicht vorkommen. Als genetischer Hintergrund wurde deshalb ein Stamm von Pause et al. (1999) verwendet, bei dem Elongin B/C unter Regulation des konstitutiven PGK-Promotors stabil in den *ade2-101* locus integriert wurden (CG1945BC). Der entsprechende Kontrollstamm (CG1945) ohne Integration bleibt auxotroph für Adenin. Als „Köder“ wurde pVHL₁₉ als C-terminale Fusion an die DNA Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 (GalBD) von dem Vektor pBridge (Clontech) exprimiert. Dieser Vektor ermöglicht zum einen die konstitutive Expression (P_{ADH}) des Fusionsproteins, als auch die Expression eines weiteren Proteins unter einem reprimierbaren Promotor (P_{MET25}). Die Zugabe von Methionin ins Wachstumsmedium führt zu einer Repression des MET25 Promotors. Die Prolylhydroxylasen PHD1 oder PHD3 wurden unter Regulation dieses Promotors gestellt, um auf einfache Weise die PHD-Abhängigkeit der „TwoHybrid“-Interaktion zu untersuchen. Für den Screen sollte eine cDNA-Bank aus humanem Hoden (Clontech) verwendet werden, da in diesem Gewebe eine Vielzahl von Genen exprimiert wird, was zu einer relativ hohen Abundanz der entsprechenden cDNA in der Genbank führt. Die cDNA-Bank wurde so in den Vektor pACT2 (Clontech) kloniert, dass die „Beute“-Proteine als N-terminale Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (GalAD) und einem HA-Tag zur besseren Detektion exprimiert werden. Eine Interaktion kann durch die Aktivierung zweier Reportergene, HIS3 und β -Galaktosidase, detektiert werden, die unter Kontrolle des GAL1-Promotors stehen. Die Prolylhydroxylasen sollten mit den in der Hefe ausreichend vorhandenen Kofaktoren Fe(II), 2-Oxoglutarat, Ascorbat und molekularem Sauerstoff in der Lage sein, Substrate so zu modifizieren (Abb. 23A), dass eine Interaktion mit VHL ermöglicht wird.

Die Vortests wurden mit Vollängen HIF1 α oder der C-terminalen ODD-Domäne durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden auf Selektionsmedium ohne Histidin plattiert und das Wachstum nach 3 Tagen protokolliert. Dabei zeigten sowohl HIF1 α als auch die isolierte ODD-Domäne eine leichte Autoaktivierung, die sich jedoch durch Zugabe von 5mM 3-Aminotriazol (3-AT) zum Selektionsmedium fast vollständig unterdrücken ließ. In diesem Fall konnte eine Interaktion mit VHL beobachtet werden, die von der Anwesenheit von PHDs abhängig war. PHD1 und 3 waren gleichermaßen geeignet, HIF1 α zu modifizieren. In Anwesenheit von PHD1 zeigte sich auch eine Interaktion mit der isolierten ODDD, nicht jedoch mit PHD3. Als Kontrolle diente GalAD-Cullin2, dessen Interaktion mit VHL unabhängig von der Expression von Prolylhydroxylasen war, nicht jedoch von der Anwesenheit von Elongin B/C, wie durch Transformation in den Kontrollstamm CG1945 gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

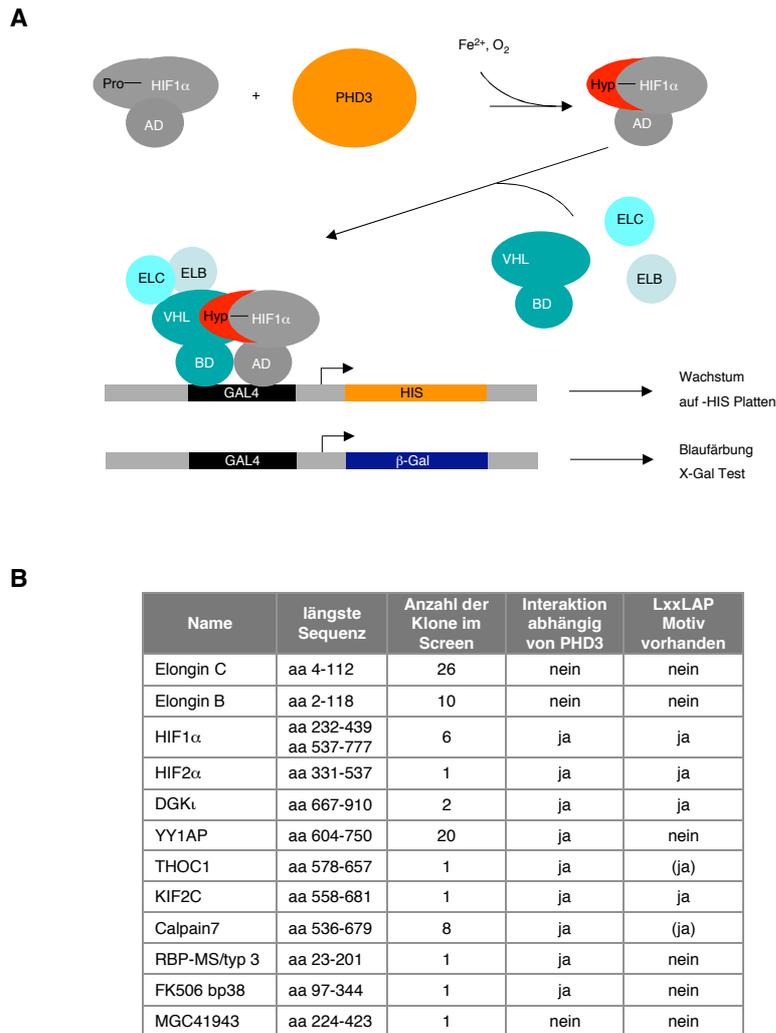


Abb. 23: Prinzip und Ergebnisse des funktionalisierten „TwoHybrid“-Screens. **A** Durch gleichzeitige Koexpression von PHD3 und Elongin B/C lässt sich eine Interaktion von VHL und HIF1 α durch die Aktivierung zweier Reportergene (HIS3 und β -Galaktosidase) detektieren. **B** Tabellarische Übersicht über die gefundenen Bindepartner von pVHL₁₉. Einige der gefundenen Interaktoren besitzen ein potenzielles Erkennungsmotiv für Prolylhydroxylasen. Ein eingeklammertes Ja bedeutet ein von LxxLAP abweichendes Motiv, das dennoch durch Prolylhydroxylasen erkannt werden kann (Li et al., 2004).

Für die Durchführung des Screens wurde PHD3 als Hydroxylase ausgewählt, da sie als einzige sowohl im Zytosol als auch Zellkern lokalisiert (Metzen et al., 2003) und die kleinste der PHDs ist, was möglicherweise zu einer besseren Expression in Hefe führt und das Risiko einer nicht-nativen Konformation verringert. Es wurden ca. $1,5 \times 10^7$ Transformanten auf Selektionsplatten SC-Leu-Trp-His-Met mit 5mM 3-AT plattiert und bei 30°C inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Kolonien auf SC-Leu-Trp-His-Met mit 25mM 3-AT replikaplattiert und weitere fünf Tage inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden einem β -Galaktosidase-Filterlift-Assay unterzogen, bei dem alle Kolonien verworfen wurden, die keine deutliche Blaufärbung aufwiesen. Die aus den positiven Kolonien isolierten Plasmide wurden sequenziert und

leere Plasmide oder Plasmide mit Leserasterverschiebung aussortiert. Durch Retransformation ohne VHL-„Köder“ wurden autoaktivierende GalAD-Fusionen eliminiert. Die verbliebenen Kandidaten wurden durch Retransformation in CG1945 und CG1945BC, mit oder ohne Anwesenheit von PHD3, auf die Abhängigkeit der Interaktion von PHDs und einem nativen VCB-Komplex getestet (Abb. 23B). Unter den gefundenen Interaktoren befanden sich sowohl die bekannten VHL-Interaktoren, Elongin B und C, als auch die bekannten Substrate HIF1 α und HIF2 α . Diese erwarteten Treffer bestätigen eindrucksvoll die Validität des experimentellen Ansatzes. Für die beiden HIF-Isoformen wurden jeweils Proteinfragmente gefunden, die eine der beiden ODD-Domänen enthielten. Von den neu identifizierten Proteinen hatten mehrere das bekannte LxxLAP Motiv oder verwandte Sequenzen, was ein Hinweis auf eine ähnliche Regulation wie im Falle von HIF sein könnte.

3.7. Charakterisierung der gefundenen VHL-Bindepartner

Die Proteine mit LxxLAP- oder verwandtem Motiv (DGK ι , Calpn7, KIF2C und THOC1) und YY1AP als der am häufigsten gefundene VHL-Interaktor wurden näher untersucht. Dazu wurden zunächst „TwoHybrid“-Konstrukte mit der Vollängensequenz hergestellt. Die cDNA für DGK ι , Calpn7, THOC1 und YY1AP wurde durch RT-PCR aus Jurkat mRNA kloniert und durch Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft; die cDNA für KIF2C wurde aus einem bakteriellen Expressionsvektor (T. Mayer, MPI für Biochemie) subkloniert. Für die Interaktionsstudien wurde das für den Screen benutzte System verwendet (vgl. 3.6.). Als Positiv-Kontrolle dienten die aus dem Screen isolierten Originalklone (DGK ι 667-910, Calpn7 536-679, YY1AP 604-750), deren Interaktion mit pVHL₁₉ sowohl von PHD3 als auch von Elongin B/C abhängig war (Abb. 24A rechts).

Es konnte keine Bindung von Vollängen YY1AP (Abb. 24A) oder THOC1 (Abb. 24B) an pVHL beobachtet werden. Aufgrund ihrer Größe liegen die Proteine möglicherweise nicht in ihrer nativen Konformation vor, so dass zwar eine Bindung mit einer isolierten Domäne, jedoch nicht mit dem Vollängenprotein beobachtet werden konnte.

Calpn7, DGK ι und KIF2C hingegen interagierten spezifisch mit pVHL, ebenso wie die Positivkontrolle HIF1 α . Diese Bindung konnte für alle drei Kandidaten nur in dem Elongin B/C-exprimierenden Stammhintergrund beobachtet werden (vgl. jeweils CG1945 und CG1945BC), d.h. sie ist vermutlich von der VCB-Konformation von VHL abhängig. In Abb. 24A ist eine starke Bindung von Calpn7 an pVHL₁₉ in Anwesenheit von PHD3 zu erkennen. Aus Abb. 24B links wird deutlich, dass Calpn7 auch mit pVHL₃₀ interagiert. Das Wachstum der Kolonien variierte leicht von Experiment zu Experiment, auch wurden die Platten in Abb. 24A einen Tag länger bei 30°C inkubiert als in Abb. 24B. DGK ι zeigt eine schwache, PHD3-abhängige Interaktion mit der kurzen Isoform von pVHL (Abb. 24B), die nach einer Inkubation von vier Tagen deutlich wurde (unterste Reihe). In einem Fall wurde auch eine PHD3-unabhängige Bindung an pVHL₁₉ beobachtet (Abb. 24A), die jedoch nicht reproduziert werden konnte. Das Wachstum ist

vermutlich auf eine Mutation in dem für den Test ausgewählten Einzelklon zurückzuführen. Vollängen KIF2C interagiert sowohl mit pVHL₁₉ als auch mit pVHL₃₀ in Abhängigkeit von PHD3 (Abb. 24B). Die Bindung der Vollängen Proteine an VHL ist mit Ausnahme von Calpn7 nur schwach, so dass für die Selektion im Gegensatz zu den Bedingungen im Screen kein 3-AT verwendet werden konnte. Unter diesen Bedingungen zeigt sich auch eine PHD3-abhängige Interaktion von HIF1 α mit pVHL₁₉ ohne Elongin B/C (s. Stamm CG1945 in Abb. 24A und B). Die grundsätzlich schlechtere Interaktion der Vollängenkonstrukte gegenüber den isolierten Klonen liegt vermutlich in der geringeren Expression der großen Proteine in *S. cerevisiae* begründet.

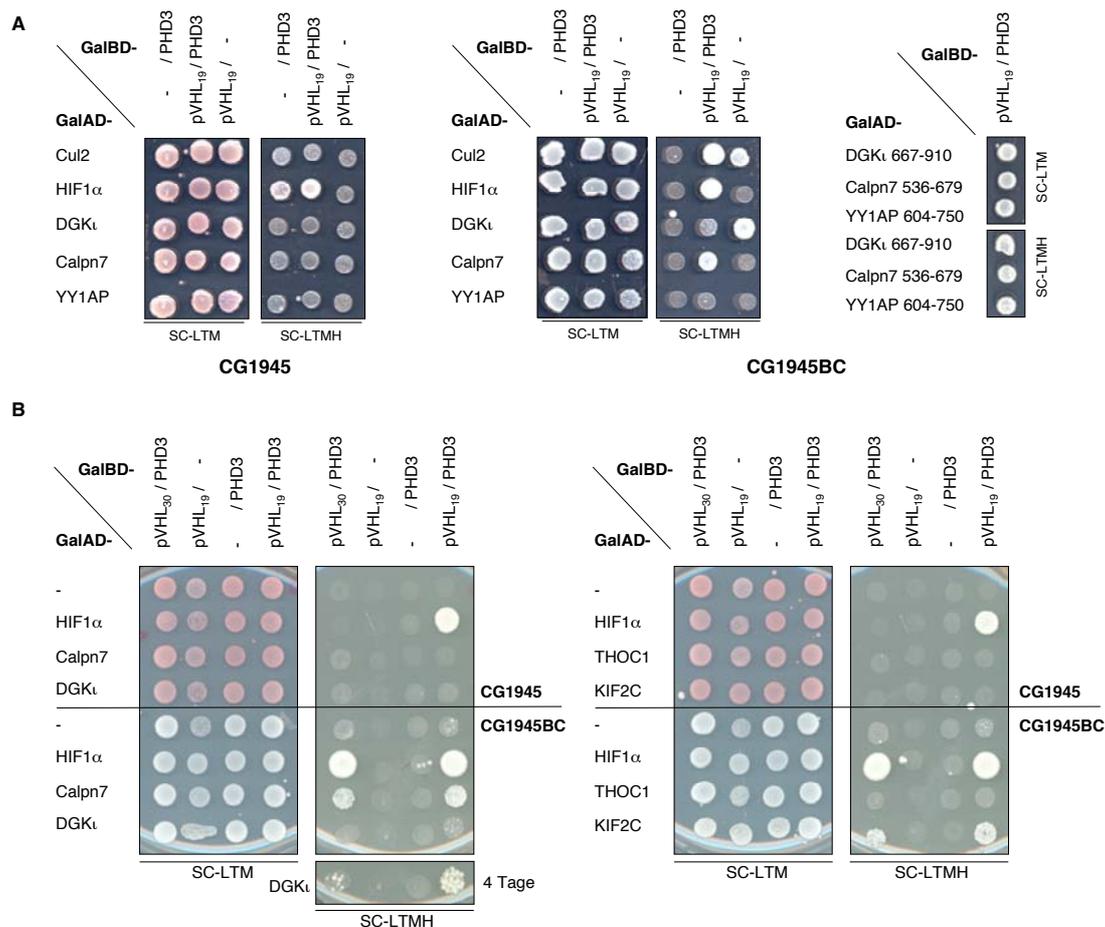


Abb. 24: „TwoHybrid“ Interaktion mit Vollängen Proteinen. Die angegebenen GalAD- und GalBD-Fusionsproteine wurden in dem Stammhintergrund ohne (CG1945) und mit konstitutiver Expression von Elongin B/C (CG1945BC) exprimiert. Als Positivkontrolle diente Cul2 (Bindung abhängig von Elongin B/C) und HIF1 α (Bindung abhängig von PHD3). **A** DGK ι , Calpn7 und YY1AP wurden zusammen mit pVHL₁₉ und/oder PHD3 untersucht. Links: Stammhintergrund ohne Elongin B/C, Mitte und rechts: mit Elongin B/C. Einige der aus dem Screen isolierten Klone wurden als zusätzliche Kontrolle gegen GalBD-pVHL₁₉ in Anwesenheit von PHD3 getestet (rechts). Die Selektionsplatten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert. **B** DGK ι , Calpn7, THOC1 und KIF2C wurden zusammen mit pVHL₁₉ oder pVHL₃₀ untersucht. Die Platten wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert, im Falle von DGK ι vier Tage. SC-LTM Selektionsmedium ohne Leucin, Tryptophan und Methionin; SC-LTMH wie SC-LTM ohne Histidin.

Als nächstes wurde die Bindung von DGK ι , Calpn7 und YY1AP an den rekombinanten VCB-Komplex untersucht. Dazu wurden die Vollängen Sequenzen in den pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen) kloniert und die Proteine in Anwesenheit von ^{35}S -markiertem Methionin *in vitro* translatiert. Als Positivkontrolle diente HIF1 α . Das Retikulozytenlysate, das in der *in vitro* Translation verwendet wurde, enthält eine Prolylhydroxylaseaktivität, durch die HIF1 α modifiziert wird und somit an VHL binden kann. Im Falle von HIF1 α führte die Zugabe von Eisen(II)chlorid zur *in vitro* Translation oder die Inkubation des *in vitro* Translatates mit rekombinanter PHD und Kofaktoren zu einer verstärkten Bindung an VHL, wobei die endogene Hydroxylierungsaktivität des Retikulozytenlysats in der Regel ausreichend ist. Die translatierten Proteine wurden mit rekombinatem GST oder GST-VCB Komplex und Glutathion Sepharose inkubiert. Nach der Elution wurden die Proben mit SDS-Page und Autoradiographie untersucht. Keines der potentiellen VHL-Substrate aus dem Screen konnte unter diesen Bedingungen an den VCB-Komplex binden. Hingegen war eine deutliche Interaktion von HIF1 α mit GST-VCB, nicht jedoch mit GST zu beobachten. Für KIF2C wurde der Pulldown mit rekombinatem KIF2C (T. Mayer, MPI für Biochemie) durchgeführt. Auch hier konnte keine Interaktion mit dem gereinigten VCB-Komplex beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

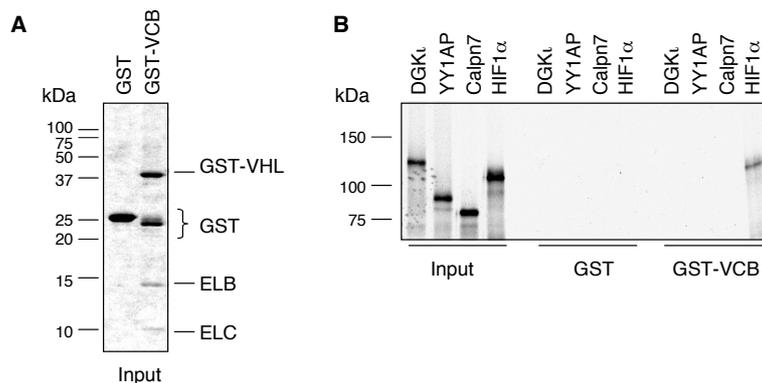


Abb. 25: Pulldown mit rekombinatem VCB-Komplex. *In vitro* translatierte, radioaktiv markierte Proteine wurden mit 10 μg GST alleine oder Wildtyp GST-VCB Komplex inkubiert. Proteinkomplexe wurde mit 20 μl Glutathion Sepharose präzipitiert und durch SDS-Page und Autoradiographie analysiert. Nur mit HIF1 α war eine Bindung an den VCB-Komplex zu beobachten. **A** Coomassie-Färbung des präzipitierten GST oder GST-VCB. **B** Autoradiogramm

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass eine für eine effiziente Bindung wichtige post-translationale Modifikation der Substrate, von VHL oder PHD3, bzw. ein weiterer Bindungspartner benötigt werden, die in diesem experimentellen Ansatz fehlen. Möglicherweise kann die Hydroxylierung durch PHD3 in der *in vitro* Translation nicht erfolgen. Jedoch führte weder die Zugabe von Eisen(II)chlorid zur *in vitro* Translation, noch die Inkubation des *in vitro* Translatates mit rekombinanter PHD und Kofaktoren zu einer Bindung an

GST-VCB (Daten nicht gezeigt). Deshalb sollte im Weiteren die Interaktion der potentiellen Substrate mit VHL in humanen Zellen untersucht werden.

3.8. Diacylglycerolkinase iota (DGK_i)

Die Diacylglycerolkinase iota (DGK_i) gehört zur einer Familie von Kinasen, die die Umwandlung von Diacylglycerol (DAG) zu Phosphatidsäure (PA) katalysieren. Diacylglycerol spielt eine zentrale Rolle sowohl in der Synthese von Triacylglyceriden als auch in der intrazellulären Signaltransduktion. In diesem Zusammenhang wirkt DAG als allosterischer Aktivator von Serin/Threonin Kinasen der Protein Kinase C (PKC) Familie, indem es reversibel an die konservierte C1-Domäne der Kinase bindet. Umgekehrt beeinflussen PKCs die Lokalisation und Aktivität von DGKs durch Phosphorylierung. Die zelluläre DAG-Konzentration steigt als Reaktion auf verschiedene externe Stimuli, z.B. Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter, rasch an und führt zu einer schnellen PKC Aktivierung. DGKs regulieren das DAG-Niveau durch die Umwandlung in PA und haben somit Einfluss auf die Dauer des PKC Signals. Auch PA fungiert als „second messenger“ und reguliert z.B. die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren oder die cAMP Produktion. Die Umwandlung von DAG in PA durch DGKs ist deshalb ein streng regulierter Prozess. Eine langanhaltende PKC Aktivierung, die z.B. durch konstitutive Bindung von Phorbolestern an die DAG Bindestelle erreicht wird, führt zur Transformation der Zelle.

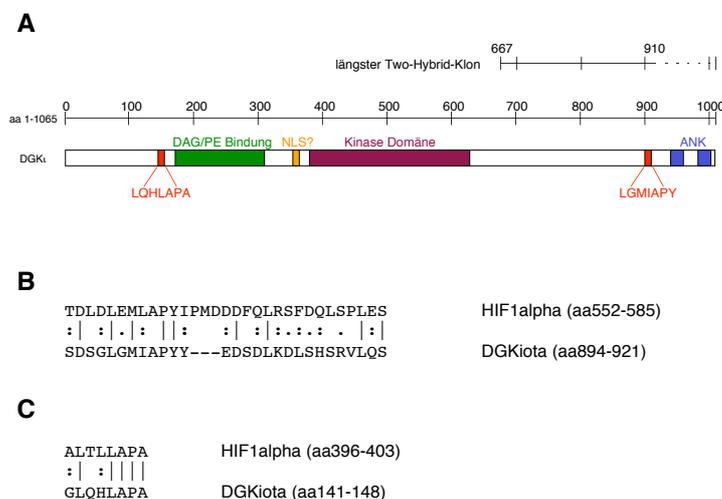


Abb. 26: Domänenstruktur von DGK_i. **A** Anhand von Sequenzhomologien lassen sich für DGK_i eine potentielle Diacylglycerol und Phorbolster (DAG/PE)-Bindedomäne, ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS), eine Kinase-Domäne und zwei c-terminale Ankyrin Repeats (ANK) vorhersagen. DGK_i zeigt genau wie HIF1 α zwei Erkennungsmotive für die Hydroxylierung durch Prolylhydroxylasen. Der längste im Screen gefundene Klon kodiert den C-Terminus von DGK_i einschließlich des LxxIAP-Motivs. **B** Das für die Erkennung wichtige Leucin ist konserviert, ebenso ein Abschnitt saurer Aminosäurereste c-terminal von Prolin903 (Prolin564 in HIF1 α). **C** Die Konservierung im N-Terminus beschränkt sich auf das LxxLAP-Motiv.

Neben PKCs werden auch andere Proteine mit C1-Domäne von DAG reguliert, wie z.B. Protein Kinase D oder Mitglieder der RhoGAP Familie. Dies unterstreicht die Bedeutung der Regulation der zellulären DAG-Konzentration.

DGK ι ist von besonderem Interesse, da diese Isoform in Retina und Gehirn exprimiert wird (Ding et al., 1998). Dabei handelt es sich um Gewebe, in denen bei VHL-Patienten vermehrt Hämangioblastome auftreten. Zudem verfügt DGK ι über zwei putative Erkennungsmotive für Prolylhydroxylasen, von denen eines starke Homologie zu der entsprechenden Sequenz in der C-terminalen ODDD von HIF1 α aufweist, während das andere mehr dem Motiv in der N-terminalen ODDD entspricht (Abb. 26). Neben DGK ι verfügt einzig das verwandte DKG ζ über ein N-terminales LxxLAP-Motiv, die anderen Mitglieder der Diacylglycerol Kinasen zeigen in diesem Bereich nur geringe Homologie.

3.8.1. DGK ι interagiert mit VHL und Prolylhydroxylasen

Das Hefe-„TwoHybrid“-System ermöglicht eine empfindliche Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Allerdings kommt es in diesem System auch häufig zu falsch positiven Ergebnissen, was auf die nicht-physiologischen Expressionsbedingungen zurückzuführen ist. Zum einen werden die Fusionsproteine meist stark überexprimiert. Durch das Fehlen von Bindungspartnern kann es zu einer partiellen oder vollständigen Entfaltung der Proteine kommen. Dieses Problem wird noch verstärkt, wenn die untersuchten Proteine aus einem anderen Organismus stammen und möglicherweise wichtige post-translationale Modifikationen in der Hefe nicht erfolgen können. Häufig beobachtet man deshalb Interaktionen mit Chaperonen. Da die DNA-Sequenzen für die Fusionsproteine aus einer cDNA stammen, werden von größeren Proteinen meist nur Proteinfragmente exprimiert, die unspezifische Bindungen eingehen können. Außerdem führt die Fusion mit Teilen des Gal4-Transkriptionsfaktors zu einer Kolo-kalisation auch solcher Proteine im Zellkern, die unter normalen Bindungen nicht im gleichen zellulären Kompartiment vorliegen. Aus diesem Grund sollte die Interaktion von DGK ι mit VHL in weiteren Experimenten verifiziert werden.

Zunächst sollte die Interaktion durch Koimmunpräzipitation bestätigt werden. Dazu wurden HA-DGK ι und Flag-pVHL $_{19}$ oder Flag-pVHL $_{30}$ in 293T Zellen überexprimiert und mit einem Flag- bzw. HA-Antikörper immunpräzipitiert. Durch Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass DGK ι an beide VHL-Isoformen bindet (Abb 27A). DGK ι interagierte dabei stärker mit pVHL $_{30}$. Die Koimmunpräzipitation von DGK ι und pVHL $_{19}$ war nur in einer Richtung möglich. Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Bindung an VHL von der Modifikation eines der Erkennungsmotive in DGK ι abhängig ist. Dazu wurden die Immunpräzipitation mit Flag-pVHL $_{30}$ in Anwesenheit eines ca. 350fachen Überschusses (unter der Annahme, dass der Anteil an Flag-pVHL $_{30}$ etwa 1% des Gesamtproteingehalts der Zelle entspricht) an einem hydroxyprolinmodifizierten Peptid (abgeleitet aus der Sequenz der C-terminalen ODD Domäne von HIF1 α) durchgeführt

(Abb. 27B). Als Kontrolle diente das unmodifizierte HIF-Peptid. In einem weiteren Ansatz wurde die HIF-ODD Domäne zusammen mit DGK ι und pVHL₃₀ in 293T Zellen überexprimiert. Weder das Peptid noch die Proteindomäne konnten mit DGK ι um die Bindung an pVHL₃₀ kompetieren (Ivan et al., 2001; Maranchie et al., 2002). Auch die Zugabe von Kobaltchlorid, einem Inhibitor der Prolylhydroxylasen, konnte die Interaktion nicht inhibieren. Diese Beobachtung macht eine Hydroxyprolin-vermittelte Bindung von DGK ι an VHL unwahrscheinlich.

In einem weiteren Experiment wurden zusätzlich die entsprechenden Proline durch gezielte Mutagenese einzeln oder zusammen durch Alanin ersetzt. Nach Koexpression in 293T Zellen mit Flag-getagtem pVHL₃₀ oder Socs1 als Negativkontrolle wurde HA-DGK ι aus Zelllysaten mit einem monoklonalen HA-Antikörper immunpräzipitiert und die gebundenen Proteine nach SDS-Gelelektrophorese im Western Blot untersucht. Abb. 27C zeigt, dass die Wechselwirkung zwischen VHL und DGK ι unabhängig von den Prolinresten P147 und P903 ist. Sowohl die Einzel- als auch die Doppelmutanten banden genauso gut an VHL wie der Wildtyp. Das beobachtete schwächere Signal für pVHL₃₀ nach der Koimmunpräzipitation mit DGK ι P903A ist vermutlich auf ein Blotting-Artefakt zurückzuführen. Die Bindung von DGK ι an VHL ist spezifisch, da Socs1 nicht gebunden wurde.

Der bekannte VHL-Interaktor PKC ζ bindet über seine C1-Domäne an VHL. Diese Domäne zeigt große Homologie zu den zwei Cystein-reichen Bereichen in DGK ι , die möglicherweise eine DAG-Bindestelle darstellen. Um zu untersuchen, ob DGK ι ähnlich wie atypische PKCs an VHL bindet, wurde diese Domäne (Aminosäure 138 bis 317) deletiert. Die Deletionsmutante DGK ι Δ C1 wurde zusammen mit pVHL₃₀ in 293T Zellen exprimiert und das oben beschriebene Experiment durchgeführt. Die Deletion der DAG/PE-Bindedomäne beeinträchtigte die Bindung an pVHL₃₀ nicht (Abb. 27C), allerdings führt die Deletion zu einer Destabilisierung von DGK ι *in vivo*, wie die niedrigen Mengen des Proteins im Gleichgewicht zeigten. In Folge dessen wurden nur geringe Mengen pVHL₃₀ koimmunpräzipitiert.

Durch Northern Blot Analyse wurde gezeigt, dass DGK ι ausschließlich in der Retina und im Gehirn exprimiert wird (Ding et al., 1998). Das homologe DGK ζ kommt in der Glioblastomezelllinie A172 vor. Mittels RT-PCR mit spezifischen Primern konnte DGK ι mRNA in A172 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurden sowohl die retinale Zelllinie ARPE-19, als auch A172 im Western Blot untersucht. Während endogenes VHL in A172 detektiert werden konnte, war es nicht möglich, nach der Herstellung zweier polyklonaler Antikörper, die in 293T Zellen überexprimiertes DGK ι mit hoher Spezifität und Sensitivität erkennen, endogenes DGK ι im Lysat eindeutig zu identifizieren. Auch mit einem weiteren, bereits publizierten Antikörper konnte bisher kein endogenes DGK ι detektiert werden (Regier et al., 2005). Die Evaluierung der Interaktion zwischen endogenem DGK ι und VHL war so leider nicht möglich.

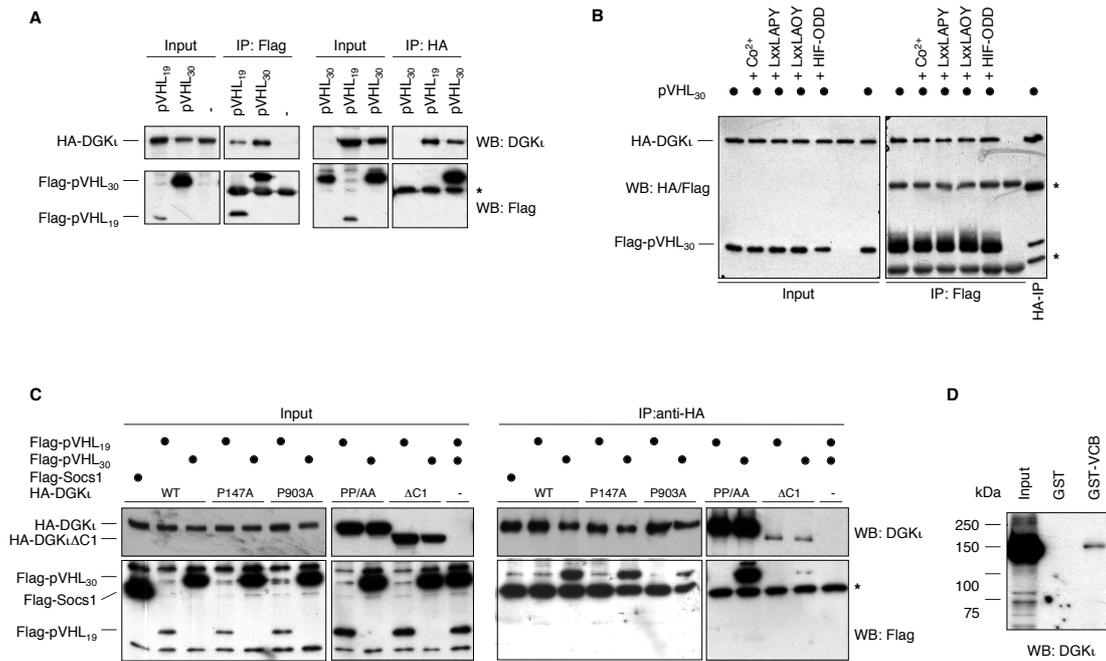


Abb. 27: DGK ι aus 293T Zellen bindet an VHL. **A** Ha-DGK ι wurde zusammen mit Flag-pVHL $_{19}$, Flag-pVHL $_{30}$ oder Flag-SOCS1 in 293T Zellen exprimiert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Epitop-markierten Proteine mit 35 μ l Flag-M2 Beads oder 6 μ l anti-HA Antikörper/50 μ l ProteinA-Sepharose präzipitiert. **B** Ha-DGK ι wurde zusammen mit Flag-pVHL $_{30}$ in 293T Zellen exprimiert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Epitop-markierten Proteine mit 35 μ l Flag-M2 Beads oder 6 μ l anti-HA Antikörper/50 μ l ProteinA-Sepharose präzipitiert. Wenn angegeben, wurden 100 μ M Kobaltchlorid oder 800 μ M Peptid zugegeben, bzw. die GFP-HIF-ODD Domäne koexprimiert. Gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und im Western Blot analysiert. Sterne markieren die Leicht- und Schwerkette des jeweiligen Antikörpers. **C** HA-DGK ι Wildtyp oder die angegebenen Mutanten wurde zusammen mit Flag-pVHL $_{19}$, Flag-pVHL $_{30}$ oder Flag-SOCS1 in 293T Zellen exprimiert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Epitop-markierten Proteine 6 μ l anti-HA Antikörper/50 μ l ProteinA-Sepharose präzipitiert. **D** HA-DGK ι wurde in 293T Zellen exprimiert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat mit 10 μ g GST oder GST-VCB Komplex und 50 μ L Glutathion-Sepharose inkubiert. **A-D** Gebundene Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer eluiert und im Western Blot analysiert. Sterne markieren die Leicht- und Schwerkette des jeweiligen Antikörpers. WT Wildtyp, PP/AA P147A/P903A, Δ C1 DGK ι Δ 138-317, LxxLAPY nicht-hydroxyliertes Peptid, LxxLAOY hydroxyliertes Peptid.

In einem weiteren Schritt wurde ein GST-VCB Pulldown wie unter 3.8. beschrieben mit Lysaten aus 293T Zellen durchgeführt, die HA-DGK ι überexprimieren. Während sich in dem reinen *in vitro* System keine Interaktion mit dem rekombinanten VCB-Komplex beobachten ließ, band aus 293T Zellen stammendes DGK ι in geringem Maße spezifisch an den GST-VCB Komplex, nicht jedoch an GST alleine (Abb. 27D).

Diese Ergebnisse, zusammen mit den „TwoHybrid“-Daten, zeigen deutlich, dass DGK ι mit beiden VHL-Isoformen interagiert. Die Interaktion mit dem GST-VCB Komplex und die Elongin B/C-Abhängigkeit der Bindung im „TwoHybrid“-System lassen vermuten, dass VHL dabei in der VCB-Konformation vorliegt. Obwohl die Interaktion in der Hefe von der

Anwesenheit von PHD3 abhängig ist, legen die Mutationsanalyse und das Konkurrenzexperiment nahe, dass DGK ι kein Substrat für PHD3 ist, da eine Modifikation eines anderen Prolinrestes in DGK ι unwahrscheinlich ist.

Diese Möglichkeit konnte nach der „TwoHybrid“-Analyse nicht ausgeschlossen werden. Vielleicht vermittelt PHD3 die Interaktion durch gleichzeitiges Binden an VHL und DGK ι , ohne dass VHL und DGK ι direkten Kontakt haben. In den oben beschriebenen Koimmunpräzipitationsexperimenten wurde PHD3 jedoch nicht überexprimiert und es ist fraglich, ob die Anwesenheit endogener PHDs ausreichend zur Vermittlung der Interaktion ist. Dennoch könnte PHD3 ein Bindungspartner von VHL und DGK ι sein, der in Hefe ihre funktionale Konformation stabilisiert, ohne die sich keine Interaktion beobachten lässt. In Säugerzellen könnte diese Funktion überflüssig sein, da die Proteine trotz Überexpression richtig gefaltet vorliegen können. Deshalb wurde eine Koimmunpräzipitation von myc-getaggten PHDs mit HA-getaggttem DGK ι durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass DGK ι sowohl mit PHD3 als auch in geringerem Umfang mit PHD2 interagiert (Abb. 28). Aufgrund der geringen Expression von PHD1 in 293T Zellen konnte dessen Interaktion mit DGK ι nicht untersucht werden.

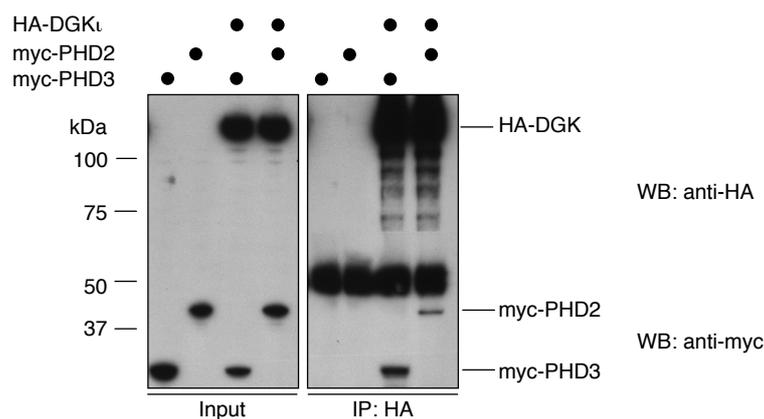


Abb. 28: DGK ι bindet an PHD2 und PHD3. 293T Zellen wurden mit 6,5 μ g pCMV-HA DGK ι , 6,5 μ g pCMV-HA, 10 μ g pcDNA3.1 PHD2 oder 15 μ g pcDNA3.1 PHD3 transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und gleiche Proteinmengen mit 10 μ l anti-HA Antikörper und 35 μ l ProteinA-Sepharose über Nacht inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch Western Blot detektiert.

Das Experiment wurde unter ähnlichen Bedingungen für VHL wiederholt. Dazu wurde HA-getaggttes pVHL $_{19}$ zusammen mit myc-PHD3 in 293T Zellen exprimiert und die Immunpräzipitation sowohl mit anti-Flag als auch mit anti-HA Antikörpern durchgeführt. pVHL $_{19}$ band ebenfalls an PHD3, nicht jedoch an die Negativkontrolle Luziferase. Diese interessante Beobachtung könnte die Hypothese unterstützen, dass die direkte Bindung von VHL an PHD3 die Modifikation von HIF1 α und den nachfolgenden Abbau beschleunigen kann. Unterschiede in der Degradation von HIF1 α bei verschiedenen, krankheitsrelevanten VHL Mutanten könnten mit einer verminderten Bindung an PHD

assoziiert sein. In diesem Experiment wurden deshalb verschiedene Punktmutanten von VHL getestet, die den Krankheitstypen 2A (Y98H), 2B (Y98N) und Typ 1 (C162F) entsprechen. Alle Mutanten können PHD3 binden (Abb. 29). Für die Mutanten des Typs 2A und 2B ist dies nicht unerwartet, da diese Mutationen die Struktur von VHL nicht beeinflussen und direkt in der HIF1 α Bindestelle liegen. Es ist unwahrscheinlich, dass in einem ternären Komplex aus VHL, PHD3 und Substrat die Prolylhydroxylase und z.B. HIF1 α an die gleiche Stelle binden. Die Mutante C162F kann keinen VCB-Komplex bilden. Die Interaktion mit PHD3 ist somit unabhängig von der Assemblierung des Ubiquitin Ligase Komplexes. Es ist deshalb unklar, ob PHD3 mit VHL in dessen VCB-Konformation interagiert.

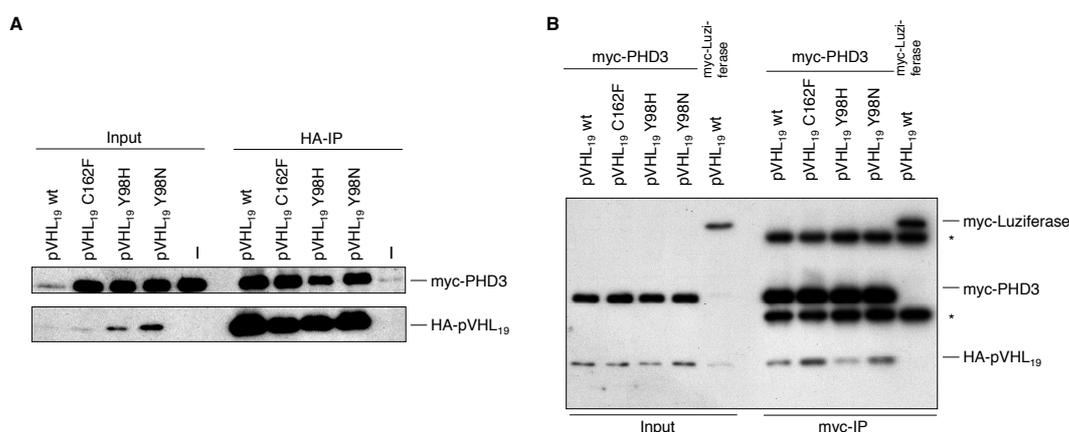


Abb. 29: pVHL₁₉ bindet an PHD3. Myc-PHD3 und verschiedene HA-getaggte VHL Konstrukte wurden in 293T Zellen transfiziert und die entsprechenden Proteinkomplexe durch Immunpräzipitation aus Lysaten isoliert. **A** Wildtyp VHL und drei tumorrelevante Mutanten wurden mit einem Anti-HA Antikörper präzipitiert. Gebundenes PHD3 wurde durch einen Western Blot gegen das myc-Epitop nachgewiesen. Trotz der unterschiedlichen Mengen an überexprimierten VHL Mutanten (Input) wurden vergleichbare Mengen HA-VHL präzipitiert. **B** Myc-getaggttes PHD3 oder eine Luziferase-Kontrolle wurden durch Anti-myc Antikörper präzipitiert und gebundenes VHL durch HA-Western Blot nachgewiesen. Sterne markieren die Leicht- und Schwereketten des jeweiligen Antikörpers.

3.8.2. DGK ι wird *in vivo* ubiquityliert

Obwohl nicht gezeigt werden konnte, dass DGK ι nach dem gleichen Erkennungsmechanismus an VHL bindet wie HIF1 α , sollte dennoch die Rolle von VHL in der Ubiquitin-abhängigen Degradation von DGK ι untersucht werden. Dazu wurde zum einen der unter 3.4.2 beschriebene *in vivo* Ansatz verwendet. 293T Zellen wurden mit Plasmiden zur Expression der angegebenen Proteine transfiziert. Vor der Lyse wurden die Zellen 3,5h mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert, um Ubiquitinkonjugate anzureichern. Wenn angegeben, wurde zusätzlich die Prolylhydroxylase-Aktivität durch Zugabe von Kobaltchlorid ins Medium inhibiert. Nach einer denaturierenden Lyse wurden die Ubiquitinkonjugate durch Affinitätsreinigung mit Ni-NTA Agarose aufgereinigt und ubiquityliertes DGK ι durch Western Blot

nachgewiesen. DGK ι wurde *in vivo* ubiquityliert (Abb. 30). Die potentiellen Erkennungsmotive für die Hydroxylierung spielen keine Rolle für die Ubiquitylierung, da eine Mutation der kritischen Prolinseitenketten keine Auswirkung auf die Ubiquitin-Konjugation hat (Abb. 30, Spuren 4, 7, 8). Weder die Zugabe von Kobaltchlorid (Spur 3) noch die Überexpression von pVHL₃₀ und PHD3 (Spuren 6,7) hatte einen Einfluss auf die Stärke der Ubiquitylierung. Würde der Abbau von DGK ι nach dem gleichen Mechanismus reguliert wie der von HIF1 α , würde man im ersten Fall eine Abnahme, im letzten Fall ein Zunahme der Ubiquitinkonjugate erwarten. Auch die Deletion der C1-Domäne führte nicht zu einem Verlust der Ubiquitylierung. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus dem Immunpräzipitations-experiment, in denen alle untersuchten Mutanten von DGK ι noch an VHL binden konnten. Zwar ist es unwahrscheinlich, dass DGK ι durch PHD3 modifiziert und von VHL erkannt wird, dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass DGK ι VHL-abhängig ubiquityliert wird. Möglicherweise ist die Menge an endogenem VHL in den 293T Zellen ausreichend für die *in vivo* beobachtete Ubiquitylierungsaktivität.

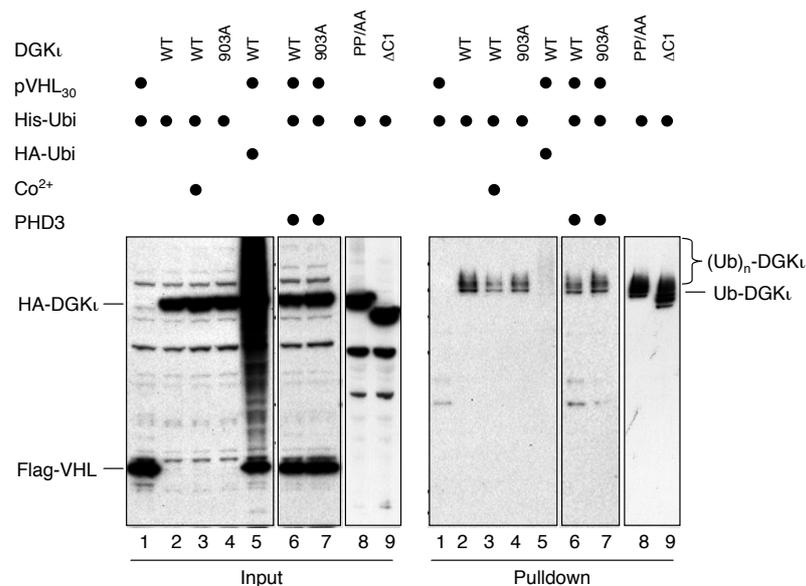


Abb. 30: DGK ι wird *in vivo* ubiquityliert. In 293T Zellen überexprimiertes DGK ι wird *in vivo* ubiquityliert. Die Präinkubation mit Co²⁺, einem Inhibitor der endogenen Prolylhydroxylasen, führte zu keiner signifikanten Reduktion der Ubiquitylierung. Die zusätzliche Expression von pVHL₃₀ und PHD3 hat keinen Einfluss auf die Ubiquitylierung. Die LxxLAP-Motive in DGK ι werden für die Ubiquitylierung nicht benötigt. WT Wildtyp, 903A DGK ι P903A, PP/AA DGK ι P147A/P903A, Δ C1 DGK ι Δ 138-317.

Aus diesem Grund wurde in DGK ι auch in dem unter 3.2 erläuterten *in vitro* Assay untersucht. Dabei wurde DGK ι in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiert und mit dem aus Zelllysaten gereinigten CBC^{VHL} Komplex, rekombinanten Ubiquitylierungsenzymen und ATP inkubiert. Es konnte jedoch keine Ubiquitylierung von DGK ι detektiert werden (Abb. 31 rechts), während

die Positivkontrolle HIF1 α unter diesen Bedingungen ubiquityliert wurde (links). Die Ubiquitylierungsaktivität ist spezifisch für den CBC^{VHL}-Komplex, da die Inkubation mit gereinigtem Socs1 nicht zu einer Ubiquitylierung von HIF1 α führte. Während für HIF1 α eine deutliche Zunahme der Ubiquitylierung beobachtet werden kann, wenn die *in vitro* Translation in der Anwesenheit von Fe(II) durchgeführt wird (eigene Beobachtungen), führt die Zugabe von Fe(II) oder Co(II) zu keinem Unterschied für DGK ι (Daten nicht gezeigt).

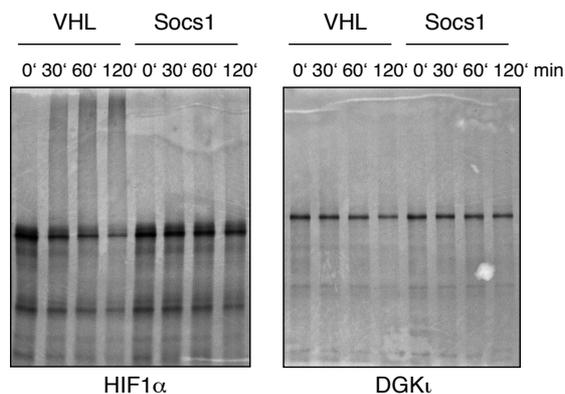


Abb. 31: DGK ι ist kein Ubiquitylierungssubstrat für CBC^{VHL} *in vitro*. ³⁵S-markiertes, *in vitro* translatiertes DGK ι wurde im Ubiquitylierungsassay eingesetzt. Als Quelle für den E3 Komplex dienten Flag-VHL Immunpräzipitate aus 293T Zellen. Als Positivkontrolle diente *in vitro* translatiertes HIF1 α . Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden mittels Gelelektrophorese getrennt, die Gele fixiert und getrocknet und die Ubiquitylierung durch Autoradiographie detektiert. Als Spezifitätskontrolle dienten Immunpräzipitate von Flag-Socs1.

Die fehlende Ubiquitylierung von DGK ι *in vitro* stimmt mit der Beobachtung überein, dass *in vitro* translatiertes DGK ι in einem GST-VCB Pulldownexperiment nicht stabil an den Ligase Komplex binden konnte (Abb. 25). Möglicherweise fehlen in diesem *in vitro* Experiment weitere Faktoren. Es somit weiterhin unklar, ob DGK ι ein physiologisches Substrat von VHL darstellt.

3.9. Andere VHL-Bindungspartner

Calpain7 (Calpn7) gehört zur konservierten Familie der Calpain Proteasen. Dabei handelt es sich um zytosolische Cysteinproteasen, deren biologische Aktivität von der Calcium-Konzentration in der Zelle abhängt, und die deshalb eine Rolle in vielen Calcium-regulierten Prozessen wie Signaltransduktion, Progression durch den Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose eine Rolle spielen. Calpaine sind nicht sequenzspezifisch, sondern hydrolysieren Peptidbindungen zwischen strukturell distinkten Domänen. Die sogenannten „typischen Calpaine“ bestehen aus einer großen, katalytischen (80K) und einer kleinen, regulatorischen (30K) Untereinheit. Dabei bilden die 30K

Untereinheiten Heterodimere mit unterschiedlichen 80K Untereinheiten. Abhängig von ihrer Empfindlichkeit gegenüber zellulärem Calcium werden die Calpaine in m-Calpaine (Affinität für Calcium im millimolaren Bereich) und μ -Calpaine (mikromolarer Bereich) unterteilt. Vermutlich führt Calcium zur Dissoziation der beiden Untereinheiten und damit zur Aktivierung von Calpain. Calpn7 oder PalBH gehört zu den atypischen Calpainen, die möglicherweise ausschließlich als Monomer vorliegen. Zur Aktivierung wird Calpn7 wie typische Calpaine gespalten, die aktive Form liegt ausschließlich im Zellkern vor (Gafni et al., 2004). Verschiedene Calpain Substrate können mit Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden, z.B. ras, c-fos, c-jun und p53. Außerdem spielen Calpaine eine Rolle in der p53-vermittelten Apoptose. Für das ubiquitär exprimierte Calpn7 wurde bisher kein zelluläres Substrat eindeutig identifiziert. Bei der Aktivierung von Calpn7 durch Anstieg der zellulären Calciumkonzentration wird Calpn7 autoproteolytisch gespalten und kann danach nur durch Bindung eines Inhibitors oder durch Degradation inaktiviert werden. Vielleicht spielt VHL in diesem Kontext eine Rolle bei der Termination der Proteolyseaktivität von Calpn7.

YY1AP (YY1-Associated Protein) wurde als Koaktivator des Transkriptionsfaktors YinYang-1 (YY1) identifiziert (Wang et al., 2004). YY1 gehört zur Familie der Zinkfinger-Proteine, bindet an eine spezifische DNA Consensus Sequenz (5'-CGCCATNTT-3') und enthält eine Transkriptionsaktivierungsdomäne sowie zwei Repressordomänen. Abhängig von der Assoziation mit anderen Proteinen kann YY1 die Transkription sowohl positiv als auch negativ regulieren. Unter den von YY1 aktivierten Genen sind c-myc (Riggs et al., 1993) und p53 (Furlong et al., 1996). Wie HIF1 α interagiert YY1 mit CBP/p300. YY1AP ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Die Bindung an YY1 erfolgt über Aminosäure 475 bis 608 und überlappt nicht mit der Bindestelle für VHL, da im „Two-Hybrid“-Screen eine Interaktion von VHL mit einer N-terminal trunkierten Version von YY1AP ab Aminosäure 604 beobachtet wurde. VHL könnte die Aktivität von YY1 zum einen durch die Degradation seines aktivierenden Kofaktors YY1AP, zum anderen durch einen direkten repressiven Effekt modulieren.

Das Protein THOC1 (oder p84N5) ist eine Komponente des THO/TREX Komplexes. Dieser Komplex koppelt die transkriptionelle Elongation mit dem mRNA Export und ist von Hefe bis Mensch konserviert. Homologe von THOC1 wurden allerdings bisher nur für Maus und Ratte beschrieben, wo sie vermutlich noch weitere Funktionen haben, z.B. in der Regulation des Retinoblastoma (Rb) Proteins und der Apoptose (Doostzadeh-Cizeron et al., 1999; Doostzadeh-Cizeron et al., 2001; Durfee et al., 1994). Die Lokalisation von THOC1 spielt bei der Induktion der Apoptose eine wichtige Rolle, jedoch gibt es widersprüchliche Berichte darüber, welche zelluläre Fraktion von THOC1 für das apoptotische Signal verantwortlich ist (Evans et al., 2002; Gasparri et al., 2004). Ebenso wie bei Calpn7 könnte VHL auch bei THOC1 so wirken, dass eine in diesem Fall apoptotische Aktivität durch die Degradation des Signalmoleküls terminiert wird.

Bei KIF2C handelt es sich um ein Mitglied der Kinesin Familie. Kinesine sind molekulare Motoren, die durch die Hydrolyse von ATP chemische Energie in eine translationale Bewegung entlang der Mikrotubuli in der Zelle

umwandeln. Etwa die Hälfte aller Kinesine spielt eine Rolle in der Bewegung des Spindelapparates während der Mitose, während die andere Hälfte für den Transport von Proteinen und Vesikeln entlang der Mikrotubuli verantwortlich ist. Alle Kinesine besitzen eine stark konservierte katalytische Domäne, die sowohl ATP als auch Mikrotubuli bindet. Abhängig von der Position dieser Domäne innerhalb des Moleküls werden die Kinesine in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Generell vermitteln Kinesine mit einer N-terminalen katalytischen Domäne (KIF-N) eine Bewegung in Richtung Plus-Ende der Mikrotubuli, während KIF-Cs (Kinesine mit C-terminaler katalytischer Domäne) sich in Richtung auf den Minuspol der Mikrotubuli bewegen. Zusätzlich gibt es noch eine dritte Klasse von Kinesine, zu denen auch KIF2C gehört, bei denen sich die katalytische Domäne in der Mitte des Proteins befindet (KIF-M). Diese Gruppe von Kinesinen vermittelt keine Bewegung entlang Mikrotubuli, sondern benutzt die ATP Hydrolyse zur Depolymerisation von Mikrotubuli von beiden Enden ausgehend (Ogawa et al., 2004). Da VHL an Mikrotubuli bindet und einen Einfluss auf ihre Depolymerisation hat, ist die Interaktion mit Motorproteinen interessant.

Über die Funktion der anderen im Screen identifizierten Proteine ist nichts bekannt. Da sie außerdem kein LxxLAP-Motiv enthalten, wurden sie im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

3.9.1. Bindung an VHL

Die Bindung einiger Kandidaten sollte noch weiter charakterisiert werden. Nachdem bereits eine Interaktion mit Vollängen Calpn7 und KIF2C im „TwoHybrid“ detektiert werden konnte, sollten Calpn7, YY1AP, THOC1 und KIF2C in humanen Zellen untersucht werden. Dazu wurden Flag-Calpn7, Flag-YY1AP und Flag-THOC1 zusammen mit HA-VHL in 293T Zellen überexprimiert und Immunpräzipitationsexperimenten durchgeführt. KIF2C wurde als HA-Fusion zusammen mit Flag-VHL exprimiert. Für Calpn7 (Abb. 32A), THOC1 und KIF2C (Abb. 33A und B) konnte keine Interaktion mit VHL nachgewiesen werden. Weder pVHL₁₉ noch pVHL₃₀ waren in der Lage, die Proteine zu binden. Für YY1AP ließ sich eine leichte Interaktion mit den beiden VHL-Isoformen beobachten (Abb. 32B). Als Positivkontrolle wurde HA-YY1 verwendet, welches stark mit Flag-YY1AP interagiert. Berücksichtigt man, dass deutlich weniger HA-VHL als HA-YY1 präzipitiert wurde, wurden im Verhältnis gleiche Mengen YY1AP von YY1 und VHL gebunden. Die Bindung von YY1AP an Ets-1 wurde bisher noch nicht beschrieben, allerdings binden Ets-1 und YY1 gemeinsam an bestimmte Promotorregionen, so dass eine Interaktion zwischen Ets-1 und dem Koaktivator von YY1 nicht überraschend ist.

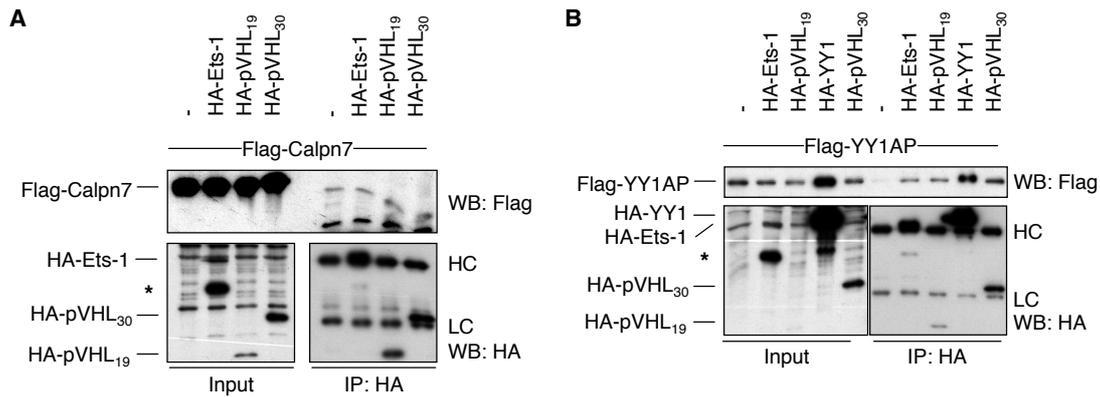


Abb. 32: Immunpräzipitation aus 293T Zellen. **A** 7,5 μ g pCMV2-Calpn7 wurde zusammen mit 6,5 μ g Plasmid zur Expression der angegebenen HA-Fusionen in 293T Zellen transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und mit 25 μ l anti-HA Beads inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-Page getrennt und im Western Blot detektiert. **B** Flag-YY1AP wurde auf die gleiche Weise analysiert. Der Stern markiert ein Abbauprodukt von Ets-1.

Eine Bindung von VHL an die anderen Kandidaten kann aber nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass nur eine Subpopulation der betrachteten Proteine mit VHL interagiert. Im Falle von Calpain könnte VHL nur an die aktive Form der Protease binden, die in einem humanen Zellhintergrund nur durch autoproteolytische Abspaltung des N-Terminus freigesetzt wird. In dem Hefesystem führt vielleicht die N-terminale Fusion mit der Gal-Aktivierungsdomäne zu einer alternativen Konformation der Protease, so dass die katalytische Domäne exponiert ist.

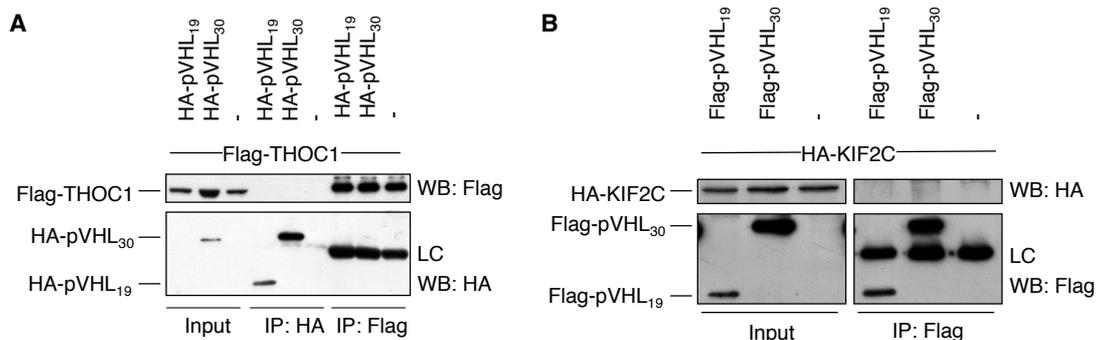


Abb. 33: Immunpräzipitation aus 293T Zellen. **A** 5 μ g pCMV2-THOC1 wurde zusammen mit 6,5 μ g Plasmid zur Expression der angegebenen HA-Fusionen in 293T Zellen transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und mit 25 μ l anti-HA Beads bzw. anti-Flag-Beads inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels Western Blot detektiert. **B** 7,5 μ g HA-KIF2C wurden zusammen mit 6,5 μ g pCMV2, 6,5 μ g pCMV2-pVHL₁₉ oder 4,5 μ g pCMV2-pVHL₃₀ transfiziert. Die 293T Zellen wurden nach 24h lysiert und mit 25 μ l anti-Flag Beads inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-Page und Western Blot analysiert.

Die Lokalisation von THOC1 wird durch apoptotische Signale reguliert. Möglicherweise ist nur eine bestimmte, post-translational modifizierte Form von THOC1 für VHL zugänglich, die z.B. nach einem apoptotischen Stimulus entsteht. KIF2C letztlich wird vermutlich nur innerhalb eines intakten Mikrotubuli-Netzwerks an VHL binden. Da Mikrotubuli im Zellextrakt depolymerisiert vorliegen, ist die Analyse durch Immunpräzipitation vielleicht prinzipiell ungeeignet, um eine Bindung zu detektieren. Hier würden sich *in vitro* Experimente mit gereinigten Komponenten anbieten. THOC1 und KIF2C wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Neben DGK α zeigten lediglich drei weitere Kandidaten Hinweise auf eine Interaktion: Calpn7 und KIF2C in der „Two-Hybrid“-Analyse und YY1AP in der Immunpräzipitation. Diese Proteine konnten sowohl an pVHL₁₉ als auch an pVHL₃₀ binden. Um zu testen, ob es sich bei der Bindung von Calpn7 und YY1AP um eine Interaktion mit der „VCB-Konformation“ von VHL handelte, sollte die Bindung an den VCB-Komplex in einem Pulldown-Experiment mit gereinigten Komplexen überprüft werden. Dazu wurden Flag-YY1AP und Flag-Calpn7 in 293T Zellen exprimiert, die Zellen lysiert und die Lysate mit rekombinantem GST, GST-VCB oder GST-2BC Komplex inkubiert. Die Proben wurden durch SDS-Page aufgetrennt und mit Coomassie-Färbung oder Western Blot gegen den Flag-Tag untersucht. Unter diesen Bedingungen konnte, wie auch schon mit dem reinen *in vitro* System (Abb. 25), keine Bindung der Proteine an den VCB-Komplex beobachtet werden (Abb. 34).

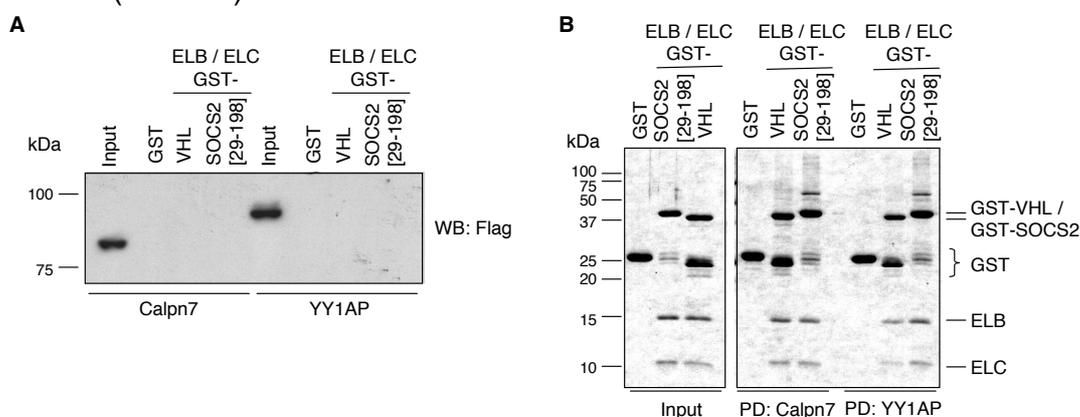


Abb. 34: Calpn7 und YY1AP binden *in vitro* nicht an den VCB-Komplex. Lysate aus 293T Zellen, die Flag-getaggetes Calpn7 oder YY1AP exprimieren, wurden mit 10 μ g der angegebenen Komplexe und 20 μ l Glutathion-Sepharose inkubiert. **A** WB mit anti-Flag Antikörper. **B** Coomassie Färbung der Komplexe vor der Inkubation (Input) und nach der Bindung an Glutathion-Sepharose (PD).

Für Calpn7 ist dies überraschend, da im Hefesystem eine spezifische Interaktion mit dem VCB-Komplex beobachtet werden konnte (Abb. 24). Möglicherweise spielen sterische Gründe eine Rolle, weshalb Calpn7 nur mit dem freien VCB-Komplex im „Two-Hybrid“-System interagiert, nicht jedoch mit dem immobilisierten Komplex im Pulldown. Aufgrund der großen N-terminalen

Fusion an VHL in beiden Fällen (GST vs. GalBD) ist dies jedoch unwahrscheinlich. Für die Bindung von VHL an YY1AP werden wahrscheinlich zusätzliche Faktoren benötigt, z.B. eine Modifikation von VHL, die im rekombinanten Komplex nicht vorliegt.

3.9.2. Ubiquitylierung *in vitro* und *in vivo*

Parallel zu einer möglichen Interaktion mit dem VCB-Komplex sollte untersucht werden, ob einer der beiden Kandidaten YY1AP oder Calpn7 ubiquityliert wird. Dazu wurde zunächst der unter 3.2 beschriebene Ubiquitylierungsassay verwendet, bei dem *in vitro* translatiertes Substrat mit aus 293T Zellen gereinigtem CBC^{VHL} Komplex und rekombinanten Enzymen der Ubiquitinkonjugationsmaschinerie inkubiert wird. Für HIF1 α ließ sich in dem beobachteten Zeitraum von 2h eine starke Ubiquitylierung nachweisen. Allerdings konnten wie schon bei DGK ι (Abb. 31) keine Ubiquitinkonjugate für Calpn7 und YY1AP detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits unter 3.7.2 für die Ubiquitylierung von DGK ι erläutert, fehlen für die Reaktion möglicherweise nötige post-translationale Modifikationen oder weitere Faktoren. Mit *in vitro* translatiertem Calpn7 und YY1AP konnte, wie mit DGK ι , zuvor keine stabile Bindung an den rekombinanten GST-VCB-Komplex nachgewiesen werden (Abb. 25). Aus diesem Grund sollte die Ubiquitylierung von Calpn7 und YY1AP *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden beide Proteine mit einem N-terminalen Flag-Tag zusammen mit His-Ubiquitin in 293T Zellen exprimiert (vgl. 3.4.2). Nach der denaturierenden Lyse und der Isolation von Ubiquitinkonjugaten durch Affinitätsreinigung mit Ni-NTA Agarose wurden die modifizierten Proteine im Western Blot detektiert. Für YY1AP konnte eine Ubiquitylierung *in vivo* nachgewiesen werden, nicht jedoch für Calpn7 (Abb. 35). Interessanterweise verstärkte die zusätzliche Expression von pVHL₁₉ die Kettenbildung (vgl. Abb. 35A, Spur 1 und 4), während die Zugabe des Hydroxylierungs-Inhibitors Co²⁺ keinen signifikanten Einfluss auf die Konjugation von Ubiquitin an YY1AP hatte (Spur 5).

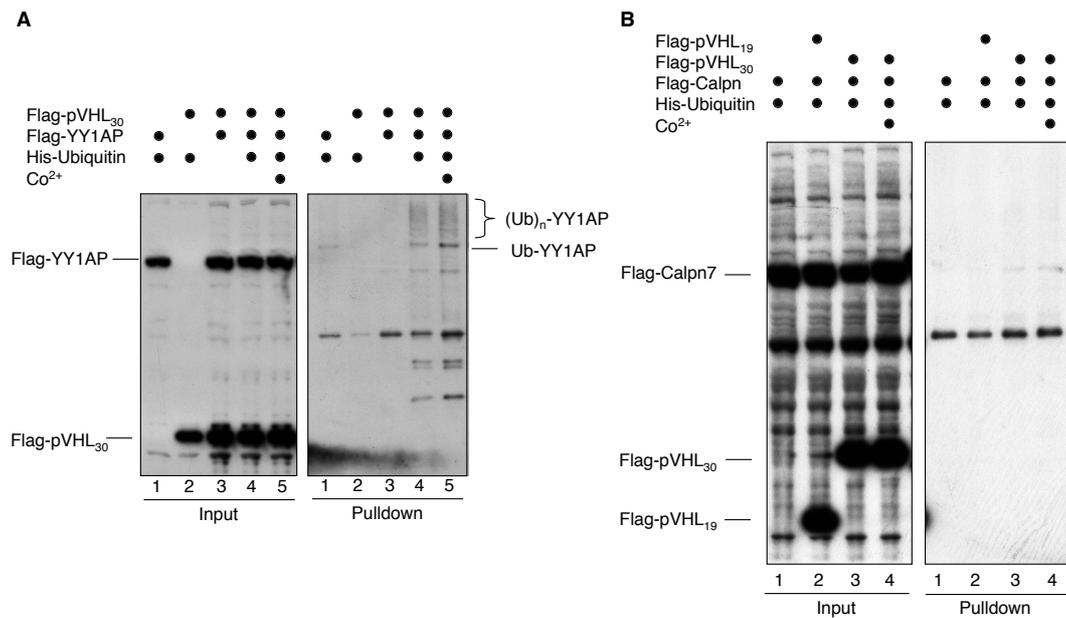


Abb. 35: Ubiquitylierung in 293T Zellen. **A** Flag-YY1AP wurde zusammen mit His-Ubiquitin und Flag-pVHL₃₀ in 293T Zellen exprimiert. **B** Flag-Calpn wurde zusammen mit His-Ubiquitin und Flag-pVHL₁₉ oder Flag-pVHL₃₀ in 293T Zellen exprimiert. **A, B** Vor der Ernte wurden die Zellen 3,5h mit 25µM MG132 inkubiert, um das Proteasom zu inhibieren und Ubiquitinkonjugate anzureichern. Wenn angegeben, wurde zusätzlich 100µM Co²⁺ zu Inhibition der Prolylhydroxylaseaktivität ins Medium gegeben. Ubiquitylierte Proteine wurden nach denaturierender Lyse über Ni-NTA Beads aufgereinigt und die Substrate durch WB mit anti Flag-Antikörper nachgewiesen.

YY1AP besitzt kein LxxLAP-Motiv, weshalb es nicht überraschend ist, dass die Inkubation der Zellen mit Kobaltchlorid keinen Einfluss auf die Ubiquitylierung von YY1AP hatte. Obwohl das bekannte VHL-Bindemotiv fehlt, scheint VHL dennoch eine Rolle in der Ubiquitylierung von YY1AP zu spielen, da die Bildung höhermolekularer Ubiquitin-Konjugate durch die Koexpression von pVHL₃₀ verstärkt wurde. Um den Mechanismus der Bindung zwischen VHL und YY1AP zu verstehen, müssen zunächst die verantwortlichen Domänen auf YY1AP und VHL durch weitere Interaktionsstudien eingegrenzt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich um einen indirekten Effekt von VHL auf die Ubiquitylierung von YY1AP durch eine andere Ubiquitin Ligase handelt.

4. Diskussion

VHL ist die substraterkennende Untereinheit des CBC^{VHL} E3 Ligase Komplexes, dessen bekanntestes Substrat HIF1/2 α ist. Mutationen in VHL führen zum Auftreten multipler Tumore in spezifischen Geweben, deren Entstehung und Progression teilweise auf die gestörte Degradation von HIF1/2 α zurückzuführen ist. Aufgrund der beobachteten klinischen Phänotypen kann die Existenz weiterer VHL-Substrate vermutet werden. Neben seiner Rolle als Ubiquitin Ligase sind jedoch auch Funktionen von VHL in anderen zellulären Prozessen bekannt, z.B. der Assemblierung der Fibronektinmatrix, der Modulation der Dynamik von Mikrotubuli oder der Transkriptionskontrolle. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Bindungspartner des Tumorsuppressorproteins VHL identifiziert und in ihrer Beziehung zu VHL näher charakterisiert.

4.1. Der transkriptionelle Repressor Daxx und VHL

Durch Affinitätschromatographie mit rekombinantem VCB-Komplex, einem aus VHL, Elongin B und Elongin C bestehenden Subkomplex der CBC^{VHL} E3 Ubiquitin Ligase, wurde Daxx als VHL-bindendes Protein aus humanen 293T Zellen isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass Daxx sowohl an die pVHL₃₀ als auch an die pVHL₁₉ Isoform von VHL bindet, wobei die Bindung an pVHL₁₉ schwächer ist. Daxx bindet auch in Abwesenheit von Elongin B/C an VHL, allerdings wird die Interaktion durch Ausbildung des VCB-Komplexes gestärkt. Komplex-gebundenes VHL ist *in vivo* gegenüber freiem VHL stabilisiert. In Hefe kann Daxx durch seine Bindung an VHL vermutlich einen Teil des freien VHLs in seine native Konformation bringen, so dass eine Interaktion möglich ist. Die gleichzeitige Expression von Elongin B/C führt jedoch dazu, dass der gesamte Pool an VHL richtig gefaltet wird und für die Bindung zur Verfügung steht. Eine Aussage, ob Elongin B/C fester Bestandteil des Daxx-VHL Komplexes sind, konnte nicht getroffen werden.

Obwohl überexprimiertes Daxx *in vivo* ubiquityliert wird, konnte kein Hinweis für eine Rolle von VHL im Abbau von Daxx gefunden werden. Im Gegensatz zu dem bekannten VHL-Substrat HIF1/2 α , welches innerhalb weniger Minuten erkannt und abgebaut wird, ist Daxx ein außerordentlich stabiles Protein. Die Erkennung der Substrate durch VHL erfolgt über die Bindung einer Hydroxyprolinmodifikation innerhalb eines exponierten LxxLAP-Motivs des Substrats. Diese post-translationale Modifikation wird durch die Aktivität von Prolylhydroxylasen in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff an das Degradationssubstrat angefügt. Zwar besitzt humanes Daxx ein solches LxxLAP-Motiv, dies ist jedoch in Maus und Ratte nicht konserviert. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass Daxx in menschlichen Zellen eine spezifische Rolle spielt, ist es unwahrscheinlich, dass Daxx lediglich hier durch sauerstoffabhängige Degradation reguliert wird. Die beobachtete Ubiquitylierung ist möglicherweise auf die Überexpression von Daxx in diesem Experiment zurückzuführen und dient vielleicht der Entfernung missgefalteter und aggregierter Daxx-Subpopulationen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nach einer gemeinsamen Funktion von Daxx und VHL gesucht. Daxx fungiert je nach Zelltyp als transkriptioneller Repressor oder Aktivator (Boellmann et al., 2004; Lin et al., 2004). Da Daxx sowohl an Histone als auch an verschiedene Histon-(De)acetylasen bindet (p300/CBP, HDAC1 (Ecsedy et al., 2003; Emelyanov et al., 2002)), wird diese Funktion vermutlich über eine Umwandlung der Chromatin Struktur im transkribierten Bereich ausgeübt. Mahon et al. (2001) beschreiben die transkriptionelle Repression von HIF1 α , indem VHL die Asparagylhydroxylase FIH an HIF1 α rekrutiert. Sie spekulieren außerdem über eine Rolle von VHL in der Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDACs) in einen gemeinsamen Komplex mit FIH, HIF1 α und dem Ubiquitin Ligase Komplex. Dieser Komplex soll die Transkription zusätzlich reprimieren. Es wurden sowohl die Transkriptionsfaktoren HIF1 α als auch Ets-1 untersucht. Letzterer wird durch die Bindung an Daxx reprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass HIF1 α in einem Komplex sowohl mit Daxx als auch mit Ets-1 vorliegt. Welchen Einfluss die unterschiedlichen Komplexe auf die Transkription haben, konnte jedoch nicht aufgeklärt werden.

Daxx lokalisiert zu einem großen Teil in bestimmten Strukturen des Zellkerns, den sogenannten „nuclear bodies“ (NBs). Die Funktion dieser Kompartimente ist trotz intensiver Forschung noch nicht geklärt. Ihre Bildung ist vom Vorhandensein des Promyelocytic Leukemia Protein (PML) abhängig. Das Fehlen von PML führt zu einer Resistenz der Zelle gegenüber einer Vielzahl apoptotischer Stimuli (Takahashi et al., 2004). Ferner wird den „nuclear bodies“ eine Rolle als Speicherkompartiment zugeschrieben, z.B. für Transkriptionsfaktoren und Chromatin-modellierende Proteine. Daxx rekrutiert beispielsweise die Helikase ATR-X in die „nuclear bodies“ und inaktiviert sie dadurch (Tang et al., 2004). Auch die Acetylase CBP kann nach der Relokalisation in NBs nicht länger als Koaktivator fungieren. Möglicherweise kontrolliert Daxx auch die zelluläre Lokalisation von VHL und HIF. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Daxx in HeLa Zellen zu einer Relokalisation von endogenem VHL in den Zellkern führte. VHL war sowohl im Nukleoplasma als auch in NBs lokalisiert, es war jedoch keine spezifische Akkumulation in NBs zu beobachten. Dies könnte bedeuten, dass VHL durch ein von Daxx vermitteltes Signal in den Zellkern rekrutiert wird, ohne direkt an Daxx zu binden oder in unterschiedlichen Komplexen mit Daxx inner- und außerhalb der „nuclear bodies“ vorliegt.

Neben der Transkription wurde auch der Einfluss apoptotischer Stimuli auf Daxx und VHL untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Daxx nach der Stimulation durch den Todesrezeptorliganden TRAIL oder Cytochrom C gespalten wird. Diese Spaltung ist abhängig von zellulären Caspasen, insbesondere Caspase 3, 6 und 8, und nicht wie bisher angenommen vom Ubiquitin-Proteasom-System (Chen und Chen, 2003). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Daxx in der VHL-negativen Zelllinie 786-O nicht prozessiert wird. Der Vergleich der VHL-negativen Zelllinie 786-O mit der VHL-positiven 786-O HA-VHL zeigte außerdem, dass Zellen ohne VHL gegenüber verschiedenen apoptotischen Stimuli bis zu achtmal resistenter sind. Dies weist auf eine Rolle von VHL in apoptotischen Signalwegen hin. Qi und Ohh (2003) beschreiben eine Funktion von VHL in der Suppression von

NF- κ B unabhängig von der HIF1 α -Regulation. Da NF- κ B anti-apoptotische Faktoren wie Survivin oder Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) aktiviert, kann VHL durch die Suppression dieses Transkriptionsfaktors pro-apoptotisch wirken. Die Beobachtungen von (Qi und Ohh, 2003) beziehen sich auf die Induktion der Apoptose durch TNF α , einen TRAIL-verwandten Todesliganden.

Daxx wird sowohl als positiver als auch als negativer Regulator der Apoptose beschrieben. Durch die Bindung an den Tumorsuppressor p53 inhibiert Daxx die Transkription von Genen, die eine Funktion im p53-vermittelten Zellzyklus-Arrest haben, zugunsten der Expression pro-apoptotischer Gene. Die Expression von p53 wird durch DNA-Schäden oder Hypoxie induziert. Die unphosphorylierte Form von HIF1 α bindet ebenfalls an p53 (Suzuki et al., 2001), alleine oder in heterooligomeren Komplexen mit Mdm2 oder p300. Die Funktion der Bindung ist kontrovers. Auf der einen Seite wird eine Stabilisierung von p53 beschrieben (An et al., 1998), zum anderen führt die Bindung bei geringer p53-Konzentration zur Repression, bei höheren Konzentrationen zur VHL-unabhängigen Degradation von HIF1 α (Schmid et al., 2004), möglicherweise durch Rekrutierung der Ubiquitin Ligase Mdm2. Die Bindung an p53 erfolgt im Bereich der Prolinseitenketten von HIF1 α in der sauerstoff-abhängigen Degradationsdomäne (Hansson et al., 2002) und ist von der Modifikation durch Prolylhydroxylasen unabhängig. Das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten ist äußerst komplex, sowohl die Degradation von HIF1 α als auch seine transkriptionelle Aktivität werden von einer Vielzahl von Faktoren reguliert. Um die genaue Funktion von Daxx in diesem Netzwerk zu verstehen, bedarf es einer umfassenden Untersuchung der beteiligten Komplexe. Vor allem muss untersucht werden, unter welchen zellulären Bedingungen die einzelnen Proteine Komplexe bilden, ob und welche Promotoren aktiviert werden und wie die Stabilität der beteiligten Faktoren reguliert wird.

Die Interaktion von Daxx mit VHL konnte durch Immunpräzipitation nur nach Überexpression beider Proteine gezeigt werden. Die existierenden Antikörper waren nicht sensitiv genug, um endogenes Daxx im Western Blot zu detektieren, falls nur eine geringe Subpopulation an VHL bindet. Sowohl Daxx als auch VHL werden mit unterschiedlichen post-translationalen Modifikationen versehen, die einen Einfluss auf die Interaktion mit anderen Bindungspartnern haben. So bindet Daxx an PML nur im hyperphosphorylierten, an Pax3 nur im hypophosphorylierten Zustand. Die Bindung an andere Faktoren ist von deren SUMOylierung abhängig. Auch VHL wird durch Phosphorylierung modifiziert. Weitere Experimente mit unterschiedlich modifizierten Bindungspartnern könnten Aufschluss über die zelluläre Funktion der Interaktion geben.

Der Ansatz, mit einem rekombinanten Subkomplex der CBC^{VHL} E3 Ligase nach neuen Substraten von VHL zu suchen, führte zwar zur Entdeckung von Daxx als neuem Bindungspartner, ein wichtiges zelluläres Zielprotein der VHL-vermittelten Ubiquitylierung konnte jedoch nicht gefunden werden. Wenn man annimmt, dass weitere Substrate nach dem gleichen Mechanismus erkannt werden wie HIF1/2 α , kann man mehrere potentielle Schwierigkeiten

bei dieser experimentellen Strategie erkennen. Das Beispiel HIF1/2 α zeigt, dass ein Substrat so kurzlebig oder schwach exprimiert sein kann, dass es unter normalen Bedingungen nicht detektierbar ist. Der Einsatz von Proteasominhibitoren ist möglicherweise nicht ausreichend, um das Substrat soweit anzureichern, dass es durch den Einsatz von Massenspektrometrie nach vorhergehender Affinitätsreinigung mit rekombinantem VCB-Komplex zu identifizieren ist. Desweiteren könnten potentielle Substrate generell in zu geringer Konzentration für eine erfolgreiche Detektion in der Zelle vorliegen. Gerade Transkriptionsfaktoren haben häufig nur eine geringe Abundanz. Eine Anreicherung von VHL-Substraten ließe sich durch die Verwendung von VHL-negativen Zelllinien erreichen. Etablierte Zelllinien von VHL-Patienten existieren jedoch nur aus Klarzellkarzinomen der Niere. Die besonders interessanten Phäochromozytome, deren Entstehung vielleicht am ehesten durch den fehlregulierten Abbau weiterer Substrate bedingt sein könnte, lassen sich somit nicht untersuchen. Die hohe Gewebespezifität der bei einer VHL-Erkrankung entstehenden Tumore schließt auch die Untersuchung von VHL-negativen Zellen aus konditionalen k.o. Mäusen aus, da hier bisher lediglich Zelllinien aus Geweben etabliert wurden, bei denen im Menschen keine Entartungen beobachtet werden.

HIF1/2 α spielt für die Entstehung und Progression von Tumoren bei VHL-Patienten eine sehr wichtige Rolle. Die konstitutive Expression von durch HIF regulierten Faktoren verändert das zelluläre Milieu und erhöht die Wahrscheinlichkeit für den Erwerb zusätzlicher Mutationen. Als Folge weicht das Proteom von aus Tumoren gewonnenen Zellen von dem einer gesunden Zelle ab, ohne dass VHL-vermittelter Proteinabbau eine direkte Rolle dabei spielt. Mit großer Sicherheit ist HIF1/2 α das wichtigste Substrat von VHL in der Zelle. VHL spielt allerdings auch eine Rolle in nicht-degradativen Prozessen, die in zunehmendem Maße in den Mittelpunkt rücken. Weitere Experimente müssen zeigen, ob Daxx und VHL eine gemeinsame Funktion z.B. in der Regulation der Apoptose oder der Transkriptionskontrolle haben.

4.2. Diacylglycerol Kinase iota und VHL

Um die oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Identifizierung neuer VHL-Substrate zu umgehen, wurde eine Screening-Methode entwickelt, die es erlaubt, zwischen unterschiedlichen Bindungsmechanismen zu unterscheiden. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten funktionalisierten Hefesystem ließ sich die Hydroxylierung von HIF1 α und die anschließende Bindung an den VCB-Komplex rekonstituieren. Es war möglich, zwischen Proteinen, die direkt an VHL binden, und solchen, die zur Bindung eine Prolylhydroxylase brauchen, zu diskriminieren. Für die bekannte Interaktion zwischen VHL und HIF1 α kann man annehmen, dass HIF1 α in *S. cerevisiae* von PHD3 an den Prolinresten 402 und 564 hydroxyliert wurden. Für die neu gefundenen Bindungspartner ist neben einer Prolinmodifikation, die zur Bindung an VHL führt, formal auch eine durch PHD3 überbrückte Interaktion möglich. Interessanterweise besitzt jedoch die Mehrzahl an Proteinen, die im

„Two-Hybrid“-Screen gefunden wurden, ein LxxLAP-Motiv, das Erkennungsmotiv für Prolinhydroxylasen.

Für die Diacylglycerolkinase *iota* (DGK_ι) konnte gezeigt werden, dass sie sowohl mit der langen als auch der kurzen Isoform von VHL interagiert. Während die Bindung an pVHL₁₉ für das im Screen gefundene C-terminale DGK_ι-Fragment (Δ1-667) abhängig von PHD3 war, konnte das Volllängen Protein sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen unabhängig von PHD3 an VHL binden. Für diesen Befund gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen könnte ein relativ unstrukturierter C-Terminus von DGK_ι ein unspezifisches Substrat für PHD3 sein, ebenso begünstigt eine flexible, entfaltete Konformation des Bereiches um das LxxLAP-Motiv die Bindung an VHL. Andererseits könnte es auf DGK_ι distinkte Bindestellen für PHD3 und VHL geben. Befindet sich die Bindestelle für VHL im N-Terminus, wird für die Bindung an das DGK_ι-Fragment PHD3 benötigt, nicht jedoch für die Bindung an das Volllängen Protein. Das würde voraussetzen, dass auch VHL an PHD3 bindet. Dies konnte in Koimmunpräzipitationsexperimenten für pVHL₁₉ bestätigt werden. Interessanterweise ließ sich auch eine Bindung zwischen DGK_ι und den Prolylhydroxylasen PHD2 und PHD3 nachweisen.

Ausführliche Bindungsstudien mit DGK_ι-Mutanten, z.B. in den beiden LxxLAP-Motiven und der DAG/PE-Bindedomäne, zeigten, dass die Interaktion mit VHL in den Mutanten nicht beeinträchtigt war. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass DGK_ι nicht nach dem gleichen Mechanismus wie bekannte VHL-Substrate oder -Interaktoren an VHL bindet. Im Einklang mit dieser Beobachtung konnte eine Ubiquitylierung von DGK_ι gezeigt werden, die jedoch unabhängig von einem intakten LxxLAP-Motiv war.

Diacylglycerolkinasen sind für die Umwandlung zweier sekundärer Botenstoffe ineinander, nämlich die Konvertierung von Diacylglycerol (DAG) zu Phosphatidsäure (PA) verantwortlich. DAG aktiviert eine Reihe von Proteinen in der intrazellulären Signaltransduktion, hauptsächlich Mitglieder der PKCs Familie, aber auch andere C1-Domänen enthaltende Proteine wie z.B. Ras guanyl nucleotide-releasing proteins (RasGRPs). PA andererseits aktiviert z.B. die Produktion von cAMP. Die intrazelluläre Konzentration an DAG und PA wird streng reguliert, sowohl über die Synthese von DAG durch Phospholipase C, als auch durch die Konvertierung von DAG zu PA durch die Aktivität von Diacylglycerolkinasen. Diese Regulation erfolgt als Antwort auf externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter. Interessanterweise führt die Exposition von Zellen durch Hypoxie zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration an Phosphatidsäure als Folge einer erhöhten DAG Synthese und gesteigerter DGK-Aktivität (Temes et al., 2004). Versuche mit Inhibitoren von Phospholipase C und DGK konnten zeigen, dass die Phosphatidsäure-Konzentration einen Einfluss auf die hypoxie-induzierte Stabilisierung von HIF1 α hat. Diacylglycerolkinasen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Domänenstruktur und Affinität für Calcium in fünf Subtypen unterteilt. In dieser Studie wurde zur Inhibition von DGK R59949 verwendet, welches spezifisch Diacylglycerolkinasen des Typs I inhibiert. Wird weniger DAG zu PA konvertiert, so dass DAG in der Zelle akkumuliert, führt dies zu einer Destabilisierung von HIF1 α auch unter

Hypoxie-Bedingungen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht durch DAG-abhängige PKCs reguliert wird, sondern dass vielmehr die HIF1 α -modifizierenden Prolylhydroxylasen selbst durch DAG stimuliert werden (Temes et al., 2005). Die entsprechenden Experimente wurden mit zwei etablierten Zelllinien aus Klarzellkarzinomen von VHL-Patienten durchgeführt, in denen VHL durch stabile Transfektion wiedereingeführt worden war.

DGK ι gehört zum Typ IV, dessen Aktivität nicht durch Calcium reguliert wird, und wird ausschließlich in der Retina und dem Gehirn exprimiert. Dabei handelt es sich um Gewebe, das bei VHL-Patienten häufig von Tumoren betroffen ist. Obwohl DGK ι zu einem anderen Kinase-Subtyp gehört, als dem von Temes et al. (2005) untersuchten Typ I, wird die Aktivität der Prolylhydroxylasen in spezifischen Zelltypen möglicherweise durch DGK ι moduliert. In dieser Arbeit konnte für DGK ι eine Interaktion mit PHDs gezeigt werden. Bei Sauerstoffmangel kommt es zu einer Akkumulation von DAG, welches die Aktivität der Prolylhydroxylasen erhöht, solange es nicht rasch genug zu Phosphatidsäure konvertiert wird. Durch die Interaktion von DGK ι mit den PHDs kann die Konzentration von DAG in der direkten Umgebung des Sauerstoffsensors gesenkt werden, so dass eine Stabilisierung von HIF1 α ermöglicht wird. Unter normoxischen Bedingungen könnte die Bindung von VHL an PHD den Sauerstoffsensor in direkte Nähe der Ubiquitin Ligase bringen und beschleunigt damit möglicherweise den Abbau von HIF1 α . In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, welchen Einfluss die zelluläre Sauerstoffkonzentration auf die Zusammensetzung eines ternären Komplexes aus VHL, DGK ι und PHDs hat. Auch der Einfluss von VHL-Mutanten wäre in diesem Zusammenhang interessant. Obwohl bei den untersuchten Mutanten der Krankheitsstypen 2A, 2B und 1 nur geringe Unterschiede in der Bindung an PHD3 zu beobachten waren, verhalten sich die VHL-Mutanten möglicherweise unterschiedlich im Bezug auf die Bildung eines ternären Komplexes mit DGK ι .

Diese zusätzliche Regulation von HIF1 α wäre vor allem in der Retina interessant, da diese für die normale Funktion des Auges einen erhöhten Sauerstoffbedarf hat. Zur Regeneration von Rhodopsin in den Photorezeptoren der Retina wird Sauerstoff benötigt (Ostroy et al., 1993). Besonders bei der Adaption der Stäbchenrezeptoren an Dunkelheit wird verstärkt Sauerstoff konsumiert (Arden et al., 1998). Diabetis-Patienten, deren Sauerstoffversorgung im Auge durch reduzierte Kapillarfunktion eingeschränkt ist, reagieren mit der HIF-regulierten Produktion von VEGF, was zur Umbildung der Kapillargefäße führt. In einem späteren Stadium kann das beschleunigte Wachstum der Kapillaren jedoch zu Retinopathie und Erblindung führen (Drasdo et al., 2002). DGK ι könnte deshalb in diesem sensiblen Organ zusätzlich zur Regulation der HIF-Aktivität beisteuern.

4.3. Weitere Faktoren im VHL-Netzwerk

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten „Two-Hybrid“-Screen war es möglich, den komplexen Mechanismus der Substraterkennung von VHL in *S. cerevisiae* zu rekonstituieren, wie am Beispiel von HIF1 α demonstriert werden konnte. Die Mehrzahl der Proteinfragmente, die in Hefe an VHL binden konnten, enthielten ein LxxLAP-Motiv und schienen deshalb auf den ersten Blick vielversprechende Substrate für die Modifikation durch PHD3, die Rekrutierung an den CBC^{VHL}-Komplex durch VHL und den anschließenden proteasomalen Abbau zu sein. Die nähere Untersuchung zeigte jedoch, dass die Vollängen Proteine unter den betrachteten Bedingungen größtenteils nicht mit VHL interagierten. Während in der Hefe vier der gefundenen Interaktoren (Calpn, KIF2C, YY1AP und DGK ι) PHD3-abhängig an pVHL₁₉ banden, banden in humanen Zellen lediglich YY1AP und DGK ι an VHL, jedoch unabhängig von einer Modifikation durch PHD. YY1AP besitzt kein LxxLAP-Motiv und die Mutation der beiden Erkennungsmotive in DGK ι hatte keinen negative Einfluss auf die VHL-Bindung. Mehrere Gründe können dazu führen, dass die zuerst beobachtete Interaktion in weiteren Experimenten nicht verifiziert werden konnte.

Die Herstellung einer cDNA Bibliothek führt zwangsläufig zur Expression von Proteinfragmenten, da die Reverse Transkription bei langen mRNAs häufig abbricht oder interne Schnittstellen für Restriktionsenzyme, mit der die cDNAs in den Hefeexpressionsvektor kloniert werden, in der cDNA auftreten. Beides führt zur Ligation unvollständiger kodierender Sequenzen in den „Two-Hybrid“-Vektor und nachfolgender Expression meist N-terminal verkürzter Proteine. Dadurch kann es zu einer partiellen Entfaltung der Proteine kommen, so dass ansonsten unzugängliche Bereiche des Proteins exponiert werden. Diese exponierten, unstrukturierten Bereiche werden möglicherweise unspezifisch von PHDs erkannt und modifiziert. Die Untersuchung der HIF1 α -Bindestelle auf VHL zeigt, dass nur wenige Determinanten für die Substraterkennung nötig sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass VHL jedes Hydroxyprolin innerhalb einer unstrukturierten Region mit ausreichender Affinität bindet, so dass mit der äußerst sensiblen „Two-Hybrid“-Methode eine Interaktion detektiert werden kann. Werden nun die Vollängen-Proteine untersucht, sind die LxxLAP-Motive für die Prolylhydroxylasen unzugänglich. Sie werden nicht modifiziert und das Protein wird deshalb von VHL nicht erkannt. Das gleiche gilt für die Interaktion in humanen Zelllinien. Aus diesem Grund kann man möglicherweise für Calpn7, THOC1 und KIF2C in 293T Zellen keine Wechselwirkung mit VHL beobachten.

Die „Two-Hybrid“-Analyse ist eine äußerst sensitive Nachweismethode für Protein-Protein-Interaktionen, da schon eine geringe oder transiente Aktivierung des Reportergens zum Wachstum der Hefe führt. Die Überexpression der beteiligten Proteine und die durch die Fusion an Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4 bedingte nukleäre Kolo-kalisation erhöhen die Wahrscheinlichkeit für eine Interaktion. Dennoch muss es sich bei Calpn7, THOC1 und KIF2C nicht um eine unspezifische Bindung unter artifiziellen Bedingungen handeln. Vielmehr könnte in menschlichen Zellen nur

eine geringe Subpopulation dieser Faktoren mit VHL wechselwirken, innerhalb eines klar definierten zellulären Kontextes. Calpn7 z.B. liegt als inaktive Proform in der Zelle vor. Die Aktivierung beinhaltet eine autoproteolytische Spaltung, bei der der N-Terminus abgespalten wird und es zu einer konformationellen Änderung kommt, die das aktive Zentrum der Protease demaskiert. Im „Two-Hybrid“-System ließ sich eine deutliche, PHD3-abhängige Interaktion mit VHL detektieren. Hier blockiert die N-terminale Fusion an die GalAD-Domäne möglicherweise die inhibitorische Rückfaltung des N-Terminus auf den Rest des Proteins und Calpn7 liegt in einer konstitutiv aktivierten Form vor, bei der nicht nur das aktive Zentrum, sondern auch das LxxLAP-Motiv zugänglich sind. Weitere Untersuchungen mit der aktiven Form von Calpn7 sind nötig, um zu klären, ob VHL möglicherweise für die Inaktivierung von Calpn7, z.B. durch dessen Degradation, verantwortlich ist. THOC1 ist genau wie VHL ein Protein, das zwischen Zytoplasma und Zellkern pendeln kann. Dabei wird die Lokalisation durch apoptotische Stimuli beeinflusst. Für die Evaluierung der Interaktion mit VHL ist es nötig, die äußeren Bedingungen (Apoptose, Zellzyklus etc.) zu identifizieren, unter denen eine Komplexbildung beobachtet werden kann. Eine potentielle Funktion von VHL an Mikrotubuli, die im Zusammenhang mit KIF2C steht, wurde in dieser Arbeit nicht adressiert. Als Mitglied der Kinesin Familie bindet KIF2C an intakte Mikrotubuli und depolymerisiert sie von beiden Enden ausgehend. Interessanterweise ist auch für VHL eine Rolle in der Stabilisierung und Dynamik von Mikrotubuli beschrieben (Hergovich et al., 2003; Lolkema et al., 2004). VHL-Mutanten, die einer Typ 2A Erkrankung zuzuordnen sind, führen zu einer Destabilisierung von Mikrotubuli in der Anwesenheit von Nocodazol und beeinflussen die Dynamik peripherer Mikrotubuli negativ. Eine Interaktion zwischen VHL und KIF2C kann sicher nur in der Umgebung eines intakten Mikrotubuli-Netzwerks beobachtet werden. Techniken, die dieses Netzwerk konservieren sind z.B. Immunfluoreszenz mit lebenden Zellen oder Spin-down Assays, bei denen Mikrotubuli *in vitro* oder *ex vivo* polymerisiert werden und mit rekombinanten Proteinen oder Zelllysaten inkubiert werden.

4.4. Alternative Funktionen von VHL

In dieser Arbeit konnten mit zwei unterschiedlichen Methoden mehrere neue Bindungspartner von VHL gefunden werden. Für keinen dieser Partner konnte eine Ubiquitylierung durch den CBC^{VHL} Komplex nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Interaktoren von VHL stellen deshalb vermutlich keine Substrate des CBC^{VHL} Komplexes dar, sondern stehen im Zusammenhang mit anderen regulatorischen Aufgaben von VHL. Daxx bringt VHL in Zusammenhang mit apoptotischen Signalwegen und der Transkriptionskontrolle, während $\text{DGK}\iota$ eine Rolle bei der Feinregulation der HIF-Degradation spielen könnte. Dies sind weitere Beispiele für die sich abzeichnende Eigenschaft von VHL, als Bestandteil verschiedener zellulärer Komplexe unterschiedliche Funktion auszuüben. Die meisten mit einer VHL-Erkrankung verbundenen Phänotypen wurden bisher mit der Fehlregulation von $\text{HIF1/2}\alpha$ in Verbindung gebracht. Immer häufiger wird VHL jedoch als Bestandteil von Komplexen gefunden, die keine Funktion in der ubiquitin-abhängigen Degradation haben, z.B. als Bindungspartner von Fibronectin, Mikrotubuli oder den Transkriptionsrepressor VHLaK. Die zellulären Mechanismen, die VHL dabei kontrolliert, sind noch nicht ausreichend verstanden, beispielsweise in der Assemblierung der Fibronectinmatrix oder der Stabilisierung von Mikrotubuli.

Die hier beschriebenen Faktoren fügen dem VHL-Netzwerk eine weitere Ebene der Komplexität hinzu. Weitere Experimente werden das Verständnis der verschiedenen Wirkungsweisen von VHL verbessern und ermöglichen vielleicht in Zukunft, die den verschiedenen Typen der VHL-Erkrankung zugrundeliegenden molekularen Zusammenhänge zu erklären.

5. Material und Methoden

5.1. Computeranalysen

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und Sequenzvergleiche sowie Literaturrecherchen) wurden mit Hilfe des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Für Sequenzanalysen (Erstellen von Restriktionskarten, Auswertung von DNA-Sequenzierungen, Vergleiche von DNA- und Proteinsequenzen und Primerdesign) wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA-Star Inc.) verwendet. Filme wurden mit einem AGFA Scanner (Arcus II) digitalisiert und mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Die Erstellung von Texten, Tabellen, Graphiken und Abbildungen sowie die Auswertung von Messdaten erfolgte mit Hilfe des Microsoft Office Pakets (Microsoft Corp.).

5.2. Mikrobiologische Arbeiten

5.2.1. *E. coli* Stämme

TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (r_K- m_K-)</i> [F' traD36 proAB lac ^I ΔM15]
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' proAB lac ^I ΔM15 Tn10(Tet ^r)]
BL21(DE3)/RIL	F' <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm+ Tet^r galλ (DE3)</i> EndA Hte [<i>argU ileY leuW Cam^r</i>]
KC8	<i>hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lacΔX74, strA, galU,K</i>

5.2.2. Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Flüssigkulturen in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl) wurden bei 37°C geschüttelt (180 rpm) und Agarplatten (LB-Medium mit 1,5% Agar) bei 37°C inkubiert. Für die Selektion von transformierten Bakterien wurden dem Medium Antibiotika in einer Konzentration von 50µg/ml (Ampicillin), 30µg/ml (Kanamycin) bzw. 34µg/ml (Chloramphenicol) zugefügt. Die Dichte von *E. coli* Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Kurzfristig wurden Bakterien in Ausstrichen auf Agarplatten für ca. eine Woche aufbewahrt. Für die langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen pelletiert, in 15% Glycerol resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

5.2.3. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Transformation von Ligationsansätzen wurden elektrokompetente XL1-Blue, für aus Hefe isolierte Plasmide KC8 Zellen verwendet. Hierfür wurde mit einer Einzelkolonie aus einem frischen Ausstrich eine Übernachtskultur in Flüssigmedium angeimpft und hieraus am nächsten Tag eine Verdünnung auf $OD_{600}=0,05$ in 1l LB-Flüssigmedium hergestellt. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,7 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für ca. 1h wurden die Zellen durch Zentrifugation (5min, 5000g, 4°C) geerntet. Die pelletierten Zellen wurden vorsichtig in 500ml eisgekühltem Wasser resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der letzte Schritt zunächst mit 250ml, dann mit 20ml 10%igem Glycerin wiederholt. Schliesslich wurden die Zellen in 3ml 10% Glycerin resuspendiert, in $50\mu\text{l}$ Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.4. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation von Plasmiden oder für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurden chemisch kompetente TG1, XL1-blue bzw. BL21(DE3)/RIL Zellen verwendet. Die Inokulation und die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter 5.2.3 beschrieben. Bei einer OD_{600} von 0,7 wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in 500ml eisgekühltem Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 250ml 100mM CaCl_2 aufgenommen. Nach 20min Inkubation auf Eis wurden die Zellen sedimentiert, in 10ml 100mM $\text{CaCl}_2/15\%$ Glycerin resuspendiert, in $100\mu\text{l}$ Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.5. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Kurz vor der Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Für eine Elektroporation wurden ca. 10ng Plasmid DNA bzw. $2-4\mu\text{l}$ eines gegen Wasser dialysierten Ligationsansatzes mit $50\mu\text{l}$ der elektrokompetenten Zellen gemischt. Diese Suspension wurde in einer Elektroporationsküvette (0,1cm Spaltbreite) mit einem Puls von 1,8kV und $25\mu\text{F}$ bei einem Widerstand von 200Ω elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen sofort in $600\mu\text{l}$ LB-Medium aufgenommen, in ein Greiner Plastikröhrchen (10ml) transferiert und 1h bei 37°C geschüttelt. Für die Transformation von chemisch kompetenten Zellen wurden ca. 10 bis 500ng Plasmid DNA mit $50\mu\text{l}$ der kompetenten Zellen gemischt und die Suspension im Eppendorfgefäß 10-30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 20sec bei 42°C und einer anschließenden Inkubation von 2min auf Eis wurden $600\mu\text{L}$ LB-Medium zugegeben und 1h bei 37°C geschüttelt. Transformierte Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Retransformation von Plasmid-DNA mit Ampicillin-Resistenzgen zur Isolation von DNA wurde

auf die Inkubation in LB-Medium bei 37°C verzichtet und die Zellen direkt ausgestrichen.

5.2.6. Hefestämme

CG1945 MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*,
leu2-3, *112*, *gal4-542*, *gal80-538*, *cyh2*, LYS2::GAL1_{UAS}-
GAL1_{TATA}-HIS3, URA3::GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ

CG1945 BC MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*,
leu2-3, *112*, *gal4-542*, *gal80-538*, *cyh2*,
LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,
URA3::GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ,
ADE2::ADH-ElonginB-ElonginC

5.2.7. Kultivierung und Lagerung von *S. cerevisiae*

Flüssigkulturen in YPD-Medium (20g/l Bactopepton, 10g/l Hefeextrakt, 2% Glukose) wurden bei 30°C geschüttelt (200rpm) und Agarplatten (YPD-Medium mit 2% Agar) bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert. Für die Selektion von transformierten Hefezellen wurden SC-Medien (siehe 5.2.10) verwendet. Die Dichte von *S. cerevisiae* Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600nm (OD₆₀₀) bestimmt. Kurzfristig wurden Hefezellen in Ausstrichen auf Agarplatten für maximal vier Wochen bei 4°C aufbewahrt. Für die langfristige Lagerung wurden logarithmisch wachsende Flüssigkulturen pelletiert, in 15% Glycerol resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

5.2.8. Herstellung kompetenter Hefezellen

Für die Studie von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Hefe-„TwoHybrid“-System wurden chemisch kompetente Hefezellen verwendet (Knop et al., 1999). Hierfür wurde mit einer mit einer Einzelkolonie aus einem frischen Ausstrich eine Übernachtskultur in YPAD-Flüssigmedium (YPD mit 100mg/ml Adenin) angeimpft und hieraus am nächsten Tag eine Verdünnung auf OD₆₀₀ von 0,2 in 250ml YPAD-Flüssigmedium hergestellt. Die Zellen wurden bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 inkubiert und durch Zentrifugation (5min, 500g, RT) geerntet. Durch wiederholtes Resuspendieren und Zentrifugieren wurden die Zellen zunächst in 250ml sterilem Wasser und anschließend in 50ml SORB-Puffer (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl [pH 8,0], 1mM EDTA/NaOH [pH 8,0], 1M Sorbitol, mit HOAc auf pH 8,0 eingestellt) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 360µl SORB pro 50 OD aufgenommen und mit 40µl hitzedenaturierter Lachssperma-DNA versetzt. Die Zellen wurden sofort verwendet oder in 50µl Aliquots ohne Schockgefrieren bei -80°C gelagert.

Für die Transformation der cDNA-Bibliothek wurden kompetente Hefezellen aus mit dem „bait“-Plasmid transformierten CG1945 oder CG1945BC Zellen hergestellt (www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Trafo.html). Dazu wurde mit einer Kolonie der transformierten Zellen eine Übernachtskultur SC-TRP Medium okkultiert und am nächsten Tag in 3x 300ml YPD-Medium überimpft, so dass die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,2 hatten. Nach 3-5h Inkubation bei 30°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (1100g, 5min, RT) sedimentiert. Die Zellpellets wurden mit 500ml H₂O gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in dreimal je 18ml 0,1M LiOAc resuspendiert und 15min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in Ansätze zu jeweils 3,6ml gesplittet und zentrifugiert (2500g, 5min, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen direkt in der Transformation eingesetzt.

5.2.9. Transformation von Hefezellen

Kompetente Hefezellen wurden für eine erhöhte Transformationseffizienz frisch verwendet oder bei RT aufgetaut. Für allgemeine Anwendungen wurde 1µl Plasmid-DNA mit 10µl Hefezellen in einem sterilen Eppendorfgefäß gemischt und mit dem sechsfachen Volumen PEG (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl [pH8,0], 1mM EDTA/NaOH [pH8,0], 40% PEG3350) versetzt. Die Zellen wurden ca. 30min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1/9 Volumen DMSO hinzugegeben, die Suspension durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und bei 42°C im Wasserbad für 12-15min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3min, 2000rpm) pelletiert und einmal in 500µl sterilem Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200µl sterilem Wasser resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Wurden mehrere Plasmide oder größere DNA-Mengen verwendet, wurde die Menge an kompetenten Zellen proportional erhöht.

Für die Transformation der cDNA-Bibliothek wurde ein leicht verändertes Protokoll verwendet. Das Köder-Plasmid wurde nach obiger Methode transformiert und kompetente Hefezellen wie unter 5.2.8 hergestellt. Zu einem 3,6ml Ansatz wurden nach Zentrifugation ein Transformationsmix aus 2,6ml 40% PEG3350, 360µl 1M LiOAc, 100µl Lachssperma-DNA (10mg/ml), 4µl cDNA-Bibliothek und 136µl sterilem Wasser gegeben. Die Zellen wurden zunächst 30min bei RT und danach für 20min im Wasserbad bei 42°C inkubiert. Dabei wurde der Ansatz in regelmäßigen Abständen invertiert, um eine gleichmäßige Wärmeverteilung zu gewährleisten. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen pelletiert (2500g, 5min, RT). Die Zellpellets wurden in je 2,4 ml SC-LEU-TRP-HIS-MET aufgenommen und jeweils 600 µl auf eine vorgewärmte Selektionsplatte (SC-LEU-TRP-HIS-MET mit 5mM 3-AT), Ø=15cm, ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C 5-7 Tage inkubiert.

5.2.10. Selektion von Hefezellen

Für die Selektion von Hefezellen wurden im Allgemeinen Auxotrophiemarker verwendet. Dazu wurden die Hefezellen in synthetischem Kompletmedium (SC-Medium) ohne die entsprechenden Aminosäuren kultiviert. Für die Selektion auf Platten wurden 2% Agarplatten mit SC-Medium verwendet.

SC-Medium:

2% Glucose
6,7g/l Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
2g/l Drop-Out Pulver

Drop-Out Pulver:

je 20g Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glutamat, Glyzin, Histidin, Inositol, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Uracil, Valin
2g para-Aminobenzoësäure
40g Leucin
5g Adenin

Die Aminosäure, auf die selektioniert werden soll, wird weggelassen. Ein Medium SC-HIS-LEU enthält z.B. einen Drop-Out Mix ohne Histidin und Leucin.

5.3. Zellbiologische Methoden

5.3.1. Zelllinien

HEK293T	humane embryonale Nierenzellen, mit SV40 large-T Antigen transformiertes Derivat der 293 Zelllinie, auch 293T genannt
HeLa	humane Zervix-Adenokarzinomzellen
786-O	humane Klarzellkarzinomzellen, Frameshift-Mutation in VHL bei Kodon 104; exprimiert HIF2 α , aber kein HIF1 α
786-O HA-VHL	Derivat der 786-O Zelllinie, stabil transfiziert mit HA-pVHL ₃₀ (alternativer Name RCC WT8); keine Expression von HIF2 α unter normoxischen Bedingungen
A498	humane Klarzellkarzinomzellen, Frameshift-Mutation in VHL bei Kodon 142; exprimiert HIF2 α , aber kein HIF1 α

Ser-W3	Sertoli-Zellen aus Ratte, immortalisiert durch Transformation mit SV40 large-T Antigen
Jurkat	humane T-Zell Leukämie-Zelllinie

5.3.2. Kultivierung von Säugerzellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturschalen (Falcon) bei 37°C, 7,5% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit in Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO-BRL) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom), 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin supplementiert. G418-resistente 786-O HA-VHL Zellen wurden mit 1,5µg/ml G418 (Sigma) selektioniert. Bei Erreichen von ca. 80-100% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄ [pH 7,4]) gewaschen. Anschließend wurden 4ml Trypsin/EDTA Lösung (GIBCO-BRL) pro Schale (Ø=10cm) zugegeben und bis zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1:1 mit Medium verdünnt und abzentrifugiert (4min, 400g, RT). Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Nährmedium resuspendiert und je nach Bedarf zur weiteren Kultivierung 1:5 bis 1:10 verdünnt in frischen Kulturschalen ausgesäht. Die Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension erfolgte durch Auszählen in einer Neubauerzählkammer.

5.3.3. Lagerung von Säugerzellen

Zur Langzeitlagerung wurden Säugerzellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden exponentiell wachsende Zellen bei ca. 80% Konfluenz wie oben beschrieben abgeerntet und abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in FCS mit 10% DMSO resuspendiert und die Zellsuspension in Cryovials aliquotiert. Die Zellen wurden sofort in einem vorgekühlten Isopropanol-gefüllten Cryo-Einfriergefäß (Nalgene) bei -80°C langsam eingefroren. Nach ein bis zwei Tagen konnten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt werden. Zum Auftauen wurden die Zellen im Cryoröhrchen in einem Wasserbad schnell auf 37°C erwärmt und in 2ml vorgewärmtes Medium überführt. Zum Entfernen des DMSO wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und wie oben beschrieben kultiviert.

5.3.4. Transfektion von Säugerzellen

293T Zellen wurden mittels der Calcium-Phosphat Methode transfiziert. Hierfür wurden abends $2,2 \times 10^6$ Zellen pro 10cm Schale ausgesäht und am folgenden Tag transfiziert. Für einen Transfektionsansatz wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 12-15µg Plasmid-DNA mit Wasser auf 450µl aufgefüllt

und mit 50µl einer 2,5M CaCl₂-Lösung gemischt. Dann wurden 500µl 2xHBS Puffer (16.01g/l NaCl, 0,74g/l KCl, 9,53g/l HEPES und 0,25g/l Na₂HPO₄ [pH7,05]) tropfenweise am Rand des Gefäßes zugegeben, kurz durch Schütteln gemischt und 3min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen mit Chloroquine (40µM Endkonzentration) supplementiert. Die Transfektionslösung wurde nach kurzem Mischen tropfenweise gleichmässig zum Medium der vorbereiteten Zellen gegeben (1ml Lösung pro 10cm Schale bzw. 300 µl pro Vertiefung einer 6-well Platte) und diese dann für 5h im Brutschrank inkubiert. Nach Wechsel des Mediums wurden die Zellen zur Expression der transfizierten cDNAs für weitere 24-48 h inkubiert. HeLa Zellen wurden mit Lipofectamine PLUS (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert.

5.3.5. Stimulation der Apoptose und ED₅₀-Messung

Zur Stimulation der Apoptose wurden 786-O oder 786-O HA-VHL Zellen in einer 10cm Schale (2,2x10⁶ Zellen) ausgesät und am folgenden Tag stimuliert. Für die Analyse der Spaltung von Daxx und VHL erfolgte die Induktion der Apoptose in Gegenwart von 2,5 µg/ml Cycloheximid mit 125nM Etoposid oder 0,5µg/ml TRAIL (Biomol). Dabei wurden die Zellen jeweils für eine Stunde mit Cycloheximid vorinkubiert und dann TRAIL oder Etoposid zum Medium zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht (mind. 14h). Zur Herstellung von Zelllysaten wurde zunächst der Überstand abgenommen, der apoptotische Zellen enthält, und die Zellen danach durch Trypsinieren geerntet. Die Zellen wurden vereint, abzentrifugiert und lysiert.

Zur Bestimmung des ED₅₀-Wertes wurden 786-O, 786-O HA-VHL oder A498 Zellen in einer 96-well Platte (1x10⁴ Zellen/well) ausgesät und am folgenden Tag stimuliert. Dazu wurden Apoptose Inducer nach folgendem Schema ins Medium gegeben:

Inducer/ #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Etoposid µM	500	250	125	62,5	31	16	8	4	2	0
TRAIL ng/ml	1000	500	250	125	63	31	16	8	4	0
TNF ng/ml	500	250	125	63	31	16	8	4	2	0
FasAb mono ng/ml	1000	500	250	125	63	31	16	8	4	0
FasAb poly ng/ml	1000	500	250	125	63	31	16	8	4	0

Zusätzlich wurden die beiden Bedingungen mit und ohne 1µg/ml Cycloheximid verglichen. Nach einer Inkubation von ca. 16h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 0,5% Kristallviolett in 20% Methanol gefärbt. Überschüssiges Kristallviolett wurde durch Waschen mit PBS entfernt und die Platten unter dem Mikroskop ausgewertet.

5.3.6. Radioaktive Markierung von Zellen mit ^{35}S -Methionin

Für Pulldown-Experimente mit rekombinantem VCB-Komplex aus menschlichen Zelllysaten wurden zelluläre Proteine mit radioaktivem ^{35}S -Methionin markiert. Dazu wurden Zellen am Vorabend ausgesät ($4 \times 10^6/10\text{cm}$ Schale) und bis zur ca. 80%igen Konfluenz bei 37°C / 7,5% CO_2 inkubiert. Vor der eigentlichen Markierung wurden die Zellen zweimal mit je 4ml serumfreiem Medium (DMEM ohne Methionin und Cystein, Gibco) gewaschen und zelluläres Methionin durch 30minütige Inkubation mit DMEM (Gibco) ohne Methionin depletiert. Das Medium wurde aspiriert und durch 3ml Markierungsmedium ersetzt (DMEM ohne Methionin, 10% dialysiertes FCS, $2,5\mu\text{M}$ Epoxomicin und $75\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin). Die Zellen wurden für 4h bei 37°C / 7,5% CO_2 inkubiert und anschließend durch Abspülen mit PBS (293T) oder Trypsinieren (andere Zelllinien) geerntet. Die Zellen wurden wie unter 5.5.5 beschrieben lysiert und für Pulldown-Experimente verwendet.

5.4. Molekularbiologische Methoden

5.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit den Kits der Firmen Qiagen (Plasmid Mini Kit) oder Macherey-Nagel (Nucleospin Plasmid Quick Pure) nach Angaben des Herstellers isoliert. Kleine DNA-Mengen (Miniprep) wurden aus 4 ml Übernachtskultur und größere Mengen (Maxiprep) aus 500-ml-Kulturen isoliert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei $\lambda=260\text{nm}$ bestimmt. Für doppelsträngige DNA entspricht $\text{OD}_{260}=1$ einer Konzentration von $50\mu\text{g/ml}$.

5.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von DNA aus Hefe wurden 2ml einer Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß überführt und in $400\mu\text{l}$ Hefe-Lysepuffer (10mM Tris-HCl [pH8,0], 100mM NaCl, 1mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS) resuspendiert. Hierzu wurde ein Volumen eines Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) (Roth) und Glassperlen bis kurz unter die Flüssigkeitsoberfläche (ca. $425\text{-}600\mu\text{l}$) gegeben. Nach 3-5minütigem Vortexen wurden $200\mu\text{l}$ TE-Puffer (10mM Tris-HCl [pH7,5], 1mM EDTA) zugegeben und der Ansatz zentrifugiert (6min, 16000g, RT). Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und die DNA durch Zugabe von 1ml Ethanol gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 10min bei 16000g pellettiert und in $30\mu\text{l}$ TE + $100\mu\text{g/ml}$ RNase resuspendiert. Um die DNA vollständig zu lösen wurde sie 30min bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Für die Retransformation in KC8 *E. coli* wurde direkt der DNA-haltige Überstand ohne Präzipitation verwendet.

5.4.3. Restriktionsverdau von DNA und Dephosphorylierung

Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA mittels Restriktionsenzymen wurde nach den allgemein üblichen Vorschriften durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Die Restriktionsbedingungen für die jeweiligen Enzyme wurden den Empfehlungen der Hersteller entsprechend gewählt, wobei die optimalen Salz-Konzentrationen und pH-Werte mit den 10x konzentrierten Puffern des Herstellers eingestellt wurden. Es wurden in der Regel 5 bis 10 U Enzym pro μg DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden etwa 2 h für analytische und >3 h für präparative Zwecke bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Um die Rezirkularisierung des Vektors in Ligationsreaktionen zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert. Dies erfolgte in der Regel direkt nach dem Restriktionsverdau durch Zugabe von 5-10 U Shrimp Alkaline Phosphatase (NEB) zum Restriktionsansatz und Inkubation bei 37°C für 1h. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 6x DNA-Probenpuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 30% Glycerin) oder durch Hitzeinaktivierung (20min, 65°C) des Enzyms gestoppt.

5.4.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über Gelelektrophorese, wobei je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8 bis 2%ige Agarosegele verwendet wurden. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer (90mM Tris, 90mM Borsäure, 2,5mM EDTA) aufgekocht, nach Abkühlung mit Ethidiumbromid ($0,5\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und in Flachkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 100V mit 1x TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid wurde die DNA auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und photographiert. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte anhand eines parallel aufgetragenen Größenstandards (1 kb DNA-Ladder, Invitrogen).

5.4.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht (324 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe von Kits der Firmen Qiagen (QIAquick Gel Extraction Kit) oder Macherey-Nagel (Nucleospin ExtractII) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück isoliert und in einem geeigneten Volumen EB-Puffer (10mM Tris-HCl [pH8,5]) gelöst.

5.4.6. Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA wurden Vektor und Insert etwa im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die DNA-Mengen wurden aus der Stärke der Bande im Agarosegel abgeschätzt. Es wurde ca. 250ng Vektor in einem 20 μ l Ligationsansatz eingesetzt. Der Ansatz wurde zusammen mit 1 μ l T4 Ligase (NEB) für 1h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Vor der Transformation wurde der Ligationsansatz 30min gegen steriles Wasser auf einem Nitrozellulosefilter (Porengröße 0,05 μ m, Millipore) dialysiert.

5.4.7. Sequenzieren von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem AbiPrism 377 DNA-Sequenzierer (Perkin Elmer) in der Arbeitsgruppe oder durch Firmen durchgeführt. Die Sequenzierreaktion sowie die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia). Ein Sequenzieransatz enthielt ca. 0,5 μ g Plasmid-DNA und 10pmol Primer.

5.4.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikationen wurde in einem Personal Cyclor der Firma Biometra durchgeführt. Das Profil der Reaktion richtete sich nach der Länge und dem G/C-Gehalt der verwendeten Oligonukleotide und nach der Länge des zu erwartenden PCR-Fragments. In der Regel wurden, falls notwendig, lediglich die Temperaturen für die Primerbindung oder die Anzahl der Amplifikationszyklen optimiert. Standard-PCR-Reaktionen wurden in 50 μ l Ansätzen mit 5 μ l 10x Pfu-Puffer, 1 μ l Oligonukleotidmix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ l Pfu Turbo (alle Stratagene) 200ng Plasmid-DNA und 5 μ M der entsprechenden Oligonukleotide (Primer) durchgeführt. Es wurde folgendes Programm verwendet ($x \approx$ Schmelztemperatur der Primer -10°C):

Initiale Denaturierung	5min	94°C
20-30 Amplifikationszyklen	30-45sec	94°C
	30-45sec	$x^\circ\text{C}$
	1min/kb + 2min	72°C
Endverlängerung	10min	72°C
Abkühlung	∞	4°C

PCR-Reaktionen für die Amplifikation von langen Sequenzabschnitten wurden in einem Volumen von 50 μ l einfach konzentriertem PCR-Puffer (ThermoPol Buffer, NEB) mit 100ng Plasmid-DNA als Matrize, jeweils 0,2mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 0,72 μ M Primer und einem Taq/Vent-Polymerase-Gemisch (10U/0,8U NEB) durchgeführt. Die Reaktionen folgten dem Programm:

Initiale Denaturierung	2min	94°C
10 Amplifikationszyklen	20sec	94°C
	30sec	x°C
	1min40sec	68°C
	30sec	94°C
20 Amplifikationszyklen	30sec	(x+4)°C
	30sec	68°C $\Delta t=+20\text{sec}$
	1min40sec	68°C $\Delta t=+20\text{sec}$
Abkühlung	∞	4°C

PCR-Reaktionen wurden für die nachfolgende Verwendung entweder über ein Agarose-Gel oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

5.4.9. Zielgerichtete Punktmutagenese

Der gezielte Austausch einzelner Basen in Gensequenzen wurde über eine PCR-basierte Methode unter Verwendung des QuickChange Kit der Firma Stratagene vorgenommen. Hierfür wurden zwei komplementäre Oligonukleotide verwendet, die in der Mitte eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz trugen und in die 5'- und 3'-Richtungen noch jeweils mindestens 15 bp der Zielsequenz aufwiesen, die vorzugsweise mit zwei G- oder C-Basenpaaren endete. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers mit 50ng Matrizen Plasmid-DNA und je 125ng der entsprechenden Oligonukleotide mit Folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	1min	95°C
18 Amplifikationszyklen:	50sec	95°C
	50sec	58°C
	2min/1kb	68°C
	7min	68°C
Endverlängerung:	7min	68°C
Abkühlung:	∞	4°C

Bei der Reaktion wird das gesamte Plasmid amplifiziert. Die methylierte Plasmid-DNA der Matrize wurde anschließend durch einen DpnI-Verdau für 1h bei 37°C beseitigt. Ein Aliquot dieses Ansatzes konnte anschließend direkt in *E. coli* transformiert werden. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierungen überprüft.

5.4.10. RNA-Isolierung

Um Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurde bei allen Arbeiten mit RNA auf äußerste Sauberkeit am Arbeitsplatz geachtet. Für alle Arbeitsschritte wurden Handschuhe, gefilterte Pipettenspitzen und RNase-freies (DEPC-behandeltes) Wasser verwendet. Die Extraktion von zellulärer RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) nach Angabe des Herstellers aus humanen Zelllinien. Dabei wurde jeweils eine fast konfluente Schale

($\varnothing=10\text{cm}$) Zellen eingesetzt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei $\lambda=260\text{nm}$ bestimmt ($\text{OD}_{260}=1$ entspricht $40\mu\text{g/ml}$ RNA). Die RNA wurde bei -20°C für maximal 1 Jahr gelagert.

5.4.11.RT-PCR

Die cDNAs für YY1AP, Calpn7 und THOC1 wurden über RT-PCR aus RNA von Jurkat-Zellen isoliert. Hierbei wird mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden in einer reversen Transkriptions-Reaktion zuerst einzelsträngige mRNA in DNA umgeschrieben und diese dann über eine PCR-Reaktion amplifiziert. Hierfür wurde das One-Step RT-PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Reaktionen wurden wie vom Hersteller angegeben in $50\mu\text{l}$ mit 250ng RNA als Matrize und jeweils $0,6\mu\text{M}$ der genspezifischen Oligonukleotide durchgeführt. Zur Amplifikation im Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet:

Reverse Transkription:	30min	50°C
Inaktivierung der RT-Enzyme und Aktivierung der Taq-Polymerase:	15min	95°C
35 Amplifikationszyklen:	30sec	95°C
	30sec	63°C
	1min/1 kb	72°C
Endverlängerung:	10min	72°C
Abkühlung:	∞	4°C

RT-PCR-Produkte wurden wie nach PCR-Reaktionen aufgereinigt, mit Restriktionsenzymen verdaut und in die entsprechenden Expressionsvektoren kloniert. Durch Sequenzierung wurde die korrekte Amplifikation der Gensequenzen überprüft.

5.5. Proteinbiochemische Methoden

5.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen wurden mit dem BioRad-Proteinassay (Bradford-Assay) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Standard wurde eine wässrige BSA-Lösung bekannter Konzentration verwendet.

5.5.2. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen über denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgte unter Verwendung des „mighty small“ Gelsystems der Firma Hoefer (Amersham Pharmacia). Die Prozentigkeit der Tris-Glyzin Gele (Sambrook et al.) richtete sich nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine. Für das Trenngel wurden 5ml einer Lösung aus

folgenden Stammlösungen angesetzt: 1,3ml 1,5M Tris-HCl [pH8,8], 50 μ l 10% SDS, 1-2,9ml Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (29%/1%) für 6-17,5%ige Gele und (3,6-x)ml (x = Volumen Acrylamidlösung) Wasser. Zur Polymerisation wurden 4 μ l TEMED und 50 μ l 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) zugegeben. Die Lösung für das Sammelgel bestand aus 2,7ml Wasser, 500 μ l Tris-HCl [pH6,8], 670 μ l Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung und 40 μ l 10% SDS. Proteinproben wurden in Probenpuffer (2x SDS-Probenpuffer: 125mM Tris [pH6,8], 20% Glycerin, 2% SDS, 100mM DTT und 0,01% Bromphenolblau) aufgenommen, durch Erhitzen (5min bei 95°C) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 20-25mA aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 50mM Tris, 384mM Glyzin und 0,1% SDS verwendet.

Für die Auftrennung von Proteinen mit stark unterschiedlichen Molekulargewichten wurden Gradientengele (Bis-Tris 4-12%) der Firma Invitrogen verwendet. Die Proben wurden bei konstant 140V für 100min in MOPS-Laufpuffer (50mM MOPS, 50mM Trisbase, 1g/l SDS, 1mM EDTA) aufgetrennt. Als Molekulargewichtstandard diente Precision Plus Protein Standard (BioRad).

5.5.3. Coomassiefärbung von Proteingelen

Um Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden Polyacrylamid-Gele für 30min bei RT in Coomassie-Lösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 25% Methanol und 10% Essigsäure) gefärbt und anschließend durch wiederholtes Waschen mit Entfärbelösung (25% Methanol/ 10% Essigsäure) entfärbt, bis der Hintergrund klar wurde. Für die massenspektrometrische Bestimmung wurde das Gel mit SyproRuby (Molecular Probes) gefärbt und die Banden durch Anregung bei $\lambda=405\text{nm}$ sichtbar gemacht.

5.5.4. Western Blot

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden in einer Tankblot-Apparatur (Hofer) aus dem Gel auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran (ImmobilonP, Millipore) überführt. Der Transfer erfolgte bei 4°C für 2h in Transferpuffer (25mM Tris, 192mM Glyzin, 0,01% SDS und 20% Methanol) bei einer konstanten Spannung von 70V. Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurde die Membran für 30min bei RT in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST (25mM Tris [pH7,5], 137mM NaCl, 2,6mM KCl, 0,1% Tween20) blockiert. Nach einmaligem kurzen Waschen in TBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 3-5h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST. Die Membran wurde sechsmal für 5min mit TBST gewaschen und anschließend für 1-3h bei RT mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST inkubiert. Nach erneutem sechsmaligen Waschen in TBST wurden gebundene Antikörper mittels Chemilumineszenz (ECL Westernblot Detection Kit, Amersham) nach

Herstellerangaben nachgewiesen. Die verwendeten Antikörper sind unter 5.9. aufgeführt.

5.5.5. Herstellung von Zelllysaten und Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitationen (IP) wurden 293T Zellen in einer 10cm Schale bis zu einer Konfluenz von etwa 90% kultiviert, einmal mit kaltem PBS gewaschen und mit 3ml PBS durch Abschaben von der Platte geerntet. Die abzentrifugierten Zellen (3min, 1400g, 4°C) wurden in 1ml ECB-Puffer (50mM Tris-HCl [pH7,9], 150mM NaCl, 1mM EDTA) gewaschen und in 600µl Lysepuffer ECB++ (ECB mit 0,25% NP-40, 1mM DTT, 25µM MG132, 6µg/ml Antipain, 4,3µl/ml Leupeptin, 4,5µg/ml Aprotinin, 5µg/ml Trypsin Inhibitor, 5µg/ml Pepstatin, 6µg/ml Chymostatin, 10mM NEM) resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15min, 20000g, 4°C) abgetrennt und die Proteinkonzentration des Überstandes durch Bradford (BioRad) photometrisch bestimmt. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein für die IP eingesetzt und das Volumen durch Zugabe von Lysepuffer angeglichen.

Für die Analyse von Zelllysaten oder der Inputkontrolle wurde das Lysat mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5min bei 95°C denaturiert.

Die Lysate wurden für mindestens 4h bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Je nach Anwendung wurden folgende Antikörper für die Immunpräzipitationsexperimente verwendet: 35µl Beads gekoppelt mit anti-Flag M2 (Sigma), 6µl anti-HA F-7 (Santa Cruz) mit 35µl rmp ProteinA Sepharose (Amersham), spezifische monoklonale Antikörper (vgl.5.5.4) 1µg mit 35µl rmp ProteinA Sepharose, gereinigte Antiseren ca. 10µl mit 35µl rmp ProteinA Sepharose. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (3min, 500g, 4°C) und die Matrix dreimal mit je 500µl ECB mit 0,25% NP-40 und 1mM DTT gewaschen. Die Proteine wurden durch Aufkochen in 1x SDS-Probenpuffer bei 95°C eluiert und denaturiert. Es wurden je 5µl Probe durch SDS-Page aufgetrennt und analysiert.

5.5.6. Nickelpulldown mit His-Ubiquitin

Für die Analyse der Ubiquitylierung von einzelnen Proteinen wurden diese als His-Ubiquitinkonjugate unter denaturierenden Bedingungen durch Affinitätsreinigung mit Nickel-NTA Agarose aufgereinigt. Dazu wurden 293T Zellen 36-48h vorher mit einem His-Ubiquitin-Konstrukt und gegebenenfalls mit weiteren Plasmiden transfiziert. Unmittelbar vor der Lyse wurden die Zellen 3 1/2 Stunden mit 25µM des Proteasominhibitors MG132 inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis mit 5ml eiskaltem PBS ab gespült und wie unter 5.5.5 lysiert. Die Proteinkonzentration der Überstände der letzten Zentrifugation wurde durch Bradford (BioRad) bestimmt und durch Zugabe von Lysepuffer angeglichen. Gleiche Proteinmengen wurden mit 1/4 Volumen 55% Trichloressigsäure (TCA) versetzt, durch Vortexen gemischt und 15min auf

Eis inkubiert. Ausgefällte Proteine wurden durch Zentrifugation (20min, 5000g, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 500µl Aceton (-20°C) gewaschen. Die Proteine wurden erneut durch Zentrifugation (5min, 5000g, 4°C) pelletiert. Für die Inputkontrolle wurden TCA-Pellets aus 50µl Lysat mit 10µl Wasser und 15µl HU-Puffer (8M Harnstoff, 5% SDS, 200mM Tris-HCl [pH6,8], Bromphenolblau, 1,5% DTT aus 1M Stammlösung frisch dazugegeben) resuspendiert und 10min bei 65°C inkubiert. Für die Affinitätsreinigung wurde im Allgemeinen 500µl Lysat pro Ansatz verwendet. Die Proteinpellets wurden in 500µl Puffer A (6M Guanidiniumchlorid, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl [pH8,0], 0,05% Tween, 20mM Imidazol) durch einstündiges Schütteln im Thermoblock (1400rpm, RT) gelöst. Unlösliche Membranbestandteile wurden durch Zentrifugation (20min, 20000g, 4°C) abgetrennt und der Überstand zu 35µl Nickel-NTA Magnetic Beads (Qiagen) gegeben. Nach 3h Inkubation bei RT oder Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Beads mit einem Magneten pelletiert und dreimal mit 800µl Puffer A und fünfmal mit 800µl Puffer C (8M Harnstoff, 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl [pH6,3], 0,05% Tween) gewaschen. Die Beads wurden mit 100µl Puffer C in ein neues Eppendorfgefäß überführt, pelletiert und der Überstand abgesaugt. Gebundene Proteine wurden mit 30µl 1% SDS durch 10minütige Inkubation bei 65°C eluiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert und bei 45°C für 30min in einer SpeedVac (Eppendorf) getrocknet. Das Pellet aus SDS und Protein wurde in 10µl Wasser und 15µl HU-Puffer gelöst und 10min unter Schütteln im Thermomixer bei 65°C erhitzt.

5.5.7. Identifikation von VCB-Interaktoren

Zur Identifikation von VCB-Interaktoren wurden 100 Schalen (Ø=10cm) 293T Zellen mit ca. 80% Konfluenz geerntet, nach der Zentrifugation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Zellpellet bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Affinitätsmatrix für die Reinigung wurde wie folgt vorbereitet: 65µl Glutathion 4B Sepharose (Amersham) wurden über Nacht in ECB-Puffer equilibriert und am nächsten Tag wie folgt aufgesplittet und mit rekombinantem Protein in 500µl ECB++ (s. 5.5.5) versetzt: dreimal 15µl mit 90µg Protein (GST, GST-VCB Wildtyp oder GST-VCB Y98H) und einmal 20µl mit 120 µg GST. Nach zweistündiger Inkubation auf dem Drehrad bei 4°C wurde der Überstand mit ungebundenem Protein abgesaugt und die Sepharose zweimal mit je 500µl ECB++ gewaschen.

Der Zellextrakt aus 293T Zellen wurde folgendermaßen gewonnen: Für die Lyse wurde das Zellpellet in 4ml eiskaltem hypotonischem Lysepuffer (50mM Tris-HCl [pH7,9], 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM DTT, 25µM MG132, 6µg/ml Antipain, 4,3µl/ml Leupeptin, 4,5µg/ml Aprotinin, 5µg/ml Trypsin Inhibitor, 5µg/ml Pepstatin, 6µg/ml Chymostatin) resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 30 mal durch eine 23G Kanüle gedrückt und dadurch aufgeschlossen. Zelltrümmer und Lipide wurden durch zweimalige Zentrifugation (30 und 15min, 20000g, 4°C) abgetrennt und der

klare Überstand zu der vorbereiteten Glutathion-Matrix mit 120 μ g GST gegeben (Vorinkubation). Nach 1h bei 4°C auf dem Drehrad wurde der Überstand durch Zentrifugation (5min, 500g, 4°C) abgetrennt, in drei Ansätze gesplittet und auf die übrigen vorbereiteten Beads gegeben. Nach einer Inkubation von 1,5h wurde die Sepharose sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden zweimal 15min mit je 200 μ l ECB++ und einmal mit 200 μ l NETN960 (ECB++ mit 960mM NaCl) gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch Erhitzen in 15 μ l SDS-Probenpuffer (10min, 95°C) eluiert, durch SDS-Page getrennt und analysiert.

Um die abschließende Identifizierung der Proteine durch Massenspektroskopie zu ermöglichen, musste absolut staub- und kontaminationsfrei gearbeitet werden. Alle verwendeten Puffer und die Färbelösungen für das Acrylamidgel wurden durch 0,2 μ m Filter sterilfiltriert. Die Färbung erfolgte in mit filtriertem Wasser und Ethanol gereinigten Glasgefäßen. Zunächst wurde das Gel für 1h in 20% Ethanol/ 7% HOAc fixiert und anschließend mit SyproRuby (Molecular Probes) durch Inkubation über Nacht nach Angaben des Herstellers sichtbar gemacht. Die gereinigten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und im Gel tryptisch verdaut. Die aus dem Gel eluierten Peptide wurden anschließend im MALDI-TOF Massenspektrometer analysiert. Die Identifikation der Proteine erfolgte über deren Peptidmassen unter Benutzung der Suchwerkzeuge PeptIdent, Mascot und ProFound.

5.5.8. Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Komplexe mit GST-Fusionsproteinen wurden nach der Koexpression von den Plasmiden pVB und pBB75 in *E. coli* BL21(DE3)/RIL Zellen (Stratagene) gereinigt. Aus einer Übernachtskultur wurden 1l LB amp/chl mit einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 wurden die Zellen auf 24°C abgekühlt und bei OD₆₀₀=0,6 mit 1mM IPTG induziert. Nach 6h wurden erneut 1mM IPTG und frisches Ampicillin zugegeben und die Kultur für weitere 16h bei 24°C/180rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10min, 6000g, 4°C) geerntet und in 30ml Lysepuffer (50mM Tris-HCl [pH8,0], 200mM NaCl, 10mM DTT, 1mM PMSF, Complete Protease Inhibitors (Boehringer)) resuspendiert. Die Bakterien wurden durch dreimaliges Passieren durch einen Emulsiflex C5 Zelldisruptor (Avestin) aufgeschlossen und das Lysat zum Verdau der DNA 10min auf Eis mit einer Spatelspitze DNaseI inkubiert. Nach der Zugabe von 60 μ l 1M EDTA wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt (1h, 45000g, 4°C). Der Überstand wurde zu 5ml equilibrierter Glutathion 4B Sepharose (Amersham) gegeben und über Nacht bei 4°C unter Drehen inkubiert. Anschließend wurde die Matrix einmal mit 50ml Lysepuffer und zweimal mit je 50ml Hochsalzpuffer (50mM Tris-HCl [pH8,0], 500mM NaCl, 10mM DTT) gewaschen. Die Matrix wurde in eine Säule überführt und gebundene Komplexe mit fünfmal 5ml ECB Puffer (s. 5.5.5) + 10mM DTT + 7mM Glutathion eluiert. Eluate wurden durch SDS-Page analysiert und positive Fraktionen vereint. Zur Entfernung des Glutathions wurden die Komplexe zweimal 12h gegen das 100-200fache Volumen ECB Puffer + 1mM DTT dialysiert und mit Konzentratoren-Röhrchen

(MWCO=5000kDa) auf eine Proteinkonzentration von 5mg/ml gebracht. Die Proteine wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

5.5.9. Reinigung von His₆-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Für die Immunisierung von Kaninchen wurden His₆-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3)/RIL Zellen (Stratagene) von pET-Vektoren (Novagen) exprimiert. Hierfür wurden 1l einer Bakterienkultur bei $\text{OD}_{600} = 0,5-0,6$ mit 1mM IPTG induziert und die Proteine für 5h bei 37°C exprimiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Die Zellen wurden in 15ml Puffer A (6M Guanidiniumchlorid, 100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris-HCl [pH8,0], 20mM Imidazol) resuspendiert und 90min unter Drehen im Falcon inkubiert. Das Lysat wurde durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte (30 und 15min, 10000g, 4°C) geklärt und der Überstand mit 5ml einer in Puffer A equilibrierten Nickel-NTA Matrix (Qiagen) für 3h unter Drehen inkubiert. Die Matrix wurde in eine Säule gegeben und zuerst mit 10 Volumen Puffer A, danach mit 5 Volumen Puffer B (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris-HCl [pH8,0]) gewaschen. Anschließend wurde die Matrix solange mit Puffer C (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris-HCl [pH6,3]) gewaschen, bis alle nicht spezifisch gebundenen Proteine eluiert waren. Dies wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration durch photometrische Messung der Absorption des Durchflusses bei $\lambda=280$ überprüft. Es wurde solange gewaschen, bis eine $\text{OD}_{280} < 0,05$ (ca. 10-20 Säulenvolumen) erreicht war. Die Elution der Proteine erfolgte mit 20ml Puffer D (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris-HCl [pH5,9]) und 20ml Puffer E (8M Harnstoff, 100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris-HCl [pH4,5]). Es wurden jeweils Fraktionen von 2ml gesammelt und durch SDS-Page analysiert. Positive Fraktionen wurden vereint und zweimal über Nacht bei 4°C gegen das 500-1000fache Volumen PBS dialysiert. Vor der Dialyse wurde die Proteinkonzentration der Eluate gemessen. Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation (20min, 10000g, 4°C) abgetrennt und für die Immunisierung (s. 5.5.12) in einem geeigneten Volumen PBS resuspendiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt und gegebenenfalls der Überstand aufkonzentriert. War das gesamte Protein ausgefallen, wurde der Überstand verworfen. Proteinlösungen und -suspensionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.5.10. Bindungsstudien mit rekombinantem GST-VCB Komplex

Für Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinkomplexen wurden je $10\mu\text{g}$ des angegebenen Proteins an $20\mu\text{l}$ in ECB-Puffer (s. 5.5.5) equilibrierte Glutathion 4B Sepharose wie unter 5.5.7 beschrieben gebunden und die Beads in $500\mu\text{l}$ ECB++ Puffer mit 10mM DTT resuspendiert. Es wurden

entweder equimolare Mengen an rekombinantem Protein, native Zelllysate (vgl. 5.4.5) oder 2-3 μ l radioaktiv markiertes, *in vitro* translatiertes Protein zugegeben und für mindestens 3h bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden dreimal mit 500 μ l ECB, 10mM DTT, 0,25%NP-40 gewaschen und in 25 μ l SDS-Probenpuffer aufgekocht. Gebundene Proteine wurden in der SDS-Page getrennt und durch Coomassie-Färbung, Western Blot oder Autoradiogramm untersucht. Als Kontrollen dienten GST alleine oder der GST-2BC Komplex.

5.5.11.Induktion der Apoptose in zellfreien Extrakten

Zytosolische Extrakte für *in vitro* Apoptose Studien wurden wie beschrieben hergestellt (Devereaux et al., 1998). 293T Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80% inkubiert und durch Trypsinieren geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS und einmaligem Waschen in Puffer A (20 mM HEPES [pH7,5], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1mM DTT) wurden die Zellen in 1 Volumen Puffer A mit 1mM PMSF und Complete Proteaseinhibitoren resuspendiert und 20min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 30 Zügen durch eine 23G-Kanüle aufgebrochen, Zelltrümmer für 30min bei 16000g und 4°C abzentrifugiert und der Zellextrakt (etwa 25mg/ml Protein) in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. *In vitro* Caspase Aktivierungs Studien mit rekombinanten Proteinen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μ l Puffer A und 100 μ g 293T Zellextrakt durchgeführt. Die Aktivierung von Caspasen erfolgte durch Zugabe von 10 μ M Cytochrom c aus Pferdeherz (Sigma) und 1mM dATP bei 30°C für 1h. Hierbei wurden die Lysate wie angegeben mit dem Caspase-Inhibitor zVAD-fmk (Bachem) oder dem Proteasom-Inhibitor MG132 (Sigma) versetzt.

5.5.12.Herstellung von Antikörpern in Kaninchen

Für die Herstellung von Antiseren wurden 0,5-1mg rekombinant gereinigte His₆-Fusionsproteine in 500 μ l PBS 1:1 mit Freund's Adjuvanz (komplett, Sigma) gemischt. Das Gemisch wurde mit mehreren Zügen zwischen zwei Spritzen durch einen 3-Weg-Hahn in Emulsion gebracht und dem Kaninchen an mehreren Stellen subkutan gespritzt. Nach sechs bis acht Wochen erfolgte die erste Auffrischung (boost). Weitere Auffrischungen fanden dann im Abstand von vier Wochen statt. Für Auffrischungen wurden jeweils 250 μ g Protein mit Freund's Adjuvanz (inkomplett, Sigma) emulgiert und gespritzt. Testblutungen wurde jeweils zehn Tage nach der Auffrischung vorgenommen. Nach Erreichen hoher Titer spezifischer Antikörper (in der Regel nach drei Boosts) wurde zwei Wochen nach der Auffrischung das Blut entnommen. Das Blut wurde zunächst 1h bei 37°C und dann 1h auf Eis inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation bei 4000g wurde der Serumüberstand in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Kleine Aliquots des Antiserum wurden mit 1mM Natriumazid versetzt und bei 4°C zum sofortigen Gebrauch gelagert.

5.5.13. Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Hochaffine spezifische Antikörper wurden über Immuno-Affinitätschromatographie aus Kaninchenserum angereichert. Die Aufreinigung erfolgte über zwei hintereinandergeschaltete Säulen. An die erste Säule (Vorsäule) wurden ein unspezifisches Lysat aus *E. coli* Zellen gekoppelt, an die zweite Säule (Hauptsäule) das gereinigte Antigen. Beim Durchlaufen der Hauptsäule binden die spezifischen Antikörper des Serums an das Antigen und können danach eluiert werden. Als Säulenmatrix wurde CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham) verwendet. Die Kopplung und Reinigung wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Matrix wurde in 1mM HCl vorgequollen und gewaschen. Die Kopplung der Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C in Kopplungspuffer (100mM NaHCO₃, 0.5M NaCl [pH8,3]). Dazu wurden die Antigene wie unter 5.5.9 beschrieben aus *E. coli* aufgereinigt und im letzten Reinigungsschritt statt gegen PBS gegen Kopplungspuffer dialysiert. Die Konzentration der Proteine wurde durch Bradford-Messung bestimmt und ca. 12mg/500µl Matrix für die Kopplung eingesetzt. Nach der Kopplung wurden die Beads einmal mit Kopplungspuffer gewaschen und freie Bindungsstellen mit 0.2M Glyzin [pH8,0] für 2h bei RT blockiert. Anschließend wurde die Sepharose in Säulen überführt und mit verschiedenen Waschschritten vorbereitet: Vor- und Hauptsäule: 4 Vol 100mM NaAcetat [pH4,0], 0.5M NaCl; 2 Vol PBS; 2 Vol PBS/1% SDS bei 65°C; 2 Vol PBS/1% SDS; Vorsäule: 4 Vol PBS/1% Triton X-100; Hauptsäule: 2 Vol PBS/1% Triton X-100; 3 Vol PBS/1% Triton X-100/1% BSA.

10ml Serum wurden zuerst zweimal langsam über die Vorsäule gegeben und diese mit 2 Vol PBS gewaschen. Der Durchfluß von Serum und PBS wurden vereint und zweimal mit je 5ml/h über die Hauptsäule gegeben. Die Hauptsäule wurde mit 3 Vol PBS/1% Triton X-100 und 4 Vol PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Die gebundenen spezifischen Antikörper wurden mit 7x 1ml saurem Glyzin-Puffer (0.2M Glyzin, 1mM EGTA [pH2,5]) eluiert und die Fraktionen sofort in 300µl 1M Tris [pH8,0] neutralisiert. Stark bindende Antikörper wurden mit 4x 1ml 4M Guanidiniumchlorid [pH7,0] eluiert. Positive Fraktionen wurden durch photometrische Proteinkonzentrationsmessung ermittelt, vereinigt und bei 4°C gegen PBS dialysiert. Die gereinigten Antikörper wurden in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder nach Zusatz von 1mM NaN₃ kurzfristig bei 4°C aufbewahrt.

5.6. Assays

5.6.1. *In vitro* Translation (IVT)

In vitro Translationen wurden mit dem T7 TNT Quick-coupled IVT Kit (Promega) durchgeführt. 25µl Retikulozytenlysat wurden mit 1µg Plasmid-DNA und 2µl ³⁵S-Methionin (10mCi/ml) versetzt und 1h bei 30°C inkubiert. Wenn angegeben, wurde die IVT in der Anwesenheit von 100µM Eisen(II)chlorid durchgeführt.

5.6.2. Ubiquitylierungsassay

Pro Ansatz wurden 2 Schalen 293T Zellen wie unter 5.3.4 mit 4,5 μ g Flag-Plasmid und 6,5 μ g pcDNA-HA-Cul2 transfiziert. 36h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und in 500 μ l hypotonischem Puffer D (20mM HEPES/KOH [pH7,5], 5mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF, 2 μ g/ml Leupeptin, 2 μ g/ml Antipain) resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 30 Zügen durch ein 26G Kanüle aufgeschlossen und durch Zugabe von 2M NaCl eine Salzkonzentration von 0,2M NaCl eingestellt. Die Lysate wurden durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen (30min, 20000g und 1h, 40000g bei 4°C) geklärt. Flag-getaggte Proteine wurden durch Inkubation von gleichen Mengen an Gesamtprotein mit 35 μ l anti-Flag M2 Beads über Nacht bei 4°C präzipitiert. Die Beads wurden dreimal mit Puffer E (25mM Tris-HCl [pH7,5], 0,5M NaCl, 0,1% NP-40, 1mM EDTA) und dreimal mit PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurde 1/20 Volumen entnommen, die Beads durch Zentrifugation sedimentiert und in 25 μ l SDS-Probenpuffer aufgeköcht (Inputkontrolle). Die restlichen Beads wurden nach Zentrifugation in 50 μ l Assaypuffer (40mM Tris-HCl [pH7,5], 5mM MgCl₂, 0,6mM DTT, 25 μ M MG132) resuspendiert und auf dem Drehrad 2h bei 4°C mit 2 μ l *in vitro* Translatat inkubiert. Zum Null-Zeitpunkt wurden 7 μ l Assaypuffer mit 125ng E1 (Uba1), 625ng E2 (GST-UbcH5a), 1,2 μ g Ubiquitinaldehyd (alle Affiniti), 2,4 μ g Ubiquitin (Sigma) und 3.3mM ATP zugegeben und die Reaktion durch Transfer zu 37°C gestartet. Nach 0, 30, 60 und 120min wurden Aliquots entnommen und im gleichen Volumen Probenpuffer aufgeköcht. Die Proben wurden durch SDS-Page und Autoradiographie untersucht.

5.6.3. Transaktivierungsassay

HeLa Zellen wurden in 6-well Schalen ausgesäht (3x 10⁵ Zellen/well) und mit Lipofectamin (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurden 400pg eines Reporterplasmids für Renilla Luziferase unter dem SV40 Promotor transfiziert. Als Reporter für die untersuchten Transkriptionsfaktoren wurden Plasmide mit Firefly Luziferase und unterschiedlichen Bindestellen verwendet:

200ng Gal4-TK-Luc	Gal4-Bindestelle (Hollenbach et al., 1999)
1 μ g LB486	Ets1-Bindestellen (Chen und Boxer, 1995)
1 μ g pGL3 PKG6	<i>HIF responsive elements</i> aus dem PKG6 Reporter (Wood et al., 1998)

Zusätzlich wurden die Zellen mit den angegebenen Plasmiden zur Expression der zu untersuchenden Proteine transfiziert. Der Assay wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) durchgeführt.

Die Zellen wurden 30h nach der Transfektion mit PBS gewaschen und mit 300 μ l/well 1x PLB Puffer (Promega) versetzt. Die 12-well Platten wurden für 15min bei RT und 60rpm geschüttelt. Je 20 μ l Zelllysate wurde zu 100 μ l

LARII-Lösung (Promega) in ein Luminometerröhrchen gegeben und die Emission der Firefly-Luziferase für 10 Sekunden in einem Lumat LB9507 (Bertholt) gemessen. Durch Zugabe von 100 μ l Stop&Glo Lösung (Promega) wurde die Lumineszenz der Firefly-Luziferase gequencht und die Aktivität der Renilla Luziferase für 10 Sekunden gemessen. Die Aktivität wurde auf die Aktivität der Renilla Luziferase normiert. Für jeden Ansatz wurden Doppelmessungen mit Lysaten aus drei unabhängigen Transfektionen durchgeführt, die Werte gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

5.7. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen in einer 12-well Schale auf runden, sterilen Deckgläschen (1x 10⁵ Zellen/well) ausgesät und bei 37°C/7,5% CO₂ inkubiert. Wenn angegeben, wurden die Zellen am nächsten Tag mit Lipofectamin (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach weiteren 24h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 1ml Permeabilisationspuffer (100mM Pipes/KOH [pH6,8], 10mM EGTA/KOH, 1mM MgCl₂, 0,2% Triton X-100) mit 4% Formaldehyd (Sigma) fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden 10min bei RT inkubiert und der Puffer durch Aspiration entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit TBST (50mM Tris-HCl, [pH7,5], 8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 0,1% Tween) gewaschen und mit 2% BSA Fraktion V (Sigma) in TBST für 30min bei RT blockiert. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach oben auf Parafilm in eine Feuchtkammer gelegt und mit 50 μ l Antikörperlösung (angegebene Verdünnung in Blocklösung) bedeckt. Nach Inkubation für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C wurden die Deckgläschen zurück in die 12-well Schale transferiert, dreimal mit TBST gewaschen und erneut in der Feuchtkammer für 1h bei RT mit dem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper (1:200) inkubiert. Die Zellen wurden im 12-well für 2min mit 50 μ g/ml DAPI in TBST inkubiert und anschließend zweimal mit TBST gewaschen. Nach einem letzten Waschschrift mit TBS wurde der Puffer gründlich entfernt, das Deckgläschen mit 10 μ l Mounting Medium (0,5% para-Phenylendiamin in 20mM Tris-HCl [pH9,0], 90% Glycerin) auf den Objektträger gebracht und mit Nagellack fixiert. Die Zellen wurden mit einem Leica Mikroskop (DM RXA) mit Standardfiltern für DAPI und Fluorophore analysiert. Bilder wurden mit einer Digitalkamera (Hamamatsu C4742-95) aufgenommen und mit der OpenLab Software (Improvision) ausgewertet.

5.8. Verwendete Plasmide

5.8.1. Expression in *E. coli*

Name	Vektor	Insert	Quelle
pBB75	pBB75-C	ElonginC 17-112	(Stebbins et al., 1999)
pVB wt	pVB	pVHL ₁₉ wt / Elongin B	
pVB 98H	pVB	pVHL ₁₉ Y98H / EL B	diese Arbeit
pVB 98N	pVB	pVHL ₁₉ Y98N / EL B	
pVB Socs1	pVB	Socs1 wt / ELB	
pGEX-4T1	pGEX-4T1	-	Amersham Pharmacia
His-DaxxΔC	pET28(+)	Daxx 1-591	diese Arbeit

5.8.2. Expression in *S. cerevisiae*

Name	Vektor	Insert	Quelle
GalAD-HIF1 α	pACT2 (Clontech)	HIF1 α	diese Arbeit
GalBD-HIF1 α	pAS2-1 (Clontech)	HIF1 α	
GalBD-HIF1-ODD	pAS2-1	HIF1 α 403–603	
GalAD-VHL	pACT2	pVHL ₃₀	
GalBD-VHL	pAS2-1	pVHL ₃₀	(Pause et al., 1999)
GalBD-Cul2	pAS2-1	Cul2	
GalBD Daxx	pAS2-1	Daxx	diese Arbeit
GalAD YY1AP	pGAD	YY1AP	
GalAD Calpn7	pGAD	Calpn7	
GalAD THOC1	pGAD	THOC1	
GalAD Daxx	pGAD	Daxx	
GalAD KIF2C	pACT2	KIF2C	
p19/PHD3	pBridge (Clontech)	pVHL ₁₉ / PHD3	
p30/PHD3	pBridge	pVHL ₃₀ / PHD3	
-/PHD3	pBridge	- / PHD3	
p19/-	pBridge	pVHL ₁₉ / -	

5.8.3. Expression in Säugerzellen

Name	Vektor	Insert	Quelle
Flag-pVHL ₁₉ wt	pCMV2 (Stratagene)	pVHL ₁₉	diese Arbeit
Flag-pVHL ₁₉	pCMV2	pVHL ₁₉	
HA-pVHL ₁₉ wt	pcDNA-HA	pVHL ₁₉ wt	(Hergovich et al., 2003)
HA-pVHL ₁₉ 98H	pcDNA-HA	pVHL ₁₉ Y98H	
HA-pVHL ₁₉ 98N	pcDNA-HA	pVHL ₁₉ Y98N	
HA-pVHL ₁₉ 162F	pcDNA-HA	pVHL ₁₉ C162F	
Myc-Luciferase	pCMV3	Luciferase	Bartke T., MPI für Biochemie
Flag-Socs1	pCMV2	Socs1	diese Arbeit
Flag-Socs3	pCMV2	Socs3	
Myc-Cul2	pCMV3	Cul2	
HA-Cul2	pcDNA3.1 HA	Cul2	Maher E., University of Birmingham
Myc-PHD1	pcDNA3.1/MycHisA	PHD1	(Bruick und McKnight, 2001)
Myc-PHD2	pcDNA3.1/MycHisA	PHD2	
Myc-PHD3	pcDNA3.1/MycHisA	PHD3	
Myc-Daxx	pCMV3 (Stratagene)	Daxx	diese Arbeit
Myc-Daxx K630R	pCMV3	Daxx K630R	
Myc-Daxx K631R	pCMV3	Daxx K631R	
Myc-Daxx KK/RR	pCMV3	Daxx K630R/K631R	
GFP-p122	pEGFP-C1	p122 (Ratte)	(Sekimata et al., 1999)
Myc-DLC1	pCMV3	DLC1	diese Arbeit
DGK _i wt	pCMV-HA	DGK _i wt	(Ding et al., 1998)
DGK _i P147A	pCMV-HA	DGK _i P147A	diese Arbeit
DGK _i P903A	pCMV-HA	DGK _i P903A	
DGK _i PPAA	pCMV-HA	DGK _i P147A/ P903A	
DGK _i ΔC1	pCMV-HA	DGK _i Δ138-317	
Flag-YY1AP	pCMV2	YY1AP	
Flag-Calpn7	pCMV2	Calpn7	
Flag-THOC1	pCMV2	THOC1	
HA-KIF2C	CMV/FA (Stemmann O.)	KIF2C	Müller S., MPI für Biochemie
His-Ubi	pcDNA3.1	Ubiquitin	
HA-Ubi	pcDNA3.1	Ubiquitin	
pRL		Luziferase	(Hollenbach et al., 1999)
HA-Ets1		Ets1	
Gal-TK-Luc		Luziferase	(Chen und Boxer, 1995)
GalBD-Daxx		Daxx	
pGL3 control		Luziferase	(Wood et al., 1998)
pGL3 PGK6		Luziferase	
HIF1 α wt	pcDNA3	HIF1 α wt	
HIF1 α PPAG	pcDNA3	HIF1 α P402A/P564G	

5.9. Verwendete Antikörper

5.9.1. Monoklonale Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung im Western Blot
Flag-M2	Sigma	1:5000
myc 9E10	Santa Cruz	1:5000
IgG1 Kontroll Ab	Sigma	1:2500
VHL Ig32	Pharmingen	1:1000
CUL2 CTD	Novus Biologicals	1:2500
HIF1 α	Novus Biologicals	1:500
β -tubulin	Sigma	1:10000
Daxx-01	Abcam	1:2500
HA F7	Santa Cruz	1:5000
Caspase3	BD Transduction Laboratories	1:2000

5.9.2. Polyklonale Antikörper

Antikörper	Quelle	Verdünnung im Western Blot
Elongin B (AB04)	A. Buchberger, MPI für Biochemie	1:1000
Elongin C (AB06)		1:1000
Daxx 1-591 (AB16)	diese Arbeit	1:5000
DGK ι 1-314 (AB30)		1:10000
DGK ι 748-1065 (AB29)		1:10000

6. Literaturverzeichnis

An, W. G., Kanekal, M., Simon, M. C., Maltepe, E., Blagosklonny, M. V., und Neckers, L. M. (1998). Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* *392*, 405-408.

Arden, G. B., Wolf, J. E., und Tsang, Y. (1998). Does dark adaptation exacerbate diabetic retinopathy? Evidence and a linking hypothesis. *Vision Res* *38*, 1723-1729.

Boellmann, F., Guettouche, T., Guo, Y., Fenna, M., Mnayer, L., und Voellmy, R. (2004). DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4100-4105.

Bruick, R. K., und McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* *294*, 1337-1340.

Chen, H. M., und Boxer, L. M. (1995). Pi 1 binding sites are negative regulators of bcl-2 expression in pre-B cells. *Mol Cell Biol* *15*, 3840-3847.

Chen, L. Y., und Chen, J. D. (2003). Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol* *23*, 7108-7121.

Cookson, M. R. (2004). The Biochemistry of Parkinson's Disease. *Annu Rev Biochem*.

Corn, P. G., McDonald, E. R., 3rd, Herman, J. G., und El-Deiry, W. S. (2003). Tat-binding protein-1, a component of the 26S proteasome, contributes to the E3 ubiquitin ligase function of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Genet* *35*, 229-237.

Ding, L., Traer, E., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., und Prescott, S. M. (1998). The cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase, DGKiota. *J Biol Chem* *273*, 32746-32752.

Doostzadeh-Cizeron, J., Evans, R., Yin, S., und Goodrich, D. W. (1999). Apoptosis induced by the nuclear death domain protein p84N5 is inhibited by association with Rb protein. *Mol Biol Cell* *10*, 3251-3261.

Doostzadeh-Cizeron, J., Terry, N. H., und Goodrich, D. W. (2001). The nuclear death domain protein p84N5 activates a G2/M cell cycle checkpoint prior to the onset of apoptosis. *J Biol Chem* *276*, 1127-1132.

Drasdo, N., Chiti, Z., Owens, D. R., und North, R. V. (2002). Effect of darkness on inner retinal hypoxia in diabetes. *Lancet* *359*, 2251-2253.

Durfee, T., Mancini, M. A., Jones, D., Elledge, S. J., und Lee, W. H. (1994). The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that co-localizes to centers for RNA processing. *J Cell Biol* 127, 609-622.

Ecsedy, J. A., Michaelson, J. S., und Leder, P. (2003). Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 23, 950-960.

Elson, D. A., Thurston, G., Huang, L. E., Ginzinger, D. G., McDonald, D. M., Johnson, R. S., und Arbeit, J. M. (2001). Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev* 15, 2520-2532.

Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G., und Flamme, I. (2003). Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem* 278, 7520-7530.

Emelyanov, A. V., Kovac, C. R., Sepulveda, M. A., und Birshstein, B. K. (2002). The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells. *J Biol Chem* 277, 11156-11164.

Evans, R. L., Poe, B. S., und Goodrich, D. W. (2002). Nuclear localization is required for induction of apoptotic cell death by the Rb-associated p84N5 death domain protein. *Oncogene* 21, 4691-4695.

Furlong, E. E., Rein, T., und Martin, F. (1996). YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol Cell Biol* 16, 5933-5945.

Gafni, J., Hermel, E., Young, J. E., Wellington, C. L., Hayden, M. R., und Ellerby, L. M. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem* 279, 20211-20220.

Gasparri, F., Sola, F., Locatelli, G., und Muzio, M. (2004). The death domain protein p84N5, but not the short isoform p84N5s, is cell cycle-regulated and shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *FEBS Lett* 574, 13-19.

Gelman, M. S., und Kopito, R. R. (2003). Cystic fibrosis: premature degradation of mutant proteins as a molecular disease mechanism. *Methods Mol Biol* 232, 27-37.

Gnarra, J. R., Ward, J. M., Porter, F. D., Wagner, J. R., Devor, D. E., Grinberg, A., Emmert-Buck, M. R., Westphal, H., Klausner, R. D., und Linehan, W. M. (1997). Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9102-9107.

Haase, V. H. (2005). The VHL tumor suppressor in development and disease: Functional studies in mice by conditional gene targeting. *Semin Cell Dev Biol.*

Hansson, L. O., Friedler, A., Freund, S., Rudiger, S., und Fersht, A. R. (2002). Two sequence motifs from HIF-1alpha bind to the DNA-binding site of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10305-10309.

Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., Ballschmieter, P., und Krek, W. (2003). Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat Cell Biol* *5*, 64-70.

Hollenbach, A. D., Sublett, J. E., McPherson, C. J., und Grosveld, G. (1999). The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *Embo J* *18*, 3702-3711.

Homma, Y., und Emori, Y. (1995). A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *Embo J* *14*, 286-291.

Hon, W. C., Wilson, M. I., Harlos, K., Claridge, T. D., Schofield, C. J., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., Stuart, D. I., und Jones, E. Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* *417*, 975-978.

Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., und Kaelin, W. G., Jr. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* *1*, 822-826.

Ishov, A. M., Vladimirova, O. V., und Maul, G. G. (2004). Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J Cell Sci* *117*, 3807-3820.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J. M., Lane, W. S., und Kaelin, W. G., Jr. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* *292*, 464-468.

Jain, S., Maltepe, E., Lu, M. M., Simon, C., und Bradfield, C. A. (1998). Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse. *Mech Dev* *73*, 117-123.

Jang, M. S., Ryu, S. W., und Kim, E. (2002). Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun* *295*, 495-500.

Jentsch, S., und Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* *10*, 335-342.

Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R. C., Conaway, J. W., und Nakayama, K. I. (2004). VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* 18, 3055-3065.

Kawai, K., Yamaga, M., Iwamae, Y., Kiyota, M., Kamata, H., Hirata, H., Homma, Y., und Yagisawa, H. (2004). A PLCdelta1-binding protein, p122RhoGAP, is localized in focal adhesions. *Biochem Soc Trans* 32, 1107-1109.

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, 963-972.

Kracklauer, M. P., und Schmidt, C. (2003). At the crossroads of SUMO and NF-kappaB. *Mol Cancer* 2, 39.

Kuznetsova, A. V., Meller, J., Schnell, P. O., Nash, J. A., Ignacak, M. L., Sanchez, Y., Conaway, J. W., Conaway, R. C., und Czyzyk-Krzeska, M. F. (2003). von Hippel-Lindau protein binds hyperphosphorylated large subunit of RNA polymerase II through a proline hydroxylation motif and targets it for ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2706-2711.

Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., und Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16, 1466-1471.

Lavista-Llanos, S., Centanin, L., Irisarri, M., Russo, D. M., Gleadle, J. M., Bocca, S. N., Muzzopappa, M., Ratcliffe, P. J., und Wappner, P. (2002). Control of the hypoxic response in *Drosophila melanogaster* by the basic helix-loop-helix PAS protein similar. *Mol Cell Biol* 22, 6842-6853.

Lee, S., Chen, D. Y., Humphrey, J. S., Gnarra, J. R., Linehan, W. M., und Klausner, R. D. (1996). Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1770-1775.

Li, D., Hirsila, M., Koivunen, P., Brenner, M. C., Xu, L., Yang, C., Kivirikko, K. I., und Myllyharju, J. (2004). Many amino acid substitutions in a hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-1alpha-like peptide cause only minor changes in its hydroxylation by the HIF prolyl 4-hydroxylases: substitution of 3,4-dehydroproline or azetidine-2-carboxylic acid for the proline leads to a high rate of uncoupled 2-oxoglutarate decarboxylation. *J Biol Chem* 279, 55051-55059.

Li, Z., Na, X., Wang, D., Schoen, S. R., Messing, E. M., und Wu, G. (2002). Ubiquitination of a novel deubiquitinating enzyme requires direct binding to von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 277, 4656-4662.

Li, Z., Wang, D., Na, X., Schoen, S. R., Messing, E. M., und Wu, G. (2003). The VHL protein recruits a novel KRAB-A domain protein to repress HIF-1 α transcriptional activity. *Embo J* 22, 1857-1867.

Lin, D. Y., Fang, H. I., Ma, A. H., Huang, Y. S., Pu, Y. S., Jenster, G., Kung, H. J., und Shih, H. M. (2004). Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx. *Mol Cell Biol* 24, 10529-10541.

Lolkema, M. P., Gervais, M. L., Snijckers, C. M., Hill, R. P., Giles, R. H., Voest, E. E., und Ohh, M. (2005). Tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain. *J Biol Chem*.

Lolkema, M. P., Mehra, N., Jorna, A. S., van Beest, M., Giles, R. H., und Voest, E. E. (2004). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein influences microtubule dynamics at the cell periphery. *Exp Cell Res* 301, 139-146.

Mahon, P. C., Hirota, K., und Semenza, G. L. (2001). FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15, 2675-2686.

Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W. J., Tanaka, H., und Poellinger, L. (2002). Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3 α locus. *J Biol Chem* 277, 32405-32408.

Maranchie, J. K., Vasselli, J. R., Riss, J., Bonifacino, J. S., Linehan, W. M., und Klausner, R. D. (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF1- α to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 1, 247-255.

Mazure, N. M., Brahim-Horn, M. C., Berta, M. A., Benizri, E., Bilton, R. L., Dayan, F., Ginouves, A., Berra, E., und Pouyssegur, J. (2004). HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem Pharmacol* 68, 971-980.

Mekhail, K., Gunaratnam, L., Bonicalzi, M. E., und Lee, S. (2004). HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nat Cell Biol* 6, 642-647.

Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxsen, J. H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W. Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., *et al.* (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116, 1319-1326.

Michaelson, J. S., und Leder, P. (2003). RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci* 116, 345-352.

Miller, F., Kentsis, A., Osman, R., und Pan, Z. Q. (2005). Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL-hypoxia-inducible transcription factor-1 α complex. *J Biol Chem* 280, 7985-7996.

Min, J. H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W. G., Jr., und Pavletich, N. P. (2002). Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* *296*, 1886-1889.

Mukhopadhyay, D., Knebelmann, B., Cohen, H. T., Ananth, S., und Sukhatme, V. P. (1997). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol Cell Biol* *17*, 5629-5639.

Na, X., Duan, H. O., Messing, E. M., Schoen, S. R., Ryan, C. K., di Sant'Agnes, P. A., Golemis, E. A., und Wu, G. (2003). Identification of the RNA polymerase II subunit hsRPB7 as a novel target of the von Hippel-Lindau protein. *Embo J* *22*, 4249-4259.

Ng, I. O., Liang, Z. D., Cao, L., und Lee, T. K. (2000). DLC-1 is deleted in primary hepatocellular carcinoma and exerts inhibitory effects on the proliferation of hepatoma cell lines with deleted DLC-1. *Cancer Res* *60*, 6581-6584.

Ogawa, T., Nitta, R., Okada, Y., und Hirokawa, N. (2004). A common mechanism for microtubule destabilizers-M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* *116*, 591-602.

Ohh, M., Yauch, R. L., Lonergan, K. M., Whaley, J. M., Stemmer-Rachamimov, A. O., Louis, D. N., Gavin, B. J., Kley, N., Kaelin, W. G., Jr., und Iliopoulos, O. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* *1*, 959-968.

Oikawa, M., Abe, M., Kurosawa, H., Hida, W., Shirato, K., und Sato, Y. (2001). Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* *289*, 39-43.

Okuda, H., Hirai, S., Takaki, Y., Kamada, M., Baba, M., Sakai, N., Kishida, T., Kaneko, S., Yao, M., Ohno, S., und Shuin, T. (1999). Direct interaction of the beta-domain of VHL tumor suppressor protein with the regulatory domain of atypical PKC isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* *263*, 491-497.

Ostrov, S. E., Gaitatzes, C. G., und Friedmann, A. L. (1993). Hypoxia inhibits rhodopsin regeneration in the excised mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *34*, 447-452.

Pal, S., Claffey, K. P., Dvorak, H. F., und Mukhopadhyay, D. (1997). The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathways. *J Biol Chem* *272*, 27509-27512.

Pause, A., Peterson, B., Schaffar, G., Stearman, R., und Klausner, R. D. (1999). Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9533-9538.

Petroski, M. D., und Deshaies, R. J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 9-20.

Pickart, C. M., und Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* *1695*, 55-72.

Qi, H., und Ohh, M. (2003). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res* *63*, 7076-7080.

Rankin, E. B., Higgins, D. F., Walisser, J. A., Johnson, R. S., Bradfield, C. A., und Haase, V. H. (2005). Inactivation of the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (arnt) suppresses von hippel-lindau disease-associated vascular tumors in mice. *Mol Cell Biol* *25*, 3163-3172.

Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G., Sowter, H. M., Mandriota, S. J., Li, J. L., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., Harris, A. L., und Ratcliffe, P. J. (2005). Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. *Mol Cell Biol* *25*, 5675-5686.

Regier, D. S., Higbee, J., Lund, K. M., Sakane, F., Prescott, S. M., und Topham, M. K. (2005). Diacylglycerol kinase iota regulates Ras guanyl-releasing protein 3 and inhibits Rap1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7595-7600.

Riggs, K. J., Saleque, S., Wong, K. K., Merrell, K. T., Lee, J. S., Shi, Y., und Calame, K. (1993). Yin-yang 1 activates the c-myc promoter. *Mol Cell Biol* *13*, 7487-7495.

Schmid, T., Zhou, J., Kohl, R., und Brune, B. (2004). p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J* *380*, 289-295.

Schofield, C. J., und Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 343-354.

Sekimata, M., Kabuyama, Y., Emori, Y., und Homma, Y. (1999). Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho. *J Biol Chem* *274*, 17757-17762.

Shen, C., Nettleton, D., Jiang, M., Kim, S. K., und Powell-Coffman, J. A. (2005). Roles of HIF-1/ hypoxia inducible factor during hypoxia response in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*.

Stebbins, C. E., Kaelin, W. G., Jr., und Pavletich, N. P. (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284, 455-461.

Stickle, N. H., Chung, J., Klco, J. M., Hill, R. P., Kaelin, W. G., Jr., und Ohh, M. (2004). pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol Cell Biol* 24, 3251-3261.

Suzuki, H., Tomida, A., und Tsuruo, T. (2001). Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* 20, 5779-5788.

Takahashi, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., und de The, H. (2004). PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* 23, 2819-2824.

Tang, J., Wu, S., Liu, H., Strat, R., Barak, O. G., Shiekhattar, R., Picketts, D. J., und Yang, X. (2004). A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J Biol Chem* 279, 20369-20377.

Temes, E., Martin-Puig, S., Acosta-Iborra, B., Castellanos, M. C., Feijoo-Cuaresma, M., Olmos, G., Aragones, J., und Landazuri, M. O. (2005). Activation of HIF-prolyl hydroxylases by R59949, an inhibitor of the diacylglycerol kinase. *J Biol Chem*.

Temes, E., Martin-Puig, S., Aragones, J., Jones, D. R., Olmos, G., Merida, I., und Landazuri, M. O. (2004). Role of diacylglycerol induced by hypoxia in the regulation of HIF-1alpha activity. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 44-50.

Toman, P. D., Chisholm, G., McMullin, H., Giere, L. M., Olsen, D. R., Kovach, R. J., Leigh, S. D., Fong, B. E., Chang, R., Daniels, G. A., *et al.* (2000). Production of recombinant human type I procollagen trimers using a four-gene expression system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 23303-23309.

Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A., und Reed, J. C. (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *Embo J* 18, 6037-6049.

Wang, C. Y., Liang, Y. J., Lin, Y. S., Shih, H. M., Jou, Y. S., und Yu, W. C. (2004). YY1AP, a novel co-activator of YY1. *J Biol Chem* 279, 17750-17755.

Willems, A. R., Schwab, M., und Tyers, M. (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695, 133-170.

Wood, S. M., Wiesener, M. S., Yeates, K. M., Okada, N., Pugh, C. W., Maxwell, P. H., und Ratcliffe, P. J. (1998). Selection and analysis of a mutant cell line defective in the hypoxia-inducible factor-1 alpha-subunit (HIF-1alpha). Characterization of hif-1alpha-dependent and -independent hypoxia-inducible gene expression. *J Biol Chem* 273, 8360-8368.

Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., und Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067-1076.

Yuan, B. Z., Jefferson, A. M., Baldwin, K. T., Thorgeirsson, S. S., Popescu, N. C., und Reynolds, S. H. (2004). DLC-1 operates as a tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas. *Oncogene* 23, 1405-1411.

Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., *et al.* (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709.

Zhou, M. I., Wang, H., Ross, J. J., Kuzmin, I., Xu, C., und Cohen, H. T. (2002). The von Hippel-Lindau tumor suppressor stabilizes novel plant homeodomain protein Jade-1. *J Biol Chem* 277, 39887-39898.

Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acid/Aminosäure
Abb	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
APC/C	anaphase promoting complex/cyclosome
APS	Ammoniumperoxodisulphat
3-AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosin-Triphosphat
B	Beads
BD	Bindedomäne
BTB	Bric a brac, Tramtrack und Broad complex
CBC	Cullin2-Elongin B-Elongin C
cDNA	complementary DNA
CHX	Cycloheximid
cyto C	Cytochrom C
dATP	Deoxyadenosin Triphosphat
DGK	Diacylglycerol Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced GFP
ELB	Elongin B
ELC	Elongin C
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum
FT	flow through
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HBS	HEPES buffered saline
HC	heavy chain, Antikörper-Schwerkette
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIF	hypoxia inducible factor
IF	Immunofluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IVT	in vitro Translation
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
k.o.	knock-out
L	Lysat
LC	light chain, Antikörper-Leichtkette
Luc	Luciferase
M	molar, Proteinmarker
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NB	nuclear bodies
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat

Abkürzungsverzeichnis

NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
ODD	oxygen-dependent degradation
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Pulldown
PHD	Prolylhydroxylase
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethyldisulphonylfluorid
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
SC	synthetic complete (Medium)
SCF	Skp1-Cullin-F-box
sec	Sekunde
SDS	sodium dodecylsulphate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
SOCS	suppressor of cytokine signalling
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units
Ub	Ubiquitin
UBC	ubiquitin-conjugating enzyme
ÜS	Überstand
UV	ultraviolett
VCB	von Hippel Lindau/Elongin C/Elongin B
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel Lindau
WB	Westernblot/Immunblot
WT	Wildtyp
zVAD-fmk	N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluoromethyl-Keton

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Alexander Buchberger für das interessante Projekt bedanken. Seine Unterstützung und die große experimentelle Freiheit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Stefan Jentsch möchte ich mich für das anhaltende Interesse an meinem Projekt und die angenehme Atmosphäre in seiner Abteilung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Charles N. David aus der Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Silvia Dambacher, deren Arbeit an dem „Two-Hybrid“-Screen ein entscheidender Beitrag für das VHL-Projekt war.

Ganz lieb danke ich meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Buchberger für experimentelles Teamwork und gute Stimmung, vor allem meiner Mitstreiterin auf dem VHL-Projekt Katja.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Zellbiologie. Ohne Euch wär's nur halb so lustig!

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich in meinen Entscheidungen immer unterstützt haben. Sie haben mich von Anfang an ermutigt zu hinterfragen, was die Welt im Innersten zusammenhält.

Zuletzt möchte ich mich bei Boris für sein Verständnis, seine Liebe und unzählige wissenschaftliche Ratschläge bedanken.

LEBENS LAUF – CLAUDIA BEX

Name Claudia Bex
Adresse Guido-Schneble-Str. 47
80689 München
Tel.: 089/2170 6768
Geburtsdatum 03. September 1975
Geburtsort Leverkusen

Schulbildung

1982-1986 Auefeld-Grundschule Kassel
1986-1995 Engelsburg-Gymnasium Kassel
Abschluss mit Abitur im Juni 1995

Studium

1995-2000 Westfälische-Wilhelms-Universität Münster
Studiengang: Diplom-Chemie
Diplomarbeit über "Membraninteraktion und Aktivierung der Raf Kinase: Einfluß von Mutationen in der RafC1-Domäne" am Institut für Biochemie (Arbeitsgruppe Prof. Galla)
Abschluss mit Diplom Chemie im Juli 2000
1998-1999 Gaststudium an der University of Alberta, Edmonton, Kanada
Studienarbeit über "Regulation of rRNA transcription by TOR family kinases" (Arbeitsgruppe Prof. Schultz)

Doktorarbeit

Seit Dez. 2000 Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Abteilung für Molekulare Zellbiologie (Prof. Stefan Jentsch)