

# **Untersuchungen zur molekularen Grundlage unterschiedlicher Krankheitsbilder der von Hippel-Lindau Erbkrankheit**

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

vorgelegt von  
Diplom-Biochemikerin  
Katja Knauth

11. Juli 2006

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.

Katja Knauth  
München, den 11. Juli 2006

Promotionsgesuch eingereicht am 11. Juli 2006

Tag der mündlichen Prüfung: 21. August 2006

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Januar 2002 und Juli 2006 unter der Anleitung von Dr. Alexander Buchberger am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgender Publikation veröffentlicht:

Knauth K., Bex C., Jemth P., Buchberger A. (2006).  
Renal cell carcinoma risk in type 2 von Hippel-Lindau disease correlates with defects in pVHL stability and HIF1 $\alpha$  interactions.  
Oncogene 25 (3) 370-377

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1. pVHL ist ein Tumorsuppressor	2
2.1.1. Das <i>VHL</i> -Gen	2
2.1.2. Die VHL Krankheit	3
2.1.3. Das VHL-Protein (pVHL)	6
2.2. Das Ubiquitin-System	9
2.2.1. Der CBC <sup>VHL</sup> -E3-Ligase-Komplex	11
2.3. Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor (HIF)	12
2.4. Defekte Tumor-assoziiierter pVHL-Mutanten	18
2.4.1. Typ 2A- und Typ 2B-Mutanten	20
2.4.2. Typ 2C-Mutanten	21
2.5. Zielsetzung der Arbeit	24
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1. Biochemische Charakterisierung von pVHL-Mutanten des Krankheitstyps 2A und 2B	25
3.1.1. Reinigung rekombinanter VCB-Komplexe	25
3.1.2. Assemblierung der VCB-Komplexe	26
3.1.2.1. <i>In vitro</i> Assemblierung	26
3.1.2.2. <i>In vivo</i> Assemblierung der CBC <sup>VHL</sup> -Komplexe	28
3.1.3. Stabilität der VCB-Komplexe	29
3.1.3.1. Chemische Denaturierung	29
3.1.3.2. Partielle Proteolyse	32
3.1.4. Bindungsstudien der VCB-Komplexe	32
3.1.4.1. Etablierung eines Modellsubstrates	32
3.1.4.2. Bindungsaffinitäten	34
3.1.4.3. Studien zur Substratbindungskinetik der VCB-Komplexe	36
3.1.4.4. Partielle Proteolyse mit den Peptiden	39
3.1.5. Aktivität der CBC <sup>VHL</sup> -Ubiquitin-Ligase-Komplexe	41
3.1.6. Zusammenfassung Typ 2A- und 2B-Mutanten	43
3.2. Analyse von Typ 2C-assoziierten pVHL-Mutanten	43
3.2.1. Assemblierung der VHL-Mutanten	44
3.2.1.1. TRiC-abhängige Assemblierung	44
3.2.1.2. Immunpräzipitation der CBC <sup>VHL</sup> -Komplexe	45
3.2.2. Stabilität der VCB-Komplexe	45
3.2.2.1. Chemische Denaturierung	45
3.2.2.2. Partielle Proteolyse	47
3.2.3. Bindungsstudien der VCB-Komplexe	48
3.2.3.1. Gleichgewichtstitrationen	48
3.2.3.2. Partielle Proteolyse mit den Peptiden	49
3.2.4. Weitere quantitative Studien	50

3.2.4.1. Analytische Gelfiltration	50
3.2.4.2. Kinetik der Komplex-Deassemblierung	52
3.2.5. Zusammenfassung der Typ 2C-Mutanten	55
<b>4. Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1. Biophysikalische Charakterisierung des Wildtyp-VCB-Komplexes	57
4.2. Das höhere Risiko für Nierenzellkarzinome im VHL-Krankheitstyp 2B korreliert mit Defekten in der pVHL-Stabilität und in HIF1 $\alpha$ Interaktionen	60
4.3. Typ 2C-Mutanten besitzen Assemblierungsdefekte	62
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>67</b>
5.1. Computeranalysen	67
5.2. Mikrobiologische Methoden	67
5.3. Zellbiologische Methoden	69
5.4. Molekularbiologische Methoden	71
5.5. Proteinbiochemische Methoden	75
5.6. Verwendete Plasmide	88
<b>6. Literatur</b>	<b>89</b>
Abkürzungsverzeichnis	
Danksagung	
Lebenslauf	

# 1. Zusammenfassung

Das von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein (pVHL) ist die substraterkennende Untereinheit des CBC<sup>VHL</sup>-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Die am besten charakterisierte Funktion dieses Komplexes ist die Ubiquitylierung der  $\alpha$ -Untereinheit des Hypoxia-induzierten Transkriptionsfaktors HIF1. HIF1 reguliert die Expression zahlreicher Zielgene, welche vor allem die Vaskularisierung und Nährstoffversorgung von Geweben steuern. Mutationen im *VHL* Gen verhindern den Abbau von HIF1 $\alpha$ , führen zur konstitutiven Aktivierung der HIF1 $\alpha$ -Zielgene und sind mit dem von Hippel-Lindau-Tumorsyndrom assoziiert. Diese Erbkrankheit wurde aufgrund ihrer unterschiedlichen klinischen Manifestationen in einzelne Subklassen unterteilt. Während bei Typ 2C nur Tumoren des Nebennierenmarks (Phäochromozytome) auftreten, weisen Typ 2A und 2B neben Phäochromozytomen und Hämangioblastomen der Retina und des ZNS ein geringes (Typ 2A) bzw. hohes (Typ 2B) Risiko für Nierenzellkarzinome auf. Die molekulare Grundlage dieser komplexen Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp ist bisher nicht genau verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die biochemische Charakterisierung von Tumor-assoziierten VHL-Mutanten-Proteinen die molekularen Ursachen der unterschiedlichen Phänotypen aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden quantitative *in vitro*-Testsysteme für Assemblierung, Stabilität, sowie Bindung und Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$  entwickelt. Dabei zeigte sich, dass die Typ 2B-Mutanten eine geringere Stabilität, sowie niedrigere Bindungsaffinitäten und Ubiquitylierungs-Aktivitäten gegenüber HIF1 $\alpha$  aufwiesen. Die Schwere der gefundenen Defekte korreliert so mit dem Risiko, Nierenzellkarzinome auszubilden. Die Untersuchungen von Typ 2C-Mutanten ergaben, dass diese zwar normale Affinitäten für HIF1 $\alpha$ , aber deutliche Assemblierungsdefekte aufwiesen und demnach keine stabilen Ubiquitin-Ligase-Komplexe bilden konnten.

Die Ergebnisse dieser quantitativen Untersuchungen konnten in bisherigen qualitativen Studien nicht erzielt werden und belegen somit die Wichtigkeit einer exakten biochemischen Charakterisierung für das Verständnis der molekularen Ursachen der von Hippel-Lindau Erbkrankheit.

## 2. Einleitung

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Industrieländern. Jährlich erkranken etwa 400000 Menschen in Deutschland an Krebs, besonders häufig sind Brust-, Lungen-, und Darmkrebs.

Durch molekulargenetische Studien von Geweben aus Krebspatienten konnten verschiedene Tumorsuppressoren identifiziert werden. Sie regulieren verschiedene zelluläre Aktivitäten, wie den Zellzyklus, die Detektion und Reparatur von DNA-Schäden, die Ubiquitylierung von Proteinen, die Zelldifferenzierung und die Zellmigration. Tumorsuppressoren halten die Anzahl entarteter Zellen gering, indem sie deren Teilung verhindern oder den programmierten Zelltod einleiten. Die Inaktivierung dieser Suppressoren führt zur Entstehung von Tumoren.

In den letzten 15 Jahren wurde eine Vielzahl dieser Tumorsuppressoren gefunden und auch näher charakterisiert. Wichtige Beispiele für solche Suppressoren sind z.B. p53 und pVHL (Sherr, 2004).

### 2.1. pVHL ist ein Tumorsuppressor

#### 2.1.1. Das *VHL*-Gen

Das von Hippel-Lindau (*VHL*)-Gen wurde 1993 identifiziert und ist auf Chromosom 3 (Lokus 3p25-26) lokalisiert (Latif *et al.*, 1993). Es besteht aus 3 Exons und kodiert für eine 4.7 kb große mRNA.

Der Nachweis, dass *VHL* ein Tumorsuppressor ist, wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erbracht. Die Wiedereinführung eines *VHL*-Wildtyp-Gens in *VHL*<sup>-/-</sup>-Zelllinien (A498, UMCR6) führte zu einer starken Unterdrückung des Tumorwachstums (Chen *et al.*, 1995). Durch die Transfektion von Wildtyp-*VHL* in eine weitere *VHL*<sup>-/-</sup>-Nierenzellkarzinom-Zelllinie (786-0) und anschließende Injektion dieser Zellen in Nacktmäuse wurden ebenfalls

Tumoren supprimiert (Iliopoulos *et al.*, 1995). Für eine heterozygote  $VHL^{+/-}$  Mauszelllinie wurde gezeigt, dass die Mäuse 15 Monate überlebten, ohne ein Anzeichen von Tumorbildung. Dagegen wurde bei  $VHL^{-/-}$ -Mäusen während der Tragzeit eine abnormale Vaskularisierung der Plazenta beobachtet. Die Embryos starben nach 9.5-10.5 Tagen *in utero* (Gnarra *et al.*, 1997).

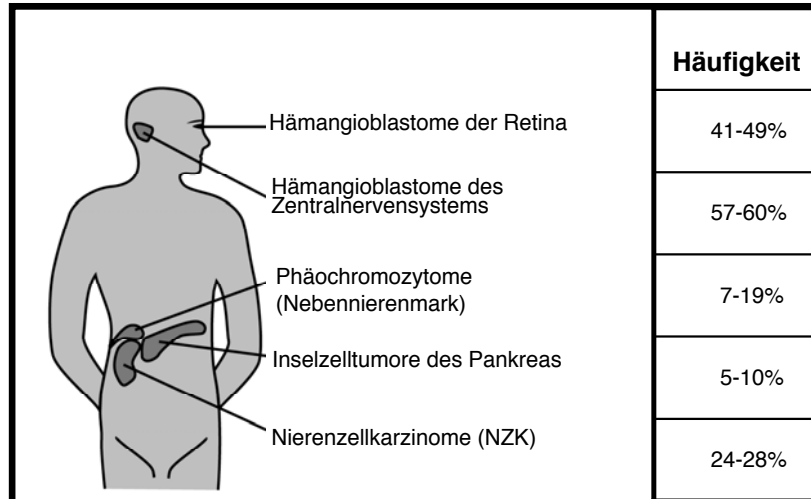
### 2.1.2. Die VHL-Krankheit

Mutationen im  $VHL$ -Gen führen zur VHL-Krankheit, einem autosomal-dominant vererbten Tumorsyndrom.

Die VHL-Krankheit wurde nach dem deutschen Ophthalmologen Eugen von Hippel und dem schwedischen Neuropathologen Arvid Lindau benannt. Von Hippel beschrieb das erste Mal Angiome der Retina und deren erblichen Charakter (von Hippel, 1904). Lindau erkannte eine morphologische Assoziation zwischen diesen retinalen Angiomen und Angiomen des Zentralnervensystems (Lindau, 1926). Inzwischen konnten auch klarzellige Nierenzellkarzinome (NZK), Karzinome im Nebennierenmark (Phäochromozytome), Tumore des endolymphatischen Sackes (Innenohr), Zysten der Niere und des Pankreas, seltener Inselzellkarzinome des Pankreas und Leberzysten in Patienten mit der VHL-Krankheit diagnostiziert werden (Abbildung 1).

Die VHL-Krankheit tritt bei etwa einem von 35000 Individuen auf (Kaelin, 2002). Die Symptome zeigen sich typischerweise zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr.





**Abbildung 1: Art und Häufigkeit der Tumore der VHL-Krankheit**  
(adaptiert nach Barry & Krek 2004)

Die Entstehung der VHL-Krankheit folgt dem Modell der Knudson-„two-hit“-Hypothese. Diese Hypothese der Tumorentstehung besagt, dass beide Allele eines Tumorsuppressorgens inaktiviert werden müssen, bevor es zur Tumorbildung kommt. Ein mutiertes *VHL*-Allel wird von einem Elternteil geerbt; kommt es dann zu einer spontanen somatischen Mutation des anderen Allels, führt dies zur Bildung von Tumoren. Neben der Keimbahninaktivierung des *VHL*-Gens kann es auch zur somatischen Inaktivierung (Mutation, Deletion, Hypermethylierung) beider *VHL*-Allele kommen. Diese spontane Inaktivierung führt ebenfalls zur Bildung von Tumoren, insbesondere zu Nierenzellkarzinomen.

Aufgrund der phänotypischen Vielfalt des VHL-Syndroms wurde die Krankheit in verschiedene Klassen unterteilt (Tabelle 1). Dabei liegen den einzelnen Klassen unterschiedliche klinische Manifestationen zu Grunde. Eine Schlüsselrolle spielen dabei die Phäochromozytome. Typ 1 ist nicht mit Phäochromozytomen assoziiert im Gegensatz zu Typ 2 der VHL-Krankheit. Dagegen weist Typ 1 Nierenzellkarzinome (NZK) auf, die sehr therapieresistent und schnell metastasierend sind. Häufig wurden bei Typ 1 Deletionen, *frame shifts* und *nonsense*-Mutationen des *VHL*-Gens gefunden, oder auch Punktmutationen, welche die Struktur von pVHL stark verändern. Für Typ 2 wurden bisher nur Punktmutationen in pVHL identifiziert. Typ 2 der VHL-Krankheit wird wiederum in einzelne Subklassen unterteilt, da es neben

Phäochromozytomen auch zu anderen klinischen Manifestationen kommt. Typ 2A ist mit Phäochromozytomen und Hämangioblastomen assoziiert und besitzt ein geringes Risiko zur Ausbildung von Nierenzellkarzinomen. Typ 2B weist außer den Phäochromozytomen und Hämangioblastomen dagegen ein hohes Risiko für die Entstehung von Nierenzellkarzinomen auf.

Typ	Klinische Manifestationen	Art der <i>VHL</i> -Mutation
1	Nierenzellkarzinome Hämangioblastome	Deletionen Punktmutationen <i>frame shifts</i>
2A	geringes Risiko für Nierenzellkarzinome Hämangioblastome Phäochromozytome	Punktmutationen
2B	hohes Risiko für Nierenzellkarzinome Hämangioblastome Phäochromozytome	Punktmutationen
2C	Phäochromozytome	Punktmutationen

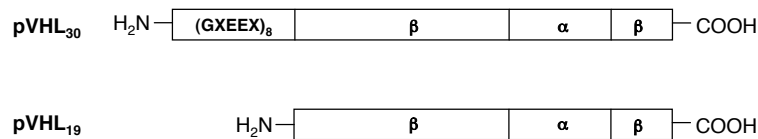
**Tabelle 1: Typen der VHL-Krankheit mit den klinischen Manifestationen und der Art der VHL-Mutation**

Forschungsberichte ergaben, dass Umweltkarzinogene (Chemikalien, Tabak, Strahlung) zu Mutationen des Erbgutes führen und so zur Entstehung von Tumoren beitragen. Mutationen in *VHL* wurden häufig bei Arbeitern der Metallindustrie diagnostiziert. In diesem Zusammenhang wurden Studien über Trichlorethylen-Expositionen bei Arbeitern aus der Metallindustrie durchgeführt (Brauch *et al.*, 1999). Trichlorethylen (TCE) wurde seit den fünfziger Jahren häufig als Lösungsmittel in verschiedenen Industriezweigen genutzt. Tatsächlich konnte TCE in den Zusammenhang mit Nierenzellkarzinomen gebracht werden. Patienten mit Nierenzellkarzinomen, welche über einen längeren Zeitraum TCE ausgesetzt waren, wiesen in 75% der Fälle *VHL*-Mutationen auf (Brauch *et al.*, 1999). Zusätzlich zu den vererbaren und somatischen Mutationen kann also auch TCE zu Mutationen in *VHL* und so zur VHL-Krankheit führen.

### 2.1.3. Das VHL-Protein (pVHL)

Die VHL-mRNA codiert für zwei Proteine unterschiedlicher Länge (Abbildung 2). Die lange Isoform von pVHL besteht aus 213 Aminosäuren und läuft im SDS-Gel bei 30 kDa (pVHL<sub>30</sub>). Die kürzere Isoform entsteht durch interne Initiation der Translation bei Methionin 54, ist 160 Aminosäuren groß und läuft im SDS-Gel bei 19 kDa (pVHL<sub>19</sub>).

Die Aminosäuresequenz von pVHL ist zwischen den Spezies (Primaten, Maus, Ratte, *Drosophila melanogaster*, *C. elegans*) konserviert. Allerdings unterscheidet sich die lange Isoform der unterschiedlichen Spezies durch die Anzahl an sauren GXEEX-Motiven. Dieses Motiv ist eine Sequenz unbekannter Funktion und beim Menschen und höheren Primaten in achtfacher Kopie vorhanden (Woodward *et al.*, 2000).

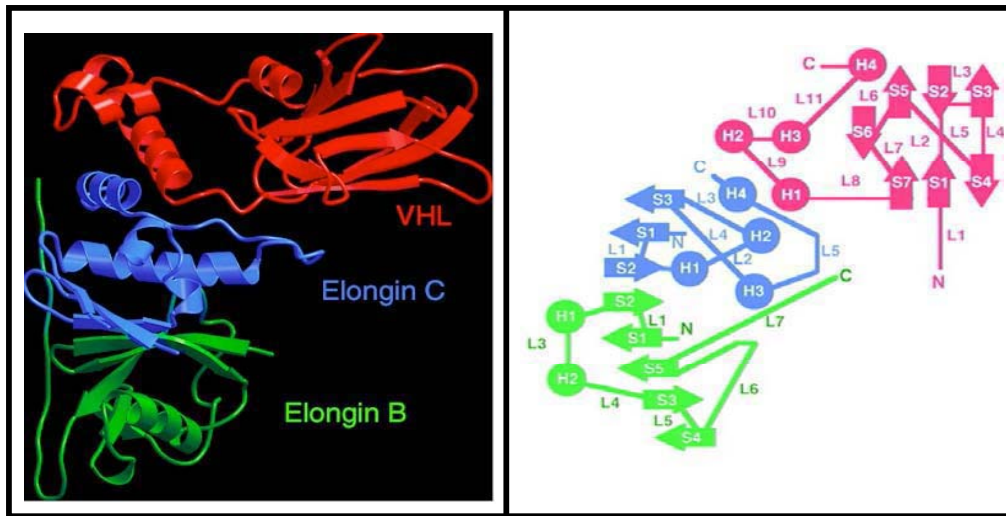


**Abbildung 2: Die Struktur des humanen VHL-Proteins (pVHL)**

Der N-Terminus des pVHL<sub>30</sub> besitzt ein saures GXEEX-Motiv mit bisher unbekannter Funktion. Die Translations-Initiation am internen Methionin (M54) führt zu dem kürzeren VHL-Protein von 19 kDa. VHL besitzt eine α-Domäne, die wichtig ist für die Bindung an Elongin C und eine β-Domäne, die für die Substratbindung essenziell ist.

Das VHL-Protein wird ubiquitär in fetalen und adulten Geweben exprimiert und kann zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma pendeln (Groulx *et al.*, 2000). Die lange Isoform scheint eine Präferenz für das Zytoplasma zu haben, während die kurze Isoform meist im Zellkern lokalisiert (Hergovich *et al.*, 2003). Die Lokalisation von pVHL scheint aber auch vom pH-Wert (Mekhail *et al.*, 2004) und der Zelldichte (Lee *et al.*, 1996) abzuhängen. Bisher konnten noch keine exakten funktionellen Unterschiede zwischen der langen und kurzen Isoform gezeigt werden. Für die lange pVHL-Form ist eine Phosphorylierung der N-terminalen Domäne (Serine 33, 38, 43) durch Caseinkinase2 (CK2) beschrieben. Diese Modifikation ist wahrscheinlich

wichtig für eine nicht degradative Funktion des Proteins, die Bindung an Fibronektin (Lolkema *et al.*, 2005).



**Abbildung 3: Die Struktur des ternären VCB-Komplexes**

Die Struktur des ternären VCB-Komplexes zeigt zum einen die Interaktion zwischen pVHL und Elongin C und zum anderen die Interaktion zwischen den Elonginen C und B. Die rechte Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Topologie der drei Proteine aus dem VCB-Komplex. VHL in rot, Elongin C in blau, Elongin B in grün. (Stebbins *et al.*, 1999)

Durch Koimmunpräzitationsstudien konnten Elongin B und Elongin C als Interaktoren von pVHL identifiziert werden (Duan *et al.*, 1995). Der ternäre Komplex aus VHL-Elongin C-Elongin B (VCB-Komplex) ist stabil, und seine Struktur wurde durch Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt (Stebbins *et al.*, 1999, Abbildung 3). Das Tumorsuppressorprotein pVHL besitzt zwei strukturelle Domänen. Die  $\beta$ -Domäne besteht aus sieben  $\beta$ -Strängen (Aminosäurereste 63-154) und einer  $\alpha$ -Helix (H4, Aminosäuren 193-204). Die kleinere  $\alpha$ -Domäne (Aminosäuren 155-192) setzt sich aus drei Helices (H1, H2, H3) zusammen. Zwei kurze Polypeptidlinker (153-156, 189-194) verbinden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne.

Das pVHL bindet mit seiner  $\alpha$ -Domäne an die Helix 4 von Elongin C, wodurch ein sehr stabiles 4-Helix-Bündel entsteht. Elongin C besteht aus 4  $\alpha$ -Helices und 3  $\beta$ -Faltblättern und kann über diese Faltblätter an Elongin B binden. Elongin B besitzt eine Ubiquitin-ähnliche Struktur (24% Homologie zu Ubiquitin), besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices und 5  $\beta$ -Faltblättern (Hon *et al.*, 2002). Es unterscheidet sich von Ubiquitin vor allem durch eine Insertion von neun

Aminosäuren (wichtig für die Interaktion mit Elongin C) und einem längeren C-Terminus (wichtig für die Interaktion mit pVHL).

Das VHL-Protein weist außerhalb des VCB-Komplexes eine geringe Stabilität auf und bildet ein „molten globule“ (Sutovsky und Gazit, 2004).

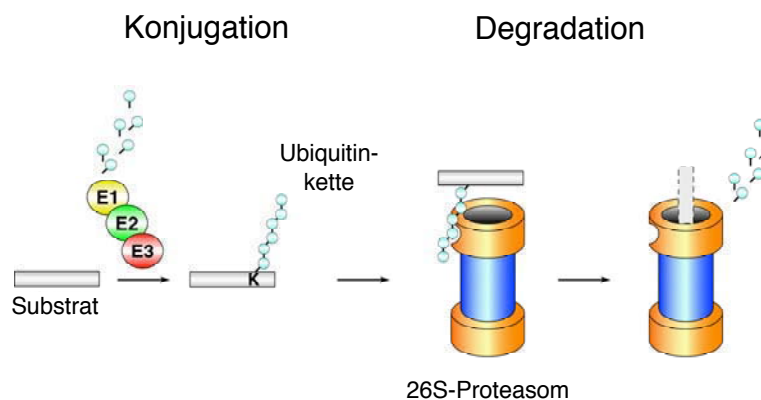
Für die native Faltung von pVHL und dessen Inkorporation in den VCB-Komplex ist das eukaryotische Chaperonin TRiC von Bedeutung (Feldman *et al.*, 1999). TRiC ist ein 900 kDa großer hetero-oligomeres Ringkomplex, der für die ATP-abhängige Faltung von Aktin und Tubulin, sowie anderer eukaryotischer Proteine verantwortlich ist (Kubota *et al.*, 1995, Dunn *et al.*, 2001). Feldman *et al.* zeigten, dass die Aminosäuren 99-155 von pVHL essenziell für die Interaktion mit TRiC sind. Sie konnten feststellen, dass es pVHL-Mutanten gibt, die nicht mehr an TRiC binden können (Klasse A) und Mutanten, die zwar noch TRiC binden, aber keinen stabilen VCB-Komplex mehr bilden können (Klasse B). Die Klasse C beschreibt pVHL-Mutanten, die von TRiC gefaltet werden, stabile VCB-Komplexe bilden, aber funktionale Defekte besitzen (Feldman *et al.*, 2003).

Durch Koimmunpräzipitationsstudien wurde gezeigt, dass der VCB-Komplex auch an das Protein Cullin 2 bindet (Pause *et al.*, 1999). Dieses Protein gehört zur Familie der Culline, welche das Grundgerüst für E3-Ligasekomplexe aus mehreren verwandten Familien stellen. In Abwesenheit von den Elonginen bindet Cullin 2 nicht an pVHL. (Pause *et al.*, 1999).

Der Komplex aus Cullin 2, Elongin B, Elongin C, Rbx1 und pVHL (CBC<sup>VHL</sup>) besitzt E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität und kann die Polyubiquitylierung von Proteinen katalysieren (Lisztwan *et al.*, 1999, Iwai *et al.*, 1999).

## 2.2. Das Ubiquitin-System

Die meisten eukaryotischen Proteine unterliegen einem dynamischen Umsatz. Die Neusynthese von Proteinen ist ebenso wichtig, wie der Abbau falsch gefalteter oder nicht mehr benötigter Proteine. Die Markierung mit Ubiquitin und der anschließende Abbau des Substrates geschieht über eine Enzymkaskade, bei der Ubiquitin kovalent mit dem Substrat verknüpft wird, und endet in einem enzymatischen Proteasekomplex, dem 26S-Proteasom. Der Mechanismus der Ubiquitin-Konjugation ist stark konserviert (Abbildung 4). Ubiquitin-verwandte Proteine, wie SUMO und NEDD8, werden ebenfalls über eine Enzymkaskade an Substrate gebunden.



**Abbildung 4: Das Konjugationssystem von Ubiquitin**

Ubiquitin wird durch eine C-terminale Hydrolase prozessiert und unter ATP-Verbrauch an das aktivierende Enzym (E1) gebunden. Anschließend wird Ubiquitin auf ein konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Die E3-Ligasen (RING-E3-Ligasen, HECT-E3-Ligasen) können direkt an das E2 und das Substrat binden. Abschließend wird Ubiquitin unter Ausbildung einer Isopeptidbindung kovalent an das Substrat gebunden. Die Ubiquitylierung führt zum proteasomalen Abbau des Substrates.

Ubiquitin wird durch eine C-terminale Hydrolase prozessiert und unter ATP-Verbrauch an ein Cysteinrest im aktiven Zentrum des aktivierenden Enzyms (E1) gebunden. Das E1 überträgt das aktivierte Ubiquitin auf einen Cysteinrest im aktiven Zentrum des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (UBC, E2). E3-Ligasen binden direkt an das mit Ubiquitin-beladene E2-Enzym und rekrutieren das Substrat. Die Ligasen katalysieren den Transfer des Ubiquitins auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Substrat unter

Ausbildung einer Isopeptidbindung. Bisher sind zwei gut charakterisierte Klassen von E3-Ligasen bekannt. Die HECT-Domänen-E3s (homologous to E6-AP-carboxyl-terminus, z.B. E6AP, NEDD4) formen direkte Intermediate mit Ubiquitin und dem E2, anschließend wird das Ubiquitin auf das rekrutierte Substrat übertragen. Die RING-E3-Ligasen (Really Interesting New Gene) katalysieren dagegen die direkte Übertragung des Ubiquitins vom E2 auf das Substrat. RING-E3-Ligasen können monomere Enzyme (Cbl) oder oligomere Komplexe sein.

Eine weitere Klasse der E3-Ligasen sind die U-Box-Proteine (Ufd2, CHIP), welche eine Domäne besitzen, die der RING-Domäne ähnelt. Diese Proteine scheinen sowohl E3-Ligase-Aktivität als auch E4-Aktivität (Multiubiquitylierung; Bildung von Ubiquitinketten) zu besitzen (Koege *et al.*, 1999, Pickart und Eddins, 2004).

Die Modifikation des Substrates mit Ubiquitin führt zum Abbau des Proteins durch das 26S-Proteasom und ist irreversibel. Es ist mindestens eine Kette von vier Ubiquitinmolekülen notwendig, um vom 26S-Proteasom erkannt zu werden (Thrower *et al.*, 2000).

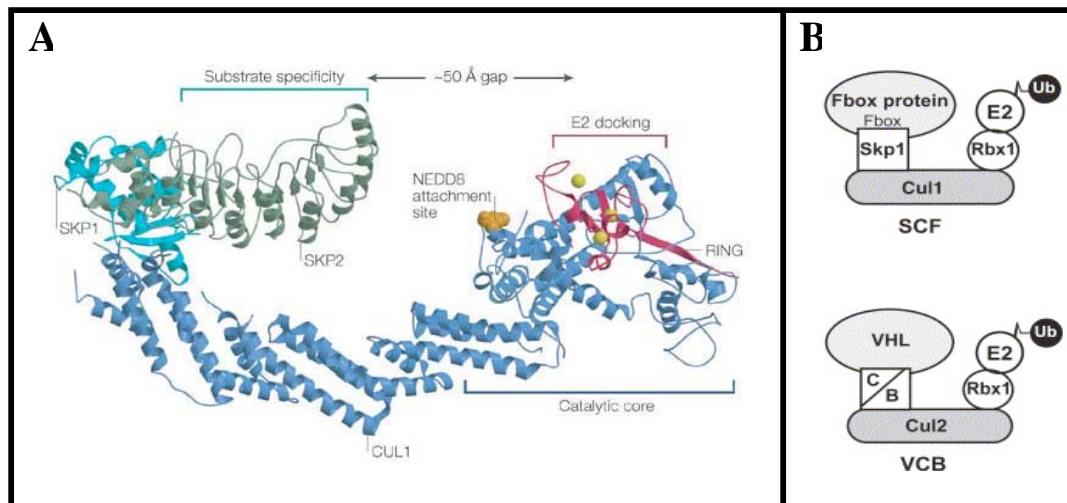
Für das humane Ubiquitin wurden bisher ein E1 (Uba1), verschiedene E2s und mehrere E3s identifiziert. Die Spezifität für das Substrat bestimmt vor allem die jeweilige E3-Ligase.

Anfangs nahm man an, dass die degradative Funktion die einzige Rolle der Ubiquitylierung ist. Inzwischen sind weitere Funktionen bekannt, die nicht zum proteosomalen Abbau führen. Ubiquitinketten, die über den Lysinrest 63 verknüpft werden, sind für nicht proteolytische Funktionen wichtig. Dagegen spielt die Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen über die Lysinreste 48 oder 29 für die degradative Funktion von Ubiquitin eine entscheidende Rolle.

Die Ubiquitylierung ist weiterhin wichtig für die Endozytose von Rezeptoren (Hicke, 1999), die DNA-Reparatur (Hoegge *et al.*, 2002), die Kontrolle der Transkription (Collins und Tansey, 2006) und die Prozessierung von Transkriptionsfaktoren (Palombella *et al.*, 1994).

## 2.2.1. Der CBC<sup>VHL</sup>-E3-Ligase-Komplex

Der Komplex aus Cullin 2, Elongin C, Elongin B, Rbx1 und pVHL (CBC<sup>VHL</sup>) besitzt E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Iwai *et al.*, 1999, Lisztwan *et al.*, 1999). Die einzelnen Untereinheiten weisen Homologien zu den Untereinheiten des SCF-Komplexes (Skp1-Cullin-F-Box-Protein) auf. SCF-Komplexe sind heterooligomere E3-Ligase-Komplexe mit großer Substratdiversität (Willems *et al.*, 2004). Dabei erkennen unterschiedliche Adaptorproteine spezifische Substrate und rekrutieren diese an den enzymatisch aktiven Grundkomplex. VHL ist ein solches Adaptorprotein.



**Abbildung 5: Die Struktur des SCF<sup>Skp2</sup>-Komplexes und des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes**

**A)** Die Kristallstruktur des SCF-Komplexes zeigt die Anordnung der einzelnen Untereinheiten, dabei dient Cullin1 als Grundgerüst. Der N-Terminus von Cullin bindet Skp1. Skp1 wiederum bindet das F-Box-Protein Skp2, welches die Substratspezifität vermittelt. Der C-Terminus von Cullin 1 interagiert direkt mit dem E2-Enzym und dem Ring-Protein (Rbx1). **B)** Schematischer Aufbau der SCF<sup>Skp2</sup>- und CBC<sup>VHL</sup>-Komplexe mit dem Ubiquitin-beladenen E2-Enzym. (modifiziert nach Petroski 2005, Pickart 2004)

Die dreidimensionale Struktur (Abbildung 5A) des SCF<sup>Skp2</sup>-Komplexes konnte durch Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt werden (Zheng *et al.*, 2002b). Es wurde gezeigt, dass Cullin 1 als Grundgerüst dient. Am N-Terminus des Cullins bindet das Skp1-Protein, welches wiederum das F-Box-Protein (Skp2) bindet. Die F-Box ist eine Sequenz, die für die Interaktion zwischen Skp1 und Skp2 wichtig ist. Am C-Terminus von Cullin1 binden Rbx1 und das E2-Enzym. Auf diese Weise werden das Substrat und das mit Ubiquitin-beladene E2-Enzym in räumliche Nähe gebracht und Ubiquitin kann auf das Substrat



übertragen werden. Rbx1 (auch ROC1 oder HRT1 genannt) ist ein Protein mit einer RING-H2-Domäne, einer Variante des RING-Motivs, und ist essentiell für die Aktivität der E3-Ligase.

Es wird angenommen, dass auch der CBC<sup>VHL</sup>-Komplex eine ähnliche Struktur besitzt (Abbildung 5B). Anstelle von Cullin 1 bildet bei diesem Komplex Cullin 2 das Grundgerüst. Das Skp1-Protein weist eine strukturelle Homologie zu Elongin C auf. Das pVHL besitzt in der  $\alpha$ -Domäne eine BC-Box (ähnlich der F-Box), welche für die Interaktion mit Elongin C essenziell ist. Zusätzlich wurde in pVHL eine Cul2-Box (Aminosäurereste 175-194) identifiziert. Diese dient wahrscheinlich der direkten Interaktion mit Cullin 2 (Kamura *et al.*, 2004).

Cullin kann durch NEDD8 modifiziert werden. Diese Modifikation erhöht die Aktivität der E3-Ligase, schützt den Komplex vor Autoubiquitylierung und unterstützt die Rekrutierung des E2-Enzyms (Petroski und Deshaies, 2005). Diese Modifikation ist reversibel, die Deneddylierung wird durch das COP9-Signalosome (CSN) katalysiert (Zheng *et al.*, 2002a). CAND1 (Cullin-associated and neddylation dissociated protein) wurde als ein Interaktor beschrieben, der an Culline binden kann, die nicht neddyliert sind. Die Bindung von CAND1 an Cullin verhindert also die Neddylierung und die Assoziation von Cullin-Bindungspartnern (Oshikawa *et al.*, 2003). Der genaue Mechanismus, wie CAND1 reguliert wird, ist jedoch noch nicht bekannt.

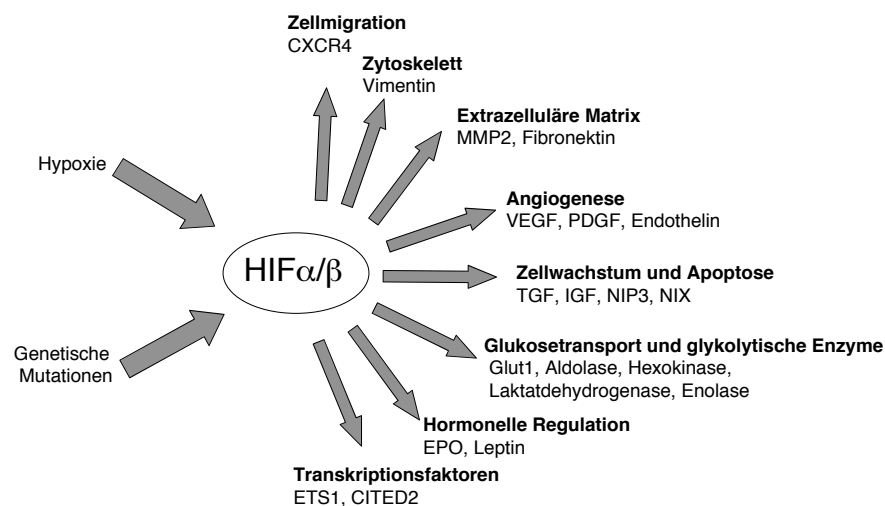
Durch Immunpräzipitationsexperimente wurden weitere Cullin 2-assoziierte zelluläre Proteine identifiziert (Kamura *et al.*, 2004). LRR-1 und FEM1B besitzen wie pVHL eine Cul2-Box und können an Elongin B und C binden. Allerdings sind für diese Komplexe noch keine Substrate bekannt im Gegensatz zum CBC<sup>VHL</sup>-Komplex.

### **2.3. Hypoxie-induzierter-Transkriptionsfaktor (HIF)**

Das bisher am besten charakterisierte Substrat des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes ist die  $\alpha$ -Untereinheit des Hypoxie-induzierten-Transkriptionsfaktors (HIF).

Die Transkription vieler Gene wird durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) induziert. Die Kontrolle übernimmt ein Transkriptionsfaktor, der an spezifische DNA-Sequenzen binden kann, und als HIF (hypoxia-inducible factor) bezeichnet wird.

HIF ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, welcher aus HIF $\alpha$  und HIF $\beta$  besteht. Beide Proteine gehören zu den basischen *Helix-Loop-Helix*-Proteinen (*bHLH*) der PAS-Familie. Das HIF $\alpha/\beta$ -Dimer bindet an *Hypoxia-Responsive-Elements (HRE)* in Promotorsequenzen von bis zu 100 verschiedenen Zielgenen. Beispiele für Genprodukte sind Wachstumsfaktoren (VEGF, TGF, PDGF), Faktoren für die Hormonregulation (EPO, Leptin) und für die Zellmigration (CXCR4), aber auch Enzyme für den Energiemetabolismus (Glut-1, Hexokinase, AldolaseA; Abbildung 6).

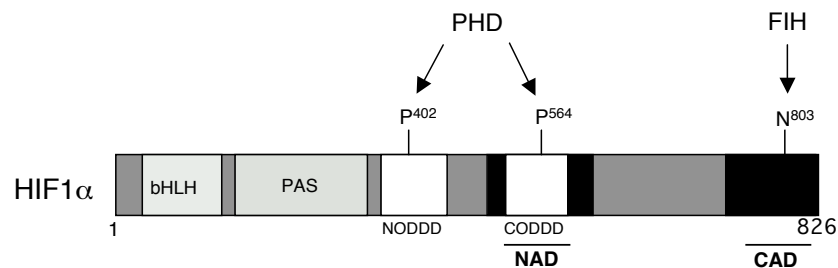


**Abbildung 6: Funktionen des dimeren Transkriptionsfaktors HIF $\alpha/\beta$**

Die Abbildung zeigt Genprodukte, welche durch HIF reguliert werden (adaptiert nach Schofield und Ratcliffe 2004).

HIF $\beta$ , auch ARNT (*Arylhydrocarbon-Receptor-Nuclear-Translocator*) genannt, ist ein stabiles Protein. Dagegen wird die Stabilität von HIF $\alpha$  durch die Sauerstoffkonzentration in der Zelle reguliert. Es gibt drei verschiedene Homologe von HIF $\alpha$  in Säugerzellen, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  und HIF3 $\alpha$  (Kietzmann *et al.*, 2001). HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  haben zwar eine ähnliche Architektur und werden beide durch Hypoxie reguliert, allerdings ist in Tumoren (unter

Hypoxie) die Expression unterschiedlich. HIF1 $\alpha$  wird ubiquitär exprimiert, HIF2 $\alpha$  scheint dagegen eine spezialisiertere physiologische Rolle zu besitzen und kommt vor allem in Endothelzellen vor. Es wird angenommen, dass die Zielgene von HIF1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  zwar überlappen, aber nicht identisch sind. So scheint HIF1 $\alpha$  wichtig für die anaerobe Glykolyse zu sein und HIF2 $\alpha$  für die Erythropoese bzw. Angiogenese (Raval *et al.*, 2005). HIF3 $\alpha$  weist weniger Ähnlichkeiten zu den anderen Homologen von HIF $\alpha$  auf und seine Regulation ist weniger untersucht. Es ist aber bekannt, dass HIF3 $\alpha$  durch alternatives *Splicing* reguliert wird. Bisher konnten sechs verschiedene *Splice*-Varianten beschrieben werden, unter ihnen das IPAS-Protein (*inhibitory PAS-Protein*), welches transkriptionelle inaktive Heterodimere mit HIF1 $\alpha$  bildet (Makino *et al.*, 2001).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des HIF1 $\alpha$  Proteins**

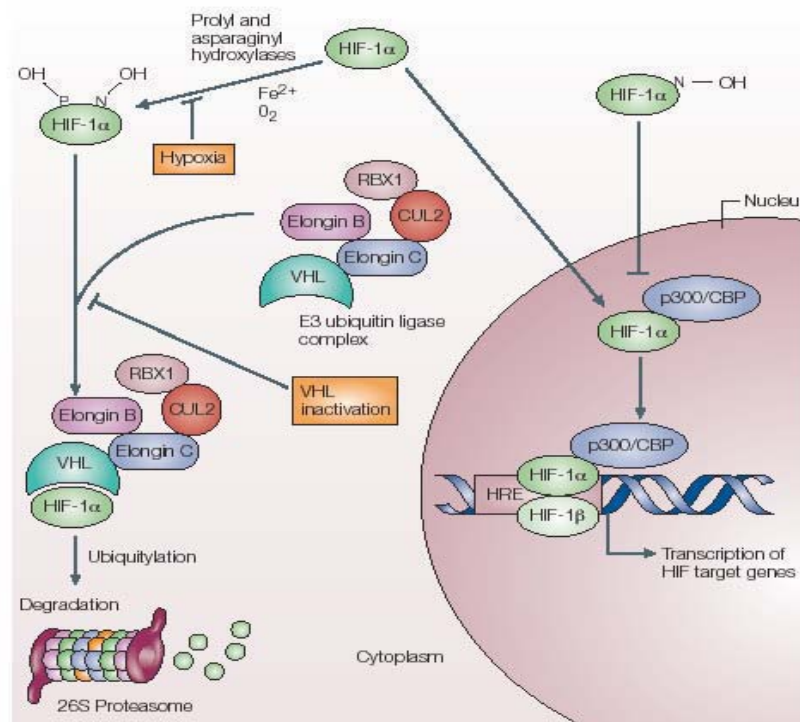
HIF1 $\alpha$  ist ein Protein mit 826 Aminosäuren. Der N-Terminus besteht aus den DNA-bindenden Domänen *bHLH* (*basic Helix-Loop-Helix*) und der *PAS*-Domäne (konserviert in PER, ARNT, SIM). Es konnten zwei transkriptionelle Aktivierungsdomänen in HIF identifiziert werden (NAD; CAD). Die N-terminale Aktivierungsdomäne überlappt mit der C-terminalen *oxygen-dependent degradation domain* (CODDD). Die ODDDs sind wichtig für den Abbau von HIF1 $\alpha$  unter normalen Sauerstoffbedingungen. Die Prolylhydroxylasen (PHDs) katalysieren die Modifikation der Proline 402 und 564, welche wichtig sind für die Erkennung durch die E3-Ligase und den anschließenden Abbau durch das 26S-Proteasom. Das Asparagin 803 wird durch Factor-inhibiting-HIF (FIH) modifiziert und verhindert so die Interaktion von HIF mit dem Koaktivator p300.

HIF1 $\alpha$  besteht aus 826 Aminosäuren (Abbildung 7). Der N-Terminus enthält die *bHLH*-Domäne und die *PAS*-Domäne, welche wichtig sind für die Interaktionen mit HIF $\beta$  und die DNA-Bindung. Zwei Aktivierungsdomänen sind essenziell für die transkriptionelle Aktivität von HIF1 $\alpha$ . Die C-terminale Aktivierungsdomäne (CAD) erstreckt sich von Aminosäure 786-826. Die

Aminosäuren 531-575 bilden die N-terminale Aktivierungsdomäne (NAD). Weiterhin konnten in HIF1 $\alpha$  zwei sogenannte ODD-Domänen (*oxygen dependent degradation*) identifiziert werden, die wichtig sind für die Modifikation und den daraus resultierenden Abbau des Proteins (Abbildung 8) unter normalen Sauerstoffbedingungen (Pugh *et al.*, 1997). Die C-terminale ODD-Domäne (CODDD) überlappt mit der N-terminalen Aktivierungsdomäne (Aminosäuren 549-582, NAD).

Sowohl in der N- als auch in der C-terminalen ODD-Domäne befindet sich ein konserviertes LXXLAP-Motiv. Die Prolinseitenkette in diesem Motiv (Prolin402 in der NODDD, Prolin564 in der CODDD) wird unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) hydroxyliert. Diese Prolinmodifikation ist das Erkennungssignal für pVHL an HIF1 $\alpha$  zu binden. In der Kristallstruktur des VCB-Komplexes mit einem HIF1 $\alpha$ -CODDD-Peptid wird deutlich, dass nur das hydroxylierte Peptid an den VCB-Komplex binden kann. Die Interaktion wird durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen des Hydroxyprolins mit dem Serin111 und Histidin115 von pVHL vermittelt (Hon *et al.*, 2002, Min *et al.*, 2002). Die Rekrutierung von HIF1 $\alpha$  an den CBC<sup>VHL</sup>-Komplex führt zur Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$  und zum anschließenden Abbau durch das 26S-Proteasom (Ivan *et al.*, 2001, Jaakkola *et al.*, 2001). Unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) findet diese Prolinhydroxylierung nicht statt und pVHL bindet nicht an HIF, dadurch kann HIF1 $\alpha$  in den Zellkern importiert werden. Im Kern interagiert HIF1 $\alpha$  mit HIF1 $\beta$  und die Transkription der verschiedenen Zielgene kann stattfinden (Abbildung 8). Die Enzyme, welche die Prolinhydroxylierung katalysieren, wurden bereits identifiziert (Epstein *et al.*, 2001 Bruick und McKnight, 2001). Die Prolylhydroxylasen (PHDs) gehören zur Familie der Eisen- und 2-Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. PHDs benötigen molekularen Sauerstoff und 2-Oxoglutarat als Kosubstrate, sowie Eisen (Fe<sup>2+</sup>) und Ascorbat als Kofaktoren. Diese Enzyme bilden so eine direkte Verbindung zwischen der zellulären Sauerstoffkonzentration und der Regulation von HIF. Es wurden drei verschiedene PHDs in Säugern identifiziert (PHD1, PHD2 und PHD3). Durch *in vitro* Studien konnten die Hydroxylase-Aktivitäten der verschiedenen PHDs bestimmt werden: PHD2 >

PHD3 > PHD1 (Huang *et al.*, 2002). Alle drei PHDs können Prolin564 hydroxylieren, Prolin402 kann dagegen nur durch PHD1 und PHD2 hydroxyliert werden (Chan *et al.*, 2005). Appelhoff *et al.* konnten zeigen, dass es für die einzelnen PHDs Präferenzen für die drei verschiedenen HIF-Homologen gibt. So kann PHD2 unter hypoxischen Bedingungen effizienter HIF1 $\alpha$  als HIF2 $\alpha$  hydroxylieren. PHD3 dagegen kann HIF2 $\alpha$  effizienter modifizieren (Appelhoff *et al.*, 2004). Durch RNAi-Experimente wurde deutlich, dass die Inaktivierung von PHD2 allein zu erhöhten HIF-Mengen unter normalen Sauerstoffbedingungen führt (Berra *et al.*, 2003). So scheint PHD2 die dominante Rolle unter den PHDs zu spielen. PHD2 und PHD3 werden im Gegensatz zu PHD1 unter hypoxischen Bedingungen induziert.



**Abbildung 8: Regulation des Transkriptionsfaktors HIF**

Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird HIF1 $\alpha$  durch Prolylhydroxylasen (PHDs) an den Prolinen 402 und 564 hydroxyliert. Die PHDs benötigen als Kosubstrate molekularen Sauerstoff und Ketoglutarat, als Kofaktoren Fe<sup>++</sup>, und Ascorbat. Die Prolinmodifikation ist das Erkennungssignal für den CBC<sup>VHL</sup>-Komplex HIF1 $\alpha$  zu binden und zu ubiquitylieren. Anschließend wird HIF1 $\alpha$  durch das 26S-Proteasom abgebaut. Am C-Terminus von HIF1 $\alpha$  wird zusätzlich das Asparagin 803 durch Factor-inhibiting-HIF (FIH) hydroxyliert. Diese Modifikation verhindert die Interaktion von HIF1 $\alpha$  mit dem Koaktivator CBP/p300 und unterstützt so die Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$ . Wird HIF1 $\alpha$  nicht an den Prolinen modifiziert, kann HIF1 $\alpha$  in den Zellkern importiert werden, bindet dort an HIF1 $\beta$  und die Transkription der HIF-Zielgene kann stattfinden (aus Pavlovich und Schmidt 2004).

Eine weitere Regulation der Aktivität von HIF1 $\alpha$  wird durch den unmittelbaren C-Terminus vermittelt. Durch die Hydroxylierung des Asparagins 803 kann der Koaktivator p300 nicht an HIF binden (Mahon *et al.*, 2001). Auch an dieser Hydroxylierung ist eine 2-Ketoglutarat-abhängige Dioxogenase beteiligt, *Factor-inhibiting HIF* (FIH). Die Asparaginyhydroxylierung bietet also einen zusätzlichen Sauerstoff-regulierenden Mechanismus zur Inaktivierung von HIF1 $\alpha$ -Molekülen, die der Prolinhydroxylierung oder dem CBC<sup>VHL</sup>-Komplex entgangen sind.

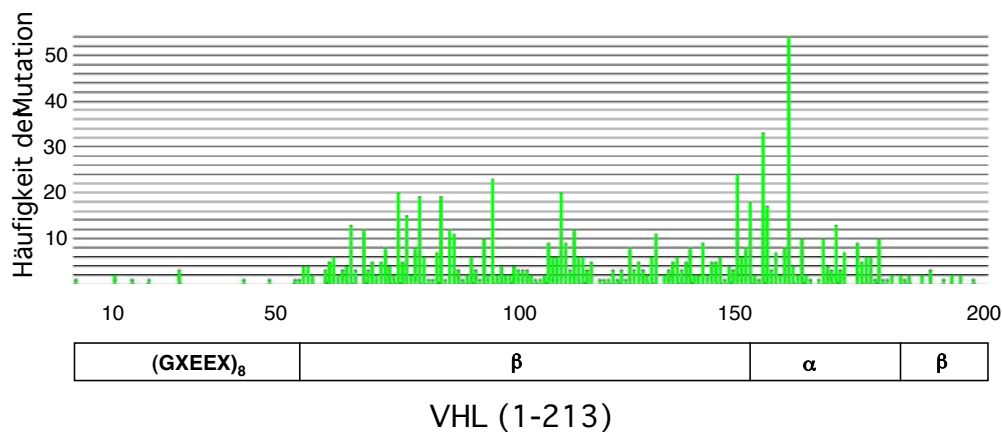
Neben dem HIF $\alpha$  wurden weitere Interaktoren von pVHL in der Literatur beschrieben. Durch Koimmunpräzipitationsexperimente aus *VHL*-negativen Zellen (786-O), die mit dem Wildtyp-*VHL* transfiziert wurden, konnte eine Interaktion zwischen pVHL und Fibronectin gefunden werden (Ohh *et al.*, 1998). Fibronectin, ein extrazelluläres Glykoprotein, kann an Integrine binden und so die Assemblierung der extrazellulären Matrix beeinflussen. In *VHL*-negativen Zellen und in stabil transfizierten *VHL*-Mutanten-Zelllinien ist die extrazelluläre Matrix degeneriert. Der Mechanismus, wie die Interaktion von pVHL und Fibronectin die extrazelluläre Matrix beeinflusst, ist noch nicht geklärt. Es scheint auch nur ein sehr geringer Teil von pVHL an Fibronectin zu binden, weil nur sehr wenig pVHL in der Membran oder im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Neddylierung von pVHL (Lysinrest 159) beschrieben (Stickle *et al.*, 2004). Neddyliertes pVHL behält zwar die Fähigkeit HIF zu ubiquitylieren, hat aber einen Defekt in der Fibronectinbindung. Diese Studien wurden allerdings nur unter Überexpressionsbedingungen durchgeführt, wobei auch der Anteil an neddyliertem pVHL in der Zelle sehr gering zu sein scheint.

Weitere Interaktoren von pVHL sind u.a. VDU1, VDU2, RPB7, PKC $\lambda$ , Jade-1, TBP-1 und Mikrotubuli. Bisher konnten allerdings keine genauen Funktionen dieser Interaktionen aufgezeigt werden bzw. in den

Zusammenhang mit dem VHL-Tumorsyndrom gebracht werden (Kaelin, 2005).

## 2.4. Defekte Tumor-assoziiertes pVHL-Mutanten

In den letzten zehn Jahren wurde eine Vielzahl von pVHL-Mutationen, darunter Punktmutationen, Deletionen und Insertionen, identifiziert. Die Abbildung 9 zeigt bisher diagnostizierte Mutationen in pVHL. Diese Mutationen sind vor allem in der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne von pVHL zu finden, dagegen findet man kaum Mutationen in den ersten 54 Codons. Besonders häufig treten Punktmutationen in den Resten C162, R167, Y98, N78 und P86 auf. Bisher wurden 448 verschiedene Mutationen in pVHL identifiziert (VHL-Mutations-Datenbank: [www.umd.be:2020](http://www.umd.be:2020)).



**Abbildung 9: Häufigkeit bisher gefundener Punktmutationen des humanen VHL-Proteins**

(Quelle: VHL-Mutations-Datenbank: [www.umd.be:2020](http://www.umd.be:2020))

Die pVHL-Mutanten wurden aufgrund ihrer klinischen Manifestationen (Nierenzellkarzinome, Phäochromozytome, Hämangioblastome) in die vier Subklassen der VHL-Krankheit (Typ 1, 2A, 2B, 2C) eingeteilt (siehe Abschnitt 2.1.2.).

Es gibt erste Studien, bei denen pVHL-Mutanten genauer charakterisiert wurden, insbesondere die Interaktionen mit HIF, Cullin 2 und den Elonginen, aber auch die E3-Ligase-Aktivitäten. Allerdings sind die publizierten Daten

teilweise sehr widersprüchlich, wie im Folgenden kurz dargestellt werden soll. In Koimmunpräzitationsstudien wurden die Interaktionen von pVHL mit Elongin C, Cullin 2 und HIF1 $\alpha$  untersucht (Hoffman *et al.*, 2001, Clifford *et al.*, 2001, Cockman *et al.*, 2000). Für verschiedene Typ 2-Mutanten konnte die Interaktion mit Elongin C und auch Cullin 2 gezeigt werden (Hoffman *et al.*, 2001, Clifford *et al.*, 2001). Dagegen waren die Interaktionsstudien für drei Typ 1-Mutanten uneinheitlich, die N78S-pVHL-Mutante konnte noch an Elongin C binden, die pVHL-Mutanten L188Q und S65W nicht mehr (Clifford *et al.*, 2001).

Interessanterweise wurde bei Immunpräzitationsstudien von pVHL und HIF1 $\alpha$  nur eine Interaktion mit Typ 2C-Mutanten (F119S, L188V, R64P, V84L) nachgewiesen. Ubiquitylierungsexperimente mit *in vitro* translatierten pVHL-Mutanten und HIF1 $\alpha$  bestätigten, dass 2C-Mutanten unter diesen Bedingungen HIF ubiquitylieren können, im Gegensatz zu den Typ 1-, 2A- und 2B-Mutanten (Hoffman *et al.*, 2001).

Die stabile Transfektion von *VHL* in *VHL*<sup>-/-</sup>-Zellen ermöglicht die Untersuchung von HIF-Mengen *in vivo* unter normalen und auch hypoxischen Sauerstoffbedingungen, sowie die Expression der HIF-abhängigen Zielgene. Für die Typ 2B-Mutante (Y98N) konnte eine geringe Regulation von HIF1 $\alpha$  unter Normoxie nachgewiesen werden, dagegen zeigte eine Typ 2A-Mutante (Y112H) keine Regulation (Cockman *et al.*, 2000). Ein bekanntes und gut beschriebenes Zielgen von HIF ist *GLUT1* (Glukosetransporter1). VHL-Mutanten, die nicht mehr HIF1 $\alpha$  binden und ubiquitylieren können, sollten höhere Mengen von Glut1 exprimieren. Für Typ 2C-Mutanten konnte keine Expression dieses Glukosetransporters detektiert werden, im Gegensatz zu Typ 1-Mutanten (C162F, P86H, Q96P, R82P). Typ 2A- und 2B-Mutanten wiesen eine geringe Expression von Glut1 auf (Cockman *et al.*, 2000).

Durch das Nacktmausmodell konnte gezeigt werden, dass die Typ 1-Mutante C162F das Wachstum von Tumoren nicht unterdrücken konnte, im Gegenteil zum Wildtyp und der Typ 2C-Mutante L188V (Hoffman *et al.*, 2001). Aus diesen beschriebenen Experimenten wurde deutlich, dass Typ 1 nicht mehr HIF1 $\alpha$  bindet, folglich auch nicht ubiquitylieren kann und so die HIF-



Zielgene exprimiert werden. Die pVHL-Mutanten der Typen 2A und 2B zeigen in einigen Experimenten eine geringe Regulation, in anderen Experimenten gar keine Regulation von HIF1 $\alpha$ . Unterschiede zwischen den 2A- und 2B-Mutanten wurden bisher jedoch nicht deutlich. Für die 2C-Mutanten konnten keine Defekte in der HIF1 $\alpha$ -Regulation festgestellt werden. Bei allen Mutanten stellte man einen Defekt in der Ausbildung der extrazellulären Matrix fest. So wurde durch Koimmunpräzipitationsexperimente gezeigt, dass einige pVHL-Mutanten nicht mehr an Fibronectin binden können, allerdings sind auch diese Daten nicht einheitlich (Hoffman *et al.*, 2001, Clifford *et al.*, 2001, Cockman *et al.*, 2000).

Hergovich *et al.* untersuchten die Fähigkeit von pVHL-Mutanten Mikrotubuli zu stabilisieren. Dabei zeigten sie, dass der Wildtyp und die von ihnen untersuchten Mutanten außer Y98H, Y112H (Typ 2B) und F119S (Typ 2C) Mikrotubuli stabilisieren können. Wie dies im Zusammenhang mit der Prädisposition für verschiedene Tumoren steht, ist allerdings nicht klar.

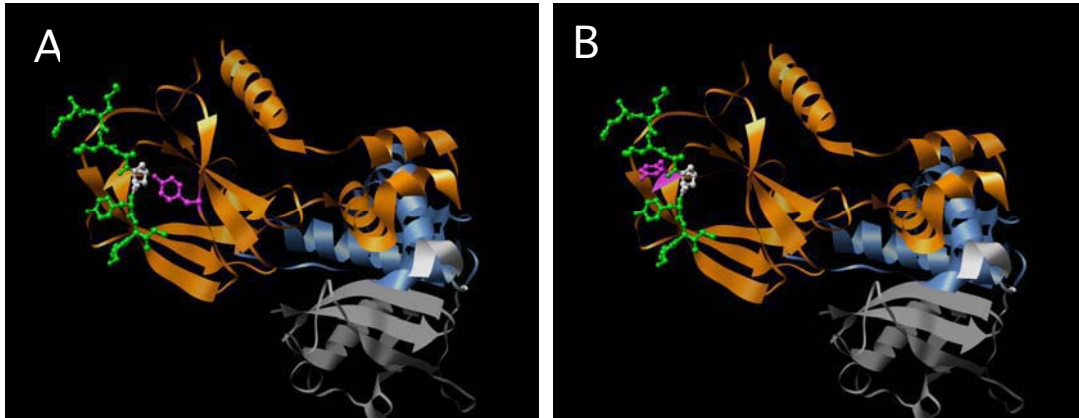
### **2.4.1. Typ 2A- und Typ 2B-Mutanten**

Die Typen 2A und 2B der VHL-Krankheit sind mit unterschiedlichen Risiken assoziiert Nierenzellkarzinome auszubilden. Die molekulare Grundlage bzw. Unterschiede wurden bisher nicht geklärt.

Die Aminosäuren Y98 und Y112 sind sehr häufig in pVHL zu Histidin bzw. Asparagin mutiert. Diese Reste liegen in der  $\beta$ -Domäne von pVHL in räumlicher Nähe zur Hauptbindungsstelle des Substrates HIF1 $\alpha$ . Durch die Aufklärung der Kristallstruktur des VCB-Komplexes mit dem HIF1 $\alpha$ -Peptid wurde deutlich, dass die Aminosäurereste Y98 und Y112 wichtige Kontakte zum Substrat ausbilden (Hon *et al.*, 2002, Min *et al.*, 2002, Abbildung 10).

Aufgrund von auftretenden Phäochromozytomen und Hämangioblastomen wurde sowohl die Y98H, als auch die Y112H Mutante dem VHL-Krankheitstyp 2A zugeordnet (Brauch *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 1995). Bei Aminosäureaustauschen der Reste Y98 und Y112 gegen Asparagin (Y98N, Y112N) wurden zusätzlich auch Nierenzellkarzinome diagnostiziert und diese

deshalb dem VHL-Krankheitstyp 2B zugeordnet (Gnarra *et al.*, 1994, Bradley *et al.*, 1999).



**Abbildung 10: Die Tumor-assoziierten pVHL-Mutanten Y98 und Y112 mit dem HIF1 $\alpha$ -Peptid**

Die Reste Y98 (A) und Y112 (B) sind magenta dargestellt. VHL in orange, Elongin C in blau, Elongin B in grau, HIF1 $\alpha$ -Peptid in grün (+ Hydroxyprolin in grau).

Für die Mutanten (Y98H, Y112H, Y98N) wurde beschrieben, dass sie keine Defekte in der Elongin C-Bindung aufweisen (Clifford *et al.*, 2001, Cockman *et al.*, 2000). Die Daten zu den Untersuchungen der HIF-Regulation zeigen in einigen Fällen eine schwache Regulation (Hoffman *et al.*, 2001), in anderen Fällen gar keine Regulation (Cockman *et al.*, 2000).

Die molekulare Grundlage und Unterschiede der VHL-Krankheitstypen 2A und 2B sind bis heute nicht geklärt. In der Literatur gibt es bisher keine systematischen Untersuchungen zur Bindung, Ubiquitylierungs-Aktivität und Stabilität von pVHL-Mutanten.

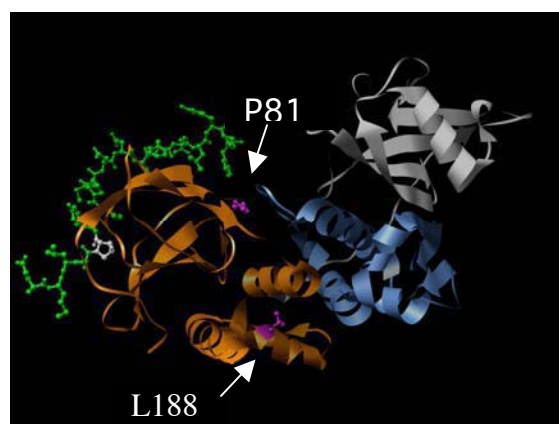
### 2.4.2. Typ 2C-Mutanten

Die L188V-Mutante wurde bereits 1996 identifiziert und aufgrund des alleinigen Auftretens von Phäochromozytomen dem Typ 2C zugeordnet (Zbar *et al.*, 1996). Interessanterweise wurde bei einem wiederholten Screening durch ein neueres HPLC-Verfahren eine zusätzliche ko-segregierende Mutation neben der L188V-Mutation identifiziert, die P81S-Mutation (Weirich *et al.*, 2002). Die entsprechende Doppelmutante wurde bisher nicht

biochemisch charakterisiert. Biochemische Studien der L188V-Einzelmutante ergaben keinen Defekt in der Bildung des VCB-Komplexes und auch nicht in der Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$  (Hoffman *et al.*, 2001, Clifford *et al.*, 2001). Diese Mutante konnte im Nacktmausmodell Tumorwachstum unterdrücken (Hoffman *et al.*, 2001). Außer einem Defekt in der Fibronectinbindung konnten bisher keine Unterschiede zum Wildtyp beschrieben werden.

Die P81S-Mutante, die man dem Typ 1 der VHL-Krankheit zuschrieb (weil keine Phäochromozytome auftraten) erwies sich als sehr interessant. Diese Mutation trat sehr häufig im Zusammenhang mit der Exposition des Karzinogens Trichlorethylen auf und man identifizierte häufig Doppel- und Mehrfachmutationen. Die Einzelmutante P81S zeigt in einigen Fällen eine geringe Penetranz und milden Phänotyp, in anderen Fällen kommt es zu Nierenzellkarzinomen (Hes *et al.*, 2000). Diese Mutation wurde bisher nicht biochemisch charakterisiert.

Wie aus der Kristallstruktur des VCB-Komplexes mit dem HIF-Peptid hervorgeht, ist der Prolinrest 81 direkt an der Elongin C-Bindung beteiligt (Abbildung 11). Der Leucinrest 188 ist dagegen indirekt an der Interaktion mit Elongin C beteiligt, indem er die Helix 1 stabilisiert. Diese Helix bildet die Hauptkontakte zu Elongin C. Zusätzlich liegt L188 in der Cul2-Box von pVHL (Reste 175-194), ist also wahrscheinlich an einer direkten Interaktion zwischen Cullin 2 und pVHL beteiligt (Kamura *et al.*, 2004).



**Abbildung 11: Die Tumor-assoziierten pVHL-Mutanten P81S und L188V mit dem HIF1 $\alpha$ -Peptid**

Die Reste P81 und L188 sind magenta dargestellt. VHL in orange, Elongin C in blau, Elongin B in grau, HIF1 $\alpha$ -Peptid in grün.

Bisher wurde nur die L188V-Mutante näher charakterisiert. Allerdings ist diese Mutante in Patienten mit dem VHL-Tumorsyndrom keine Einzelmutante, sondern die P81S/L188V-Doppelmutante. Demnach können die bisherigen publizierten Ergebnisse eventuell irreführend und eine Charakterisierung der Doppelmutante sehr interessant sein. Daten über die Einzelmutante P81S und dessen Interaktionen und mögliche HIF-Regulation gibt es bisher in der Literatur nicht. Wie schon aus der Kristallstruktur hervorgeht, stellen die Aminosäurereste P81 und L188 wichtige Reste für die Interaktion mit Elongin C und Cullin 2 dar. Demnach könnten eventuell Assemblierungsdefekte der Komplexe vorliegen.

## 2.5. Zielsetzung

Das von Hippel-Lindau-Protein (pVHL) ist ein Tumorsuppressor und Mutationen in *VHL* führen zum von Hippel-Lindau-Tumorsyndrom. Bisher gibt es jedoch kaum systematische biochemische Studien zu den Defekten von Tumor-assoziierten pVHL-Mutanten. So ist die molekulare Grundlage der unterschiedlichen Phänotypen weitgehend unverstanden, vor allem für Mutanten der Krankheitstypen 2A, 2B und 2C.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Tumor-assoziierte pVHL-Mutanten mit biochemischen und biophysikalischen Methoden zu charakterisieren. Es sollten experimentelle Ansätze entwickelt werden, mit denen die Stabilität des rekombinanten VCB-Komplexes (VHL-Elongin C-Elongin B), die Bindung an ein Modellsubstrat und die Ubiquitylierungs-Aktivität der  $CBC^{VHL}$ -Ubiquitin-Ligase-Komplexe untersucht werden können. Aufbauend auf diese *in vitro* Testsysteme sollte durch den Vergleich der Typ 2A- und 2B-assoziierten pVHL-Mutanten überprüft werden, ob die Ausbildung von Nierenzellkarzinomen mit molekularen Defekten korreliert ist. Weiterhin sollten Typ 2C-Mutanten, für die bisher keine Defekte in der Regulation von HIF beschrieben sind, hinsichtlich ihrer Assemblierung und Substratbindung untersucht werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Biochemische Charakterisierung von pVHL-Mutanten des Krankheitstyps 2A und 2B

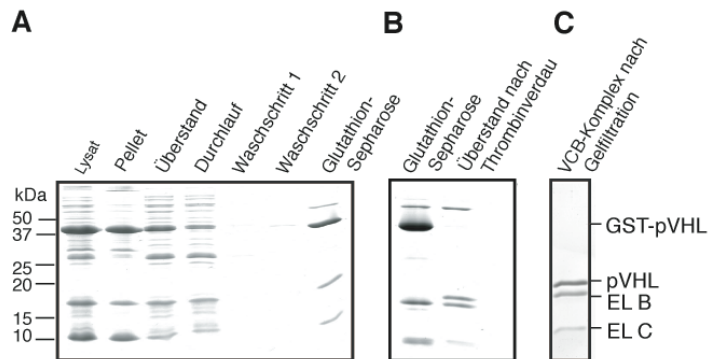
Die Typen 2A und 2B der VHL-Krankheit sind mit unterschiedlichen Risiken assoziiert, Nierenzellkarzinome auszubilden. Die molekulare Grundlage bzw. Unterschiede wurden bisher nicht geklärt. Vertreter des Typs 2A sind die Y98H- bzw. die Y112H-Mutante (Brauch *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 1995). Bei Aminosäureaustauschen der gleichen Reste gegen Asparagin (Y98N, Y112N) wurden zusätzlich Nierenzellkarzinome diagnostiziert und diese Mutanten dem Krankheitstyp 2B zugeordnet (Gnarra *et al.*, 1994, Bradley *et al.*, 1999).

##### 3.1.1. Reinigung rekombinanter VCB-Komplexe

Zur biochemischen Charakterisierung des pVHL-Wildtyp-Komplexes und der Mutanten Y98H, Y98N, Y112H und Y112N wurden die VCB-Komplexe, bestehend aus pVHL, Elongin C und Elongin B, unter nicht denaturierenden Bedingungen aufgereinigt.

Glutathion-S-Transferase-fusioniertes pVHL (GST-VHL<sub>19</sub>), Elongin B, und eine verkürzte Elongin C-Variante (17-112) wurden in *E. coli* koexprimiert und der VCB-Komplex aufgereinigt (optimiert nach Stebbins *et al.*, 1999, Abbildung 12A). Zwischen dem GST-Fusionsprotein und pVHL befindet sich eine Thrombinschnittstelle die es ermöglichte, den VCB-Komplex von dem immobilisierten GST durch einen Thrombinverdau abzuschneiden (Abbildung 12B). Durch anschließende Gelfiltration konnte der VCB-Komplex mit einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden (Abbildung 12C). Die exakte Konzentration der Komplexe wurde über die Absorption bei 280 nm und mittels Aminosäureanalyse bestimmt. Zusätzlich wurden die Molekulargewichte der Untereinheiten durch Massenspektrometrie bestätigt.

Die gereinigten VCB-Komplexe enthielten stöchiometrische Mengen an pVHL, Elongin C und Elongin B (siehe Abbildung 12C).



**Abbildung 12: Reinigung des rekombinanten VCB-Wildtyp-Komplexes**

**A)** Nach der Koexpression von GST-pVHL, Elongin B und Elongin C in *E. coli* wurde der VCB-Komplex über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. **B)** Durch einen Thrombinverdau wurde der GST-Anteil von dem VCB-Komplex abgetrennt. **C)** Nach anschließender Gelfiltration wurden die gesammelten Fraktionen im SDS-Gel analysiert und vereinigt.

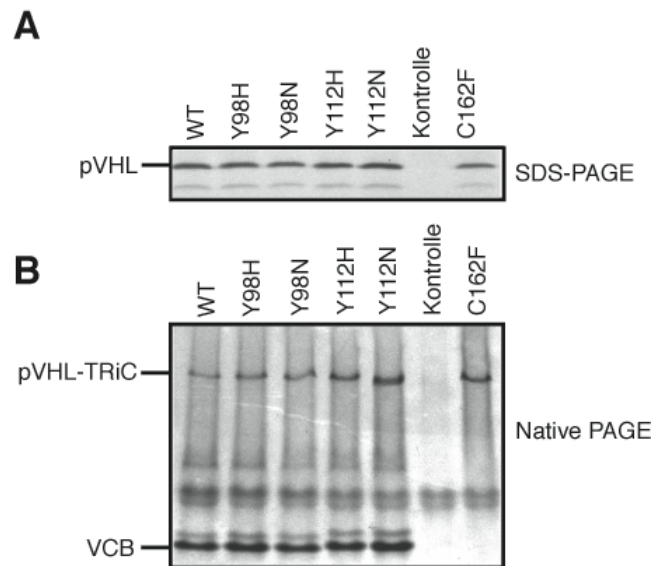
### 3.1.2. Assemblierung der VCB-Komplexe

#### 3.1.2.1. *In vitro* Assemblierung

Die Assemblierung des VCB-Komplexes bzw. die Assemblierung des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes werden *in vivo* und *in vitro* durch das Chaperonin TRiC unterstützt (Feldman *et al.*, 1999).

Durch *in vitro* Translation und anschließender nativer Gelelektrophorese wurde überprüft, ob die Tumor-assoziierten pVHL-Mutanten Assemblierungsdefekte aufweisen (Feldman *et al.*, 1999). Dazu wurde pVHL im Retikulozytenlysat in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin translatiert. Das Lysat enthält sowohl das eukaryotische Chaperonin TRiC, als auch die Elongine B und C. Durch denaturierende SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie wurde überprüft, ob gleiche Mengen an pVHL translatiert wurden (Abbildung 13A). Die Native PAGE sollte zeigen, ob pVHL an die Elongine oder an TRiC gebunden ist (Abbildung 13B). Bleibt pVHL an seinen Faltungshelfer TRiC gebunden, ist dies ein Indiz für Fehlfaltung oder gestörter Assemblierung. Die pVHL-Mutante C162F wurde bereits in der Literatur mit

einem Defekt in der Assemblierung des VCB-Komplexes beschrieben. Diese Mutante kann keinen VCB-Komplex mehr bilden, bleibt also an TRiC gebunden und wurde als Positivkontrolle für den TRiC-pVHL-Komplex benutzt (Feldman *et al.*, 1999).



**Abbildung 13: Assemblierung der pVHL-Mutanten (Typ2A und 2B)**

**A)** Wildtyp-pVHL und die pVHL-Mutanten (1 $\mu$ g) wurden bei 37 °C in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* translatiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert. **B)** Die Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen zeigt die Migration von TRiC-pVHL bzw. vom VCB-Komplex. Als Marker wurden rekombinantes TRiC und rekombinanter VCB-Komplex aufgetragen und mit Coomassie angefärbt (Daten nicht gezeigt).

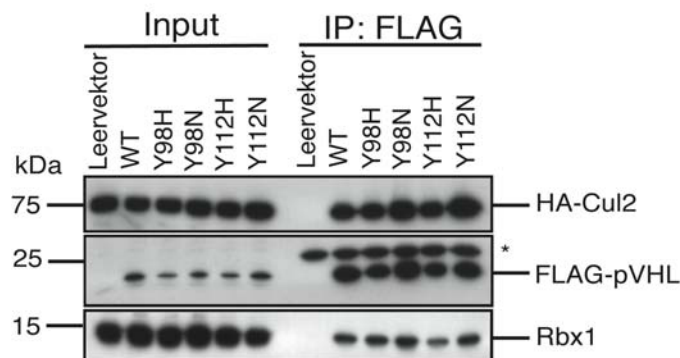
Die SDS-PAGE wies gleiche Mengen an *in vitro* translatiertem pVHL auf (Abbildung 13A). Wie die Abbildung 13B zeigt, konnten gleiche Mengen an VCB-Komplex für den Wildtyp und die Y98H-, Y98N-, Y112H- und die Y112N-Mutanten im Nativgel detektiert werden. Die C162F-Mutante zeigte dagegen wie erwartet keine Inkorporation von pVHL in den VCB-Komplex und blieb an TRiC gebunden. Es wurden also keine Defekte in der Assemblierung der Tumor-assoziierten VCB-Komplexe Y98 und Y112 (Typ 2A und 2B) gefunden.



### 3.1.2.2. *In vivo* Assemblierung der CBC<sup>VHL</sup>-Komplexe

Durch Koimmunpräzipitation wurde überprüft, ob der vollständige E3-Ligase-Komplex (CBC<sup>VHL</sup>), bestehend aus pVHL, Elongin C, Elongin B, Cullin 2 und Rbx1, aus humanen 293T-Zellen präzipitiert werden kann, oder ob bei den Y98- und Y112-Mutanten Defekte in der Assemblierung der E3-Ligasekomplexe vorliegen.

Nach Kotransfektion der FLAG-pVHL-Konstrukte und HA-Cullin 2 in humane 293T-Zellen wurde der CBC<sup>VHL</sup>-Komplex mittels FLAG-M2-Agarose präzipitiert (Miller *et al.*, 2005). Die Elongine B und C sowie Rbx1 sind in der Zelle nicht limitierend. Durch SDS-PAGE und Western Blots gegen pVHL, Cullin 2 und Rbx1 wurde überprüft, ob die Untereinheiten der E3-Ligase-Komplexe zu gleichen Mengen vorliegen. Die Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Koimmunpräzipitation. Sowohl Cullin 2, als auch Rbx1 und pVHL konnten zu ähnlichen Mengen präzipitiert werden. Demnach weisen Tumor-assoziierte Typ 2A- bzw. Typ 2B-Mutanten *in vivo* keine Assemblierungsdefekte auf.



**Abbildung 14: Kopräzipitation der CBC<sup>VHL</sup>-Ligase-Komplexe**

Humane 293T-Zellen wurden mit FLAG-pVHL bzw. der Kontrolle (Leervektor) und HA-Cullin 2 transfiziert, nach 48 Stunden lysiert (Input) und mit FLAG-M2-Agarose präzipitiert (IP: FLAG). Durch SDS-PAGE und anschließendem Western Blot wurden die einzelnen Untereinheiten des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes detektiert (Cullin 2, Rbx1, pVHL). (\* leichte Kette des Antikörpers)

Sowohl durch die Reinigung der rekombinanten Komplexe, als auch durch die TRiC-abhängige Assemblierung mit Elongin B und C, sowie die Präzipitation der intakten E3-Ligase-Komplexe aus 293T-Zellen wurde gezeigt, dass die

Tumor-assoziierten Mutanten Y98H, Y98N, Y112H und Y112N keine Assemblierungsdefekte aufweisen.

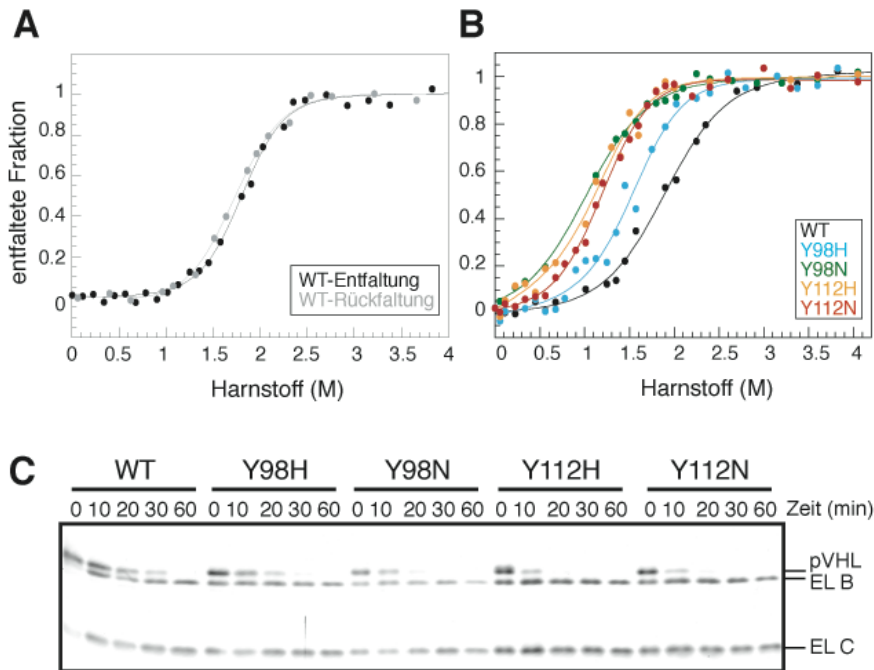
### **3.1.3. Stabilität der VCB-Komplexe**

#### **3.1.3.1. Chemische Denaturierung**

Um die thermodynamische Stabilität der rekombinanten VCB-Komplexe zu untersuchen, wurden Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen. Die Intensität des Tryptophan-Emissionssignals von 345 -355 nm (Anregungswellenlänge 290 nm) variiert mit dem chemischen Milieu und erlaubt so den Nachweis konformationeller Änderungen eines Proteins (Lackowitz, 1983). Die  $\beta$ -Domäne von pVHL besitzt die einzigen Tryptophanreste (W88, W117) des VCB-Komplexes.

Die chemische Denaturierung des Wildtyp-VCB-Komplexes ist reversibel (Abbildung 15A). Aus diesem Grund kann aus den Daten der Denaturierung bzw. Renaturierung der Mittelpunkt des Entfaltungsüberganges ( $D_{50\%}$ ) und der Wert der freien Energie ( $\Delta G_{H_2O}$ ) durch Kurvenanpassung erhalten werden (siehe 5.5.9.1.). Diese Parameter geben Auskunft über die Stabilität von Proteinen. Der  $D_{50\%}$ -Wert ist die Harnstoffkonzentration, bei der 50% des Proteins denaturiert sind. Der  $\Delta G_{H_2O}$ -Wert ist die freie Energie, die aufgebracht werden muss, um ein bestimmtes Protein zu entfalten. Bei der Denaturierung des Wildtyp-Komplexes wurden keine lokalen Minima bzw. Intermediate detektiert. Auch bei der Detektion des Tyrosinsignals, zu dem auch Tyrosinreste von Elongin B und C beitragen (Anregungswellenlänge bei 278 nm, Emission bei 304 nm), wurden keine Intermediate detektiert und auch die Mittelpunkte der Entfaltungsübergänge waren mit denen der Tryptophansignale vergleichbar. Dies zeigt, dass die Entfaltung von pVHL kooperativ mit der Entfaltung des VCB-Komplexes verläuft, so dass ein Zweizustandsmodell der Faltung angenommen werden konnte. Die Messungen wurden aufgrund der geringen thermodynamischen Stabilität der

Komplexe bei 10 °C durchgeführt, um genügend Datenpunkte für den nativen Zustand zu ermitteln.



**Abbildung 15: Stabilität der VCB-Komplexe**

**A) Reversibilität der Entfaltung:** Der denaturierte Wildtyp-VCB-Komplex (je 250 nM; gegen 5 M Harnstoff dialysiert) wurde mit steigenden Konzentrationen an Harnstoff (0- 4M) versetzt und über Nacht bei 10 °C inkubiert. Die Fluoreszenz bei 354 nm (Anregung 290 nm) wurde aufgenommen.

**B) Entfaltung:** Nativer VCB-Komplex wurde mit steigenden Konzentrationen an Harnstoff (0- 4M) versetzt und über Nacht bei 10 °C inkubiert. Das Fluoreszenzsignal bei 354 nm wurde detektiert (Anregung: 290 nm). Aus den Daten wurden durch Kurvenanpassung die thermodynamischen Parameter (siehe Tabelle 2) erhalten. Die Gleichungen für die Kurvenanpassungen sind unter 5.5.9.1. beschrieben (Pace, 1990, Killenberg-Jabs *et al.*, 2002, Clarke und Fersht, 1993).

**C) Trypsinverdau:** Rekombinanter VCB-Komplex (8 µg) wurde mit Trypsin (80 ng) bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 10, 20, 30, 60 min wurden Proben entnommen. Sofort danach wurden die Proben mit PMSF (Proteaseinhibitor; 1 µM) abgestoppt und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Silberfärbung angefärbt.

Sowohl der  $\Delta G_{H_2O}$ -Wert als auch der  $D_{50\%}$ -Wert der Renaturierung war mit den Werten der Denaturierung des Wildtyp-Komplexes vergleichbar.

Für die Y98- und Y112-Mutanten wurden wie auch bei dem Wildtyp keine Faltungsintermediate detektiert. Somit konnte für die Denaturierung der Mutanten-VCB-Komplexe ebenfalls ein Zweizustandsmodell angenommen werden.

pVHL	$\Delta G_{H_2O}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	[Harnstoff] <sub>50%</sub> (M)
WT	3.19 ± 0.04	1.84 ± 0.03
Y98H	2.55 ± 0.04	1.48 ± 0.02
Y98N	1.89 ± 0.07	1.09 ± 0.04
Y112H	1.97 ± 0.03	1.14 ± 0.02
Y112N	1.97 ± 0.03	1.14 ± 0.02

**Tabelle 2: Ergebnisse der chemischen Denaturierung der VCB-Komplexe (WT, Y98, Y112)**

Die Werte für die freie Energie ( $\Delta G_{H_2O}$ ) und den Mittelpunkt des Entfaltungsüberganges ( $D_{50\%}$ ) wurden durch Kurvenanpassung ermittelt. Der m-Wert wurde für die Kurvenanpassung fixiert (1.73 kcal/(mol M)). Die Gleichungen der Anpassungen sind unter 5.5.9.1. dargestellt (Pace, 1990, Killenberg-Jabs *et al.*, 2002, Clarke und Fersht, 1993).

Durch Kurvenanpassung wurden auch die Anstiege der Entfaltungsübergänge (m-Werte) ermittelt. Diese unterschieden sich nur geringfügig zwischen den einzelnen Experimenten mit einem Durchschnitt von  $1.73 \pm 0.02$  kcal/(mol M). Um die Ergebnisse der Entfaltungsübergänge besser vergleichen zu können, wurde der m-Wert für die Kurvenanpassung fixiert (1.73 kcal/(mol M)).

Aus den Harnstoff-Titrationsen der Wildtyp-, Y98- und Y112-Mutanten-Komplexe wurde deutlich, dass es Stabilitätsunterschiede zwischen den Komplexen gibt (Abbildung 15B). Der Wildtyp besitzt einen  $D_{50\%}$ -Wert von 1.84 M und einen  $\Delta G_{H_2O}$ -Wert von 3.2 kcal/mol (Tabelle 2). Dagegen hat die Y98H-Mutante einen  $D_{50\%}$ -Wert von 1.48 M, einen etwas geringeren  $\Delta G_{H_2O}$ -Wert von 2.6 kcal/mol und ist somit etwas instabiler als der Wildtyp.

Die Y98N-, Y112N- und Y112H-Komplexe besitzen  $D_{50\%}$ -Werte von etwa 1.1 M,  $\Delta G_{H_2O}$ -Werte von etwa 2 kcal/mol und sind somit instabiler als der Wildtyp und die Y98H-Mutante.

### 3.1.3.2. Partielle Proteolyse

Um die Stabilität der Komplexe auch bei 37 °C zu untersuchen, wurden partielle Verdauungen mit Trypsin durchgeführt. Die rekombinanten VCB-Komplexe wurden mit Trypsin (1:100 w/w) inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und sofort mit dem Proteaseinhibitor PMSF und SDS-Probenpuffer versetzt. Nach der anschließenden SDS-PAGE und Silberfärbung wurde überprüft, wie stabil die einzelnen Untereinheiten des VCB-Komplexes gegenüber der Protease waren. Elongin C und B waren stabil, wogegen man beim Wildtyp-pVHL nach 30 Minuten Abbau beobachten konnte (Abbildung 15C). Die Degradationskinetik ist im Falle der Y98H-Mutante nur geringfügig schneller als beim Wildtyp. Dagegen wurden die Y98N-, Y112H- und Y112N-Mutanten schneller als die Y98H-Mutante und auch der Wildtyp abgebaut, was auf eine geringere Stabilität hinweist.

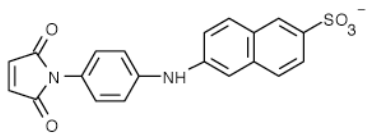
Die Stabilitätsuntersuchungen der VCB-Komplexe mittels Harnstoffdenaturierung und partieller Proteolyse lieferten konsistente Resultate. Die Y98H-Mutante ist etwas instabiler als der Wildtyp, während die Mutanten Y98N, Y112H und Y112N deutlich destabilisiert sind.

### 3.1.4. Bindungsstudien der VCB-Komplexe

#### 3.1.4.1. Etablierung eines Modellsubstrates

HIF1 $\alpha$  ist das bisher am besten charakterisierte pVHL-Substrat. Für die Bindungsstudien mit dem VCB-Komplex wurden zwei Peptide synthetisiert, die von HIF1 $\alpha$  (Aminosäuren 558-567) abgeleitet wurden (Abbildung 16). Beide Peptide besitzen das LXXLAP-Motiv. Das Hyp-Peptid besitzt anstelle des Prolins (Aminosäure 564 in HIF1 $\alpha$ ) ein Hydroxyprolin. Für die Bindungsstudien wurde eine Fluoreszenzgruppe an den C-terminalen Cysteinrest der Peptide gekoppelt. Die MIANS-Gruppe (*maleimidyl-anilino-naphthalene-6-sulfonic acid*) ist ein Fluoreszenzmarker (Abbildung 14),

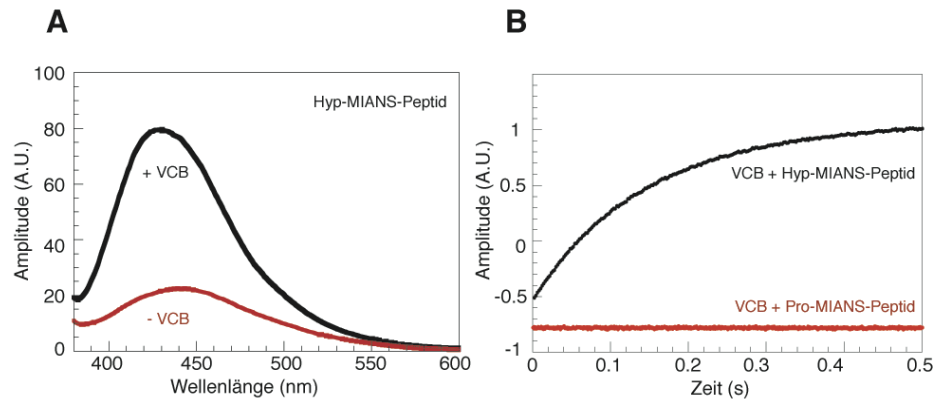
welcher sehr sensitiv auf die jeweilige chemische Umgebung reagiert und aus diesem Grund ideal für Bindungsstudien ist.

Pro-Peptid	H <sub>2</sub> N-DLEMLA <u>P</u> YIPC-OH
Hyp-Peptid	H <sub>2</sub> N-DLEMLA <u>Q</u> YIPC-OH
MIANS	

**Abbildung 16: Die Modellsubstrate und der Fluoreszenzmarker**

Für die Substratbindungsstudien wurden Peptide synthetisiert, die von HIF1 $\alpha$  abgeleitet wurden. Das Prolin-Peptid (Pro-Peptid) besitzt ein nicht-modifiziertes Prolin, wogegen das Hyp-Peptid ein hydroxyliertes Prolin besitzt. Die MIANS-Gruppe (*maleimidyl-anilino-naphthalene-6-sulfonic acid*) ist ein Fluoreszenzmarker, welcher für Bindungsstudien genutzt werden kann. Der Fluoreszenzmarker wurde über den C-terminalen Cysteinrest an die Peptide gekoppelt.

Durch 3D-Scans wurden die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die MIANS-gekoppelten Peptide ermittelt. Für die MIANS-Gruppe wurde eine Anregungswellenlänge von 326 nm festgelegt. Die Abbildung 17A zeigt die Fluoreszenzspektren des Hyp-MIANS-Peptides mit und ohne VCB-Wildtyp-Komplex. Mit dem VCB-Komplex und dem Hyp-Peptid wurde ein erhöhtes Fluoreszenzsignal und eine Verschiebung des Maximums (von 440 nm auf 430 nm) detektiert, demzufolge konnte das hydroxylierte Peptid den VCB-Komplex binden (Abbildung 15A). Die Abbildung 15B zeigt die Assoziationskinetiken der Fluoreszenz-gekoppelten Pro- und Hyp-Peptide mit dem VCB-Wildtyp-Komplex gemessen mit der *Stopped-Flow*-Technik. Hier wurde deutlich, dass nur mit dem hydroxylierten Substrat eine Interaktion stattfindet, denn nur mit dem Hyp-MIANS-Peptid wurde eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals gemessen.



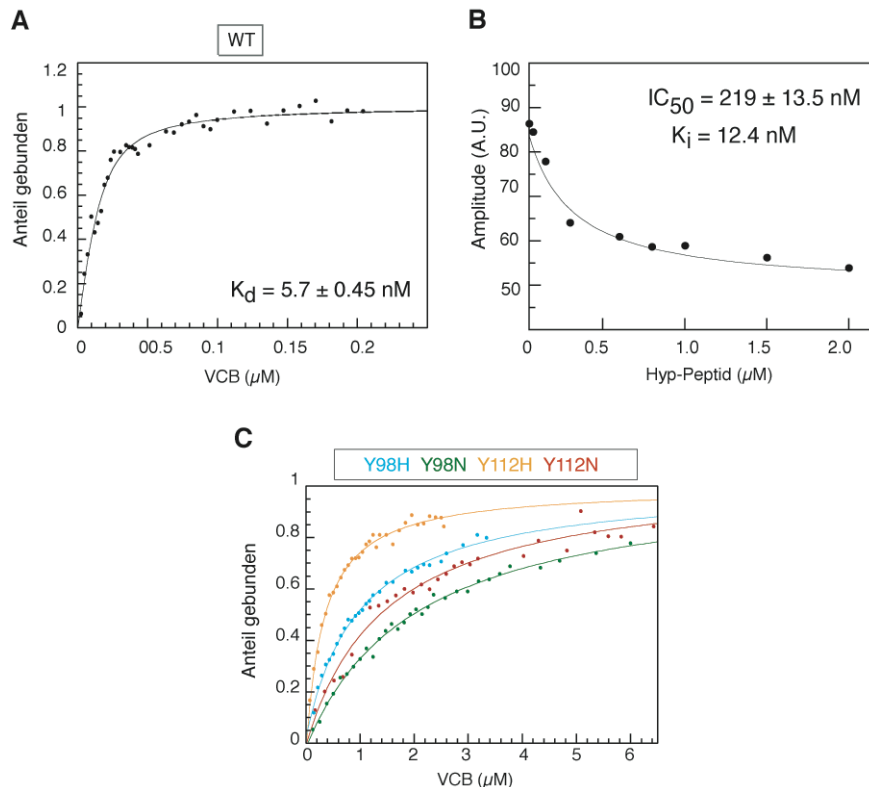
**Abbildung 17: Tests zur Bindung der Fluoreszenz-gekoppelten Modellsubstrate an den VCB-Komplex**

**A)** Fluoreszenzmessungen (Anregung: 326 nm) mit dem Hyp-MIANS-Peptid (30 nM) zeigen bei Zugabe des VCB-Komplexes (500 nM) eine Erhöhung und Verschiebung des Maximums (430 nm) des Fluoreszenzsignals. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals kann als Signal für die Bindung genutzt werden. **B)** Assoziationskinetik des Hyp-MIANS- bzw. des Pro-MIANS-Peptides (200 nM) mit dem VCB-Komplex (1000 nM). Nur mit dem Hyp-MIANS-Peptid konnte eine Erhöhung der Amplitude detektiert werden, demnach bindet nur das hydroxylierte Peptid an den VCB-Komplex.

### 3.1.4.2. Bindungsaffinitäten

Um die Affinitäten der VCB-Komplexe für das Modellsubstrat zu bestimmen, wurden Gleichgewichtstitrationen durchgeführt. Zu einer konstanten Konzentration an Hyp-MIANS-Peptid wurde der VCB-Komplex titriert, das Fluoreszenzsignal gemessen und so eine Sättigungskurve erhalten. Die Abbildung 18A zeigt die Titration des Wildtyp-VCB-Komplexes mit dem Hyp-MIANS-Peptid. Aus den Daten wurde die Gleichgewichtskonstante ( $K_d$ ) bestimmt (Gleichung siehe 5.5.10.1). Der Wildtyp-Komplex zeigte eine hohe Affinität zum Substrat im nanomolaren Bereich (5,7 nM). Um den Beitrag der MIANS-Gruppe an der Bindung zu bestimmen, wurden Konkurrenzexperimente mit dem unmarkierten Hyp-Peptid durchgeführt. Dazu wurden zu dem VCB-Wildtyp-Komplex und dem Hyp-MIANS-Peptid steigende Konzentrationen an unmarkiertem Hyp-Peptid titriert. Aufgrund der Konkurrenz mit diesem Peptid wurde eine Fluoreszenzabnahme detektiert und diese gegen die Konzentration des unmarkierten Peptides aufgetragen. Durch eine Kurvenanpassung (Gleichung siehe 5.5.10.3.) wurde daraus die

halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) berechnet (Abbildung 18B). Dieser  $IC_{50}$ -Wert erlaubt die Berechnung der inhibitorischen Konstante ( $K_i$ ), die der Dissoziationskonstanten des unmarkierten Peptides entspricht und im Falle des VCB-Komplexes bei etwa 12 nM lag. Der Vergleich der beiden Dissoziationskonstanten für das unmarkierte bzw. das Fluoreszenz-markierte Peptid (12 nM und 6 nM) zeigt, dass der Einfluss der MIANS-Gruppe auf die Bindung gering ist.



**Abbildung 18: Bindungsstudien der VCB-Komplexe mit den HIF-Peptiden**

**A)** Gleichgewichtstitrationen des Wildtyp-VCB-Komplexes mit dem Hyp-MIANS-Peptid; Zu einer konstanten Konzentration an Peptid (15 nM) wurde der VCB-Komplex titriert und die Fluoreszenz bei 430 nm (Anregung: 326 nm) bei 20 °C gemessen. Die Daten wurden exponentiell gefittet und die Gleichgewichtskonstanten ( $K_d$ ) bestimmt (siehe Tabelle 2). Die Gleichung zur Kurvenanpassung befindet sich unter 5.5.10.2. (Buchberger *et al.*, 1999).

**B)** Konkurrenzexperimente um den Einfluss der MIANS-Gruppe zu ermitteln; Zu je 100 nM VCB-Komplex bzw. Hyp-MIANS-Peptid wurde das Hyp-Peptid titriert und die Fluoreszenz bei 430 nm (Anregung: 326 nm) bei 20 °C gemessen. Die Daten wurden exponentiell gefittet und die halbmaximale inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) und die inhibitorische Konstante ( $K_i$ ) erhalten. Die Gleichungen zur Kurvenanpassung befinden sich unter 5.5.10.3. (Cho *et al.*, 2005, Cheng, 2001).

**C)** Gleichgewichtstitrationen der Tumor-assoziierten VCB-Komplexe mit dem Hyp-MIANS-Peptid; Zu einer konstanten Konzentration an Peptid (50 bzw. 500 nM) wurde der VCB-Komplex titriert und die Fluoreszenz bei 430 nm (Anregung: 326 nm) bei 20 °C gemessen. Die Daten wurden exponentiell gefittet und die Gleichgewichtskonstanten ( $K_d$ ) bestimmt (siehe Tabelle 3). Die Gleichung zur Kurvenanpassung befindet sich unter 5.5.10.2. (Buchberger *et al.*, 1999).



Nach der Etablierung der Gleichgewichtstitration für den Wildtyp-VCB-Komplex wurden für die Mutanten-VCB-Komplexe ebenfalls Titrations durchgeföhrt und die  $K_d$ -Werte ermittelt (Abbildung 18C). In der Tabelle 3 sind die  $K_d$ -Werte für die einzelnen VCB-Komplexe zusammengefasst. Die Tumor-assoziierten VCB-Komplexe besitzen eine geringere Affinität für das Substrat als der Wildtyp. Für die Y112H- und Y98H-Mutanten wurden  $K_d$ -Werte von 330 bzw. 890 nM ermittelt. Die Y112N- und Y98N-Mutanten besitzen hingegen  $K_d$ -Werte von 1010 und 1740 nM.

Durch Gleichgewichtstitrationen konnte somit gezeigt werden, dass die Asparagin-Mutanten (Typ 2B) eine geringere Affinität zum Substrat aufweisen, als die entsprechenden Histidin-Mutanten (Typ 2A).

### 3.1.4.3. Studien zur Substratbindungskinetik der VCB-Komplexe

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von  $K_d$ -Werten ist die Messung der Assoziations- und Dissoziationskinetiken. Vorexperimente mit dem VCB-Komplex zeigten, dass diese Kinetiken zu schnell für die Bestimmung durch manuelle Mischexperimente waren, daher wurden *Stopped-Flow*-Experimente durchgeföhrt. Die *Stopped-Flow*-Technik nutzt man für sehr schnelle Kinetiken um sowohl Dissoziationsraten ( $k_{off}$ ), als auch Assoziationsraten ( $k_{on}$ ) zu bestimmen. Um die  $k_{off}$ -Werte der Tumor-assoziierten VCB-Komplexe experimentell zu erhalten, wurde der VCB-Komplex mit dem Hyp-MIANS-Peptid inkubiert. Nach der Zugabe an unmarkiertem Hyp-Peptid (im Überschuss) wurde die Abnahme des Fluoreszenzsignals detektiert (Abbildung 19A, B). Die Kurven wurden einfach exponentiell gefittet, um die  $k_{off}$ -Werte zu berechnen (Gleichung siehe 5.5.10.4.). Tabelle 3 zeigt die Dissoziationsraten der verschiedenen Komplexe. Für den Wildtyp konnte ein  $k_{off}$ -Wert von  $0.02 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden, dagegen waren die  $k_{off}$ -Werte der Mutanten 80- 225-fach höher.

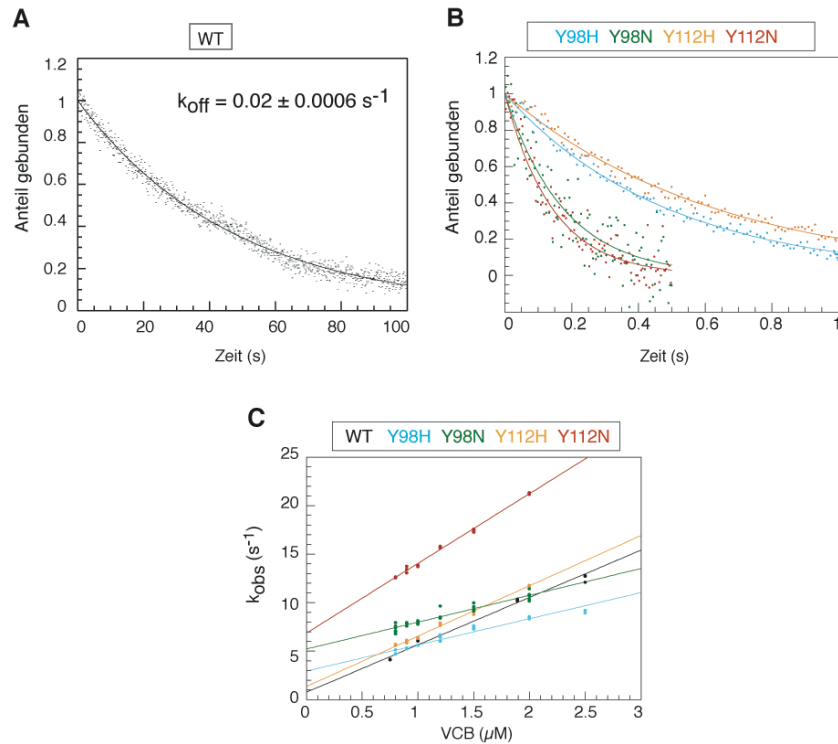
## Ergebnisse

pVHL	$k_{\text{off}}$ (Dissoziation) ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{off}}$ (Assoziation) ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{on}}$ (Assoziation) ( $\times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$K_d$ (berechnet) ( $\times 10^{-9} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$K_d$ (Titration) ( $\times 10^{-9} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
WT	$0.02 \pm 0.0003$	$0.37 \pm 0.002$	$5.13 \pm 0.005$	3.9	$5.7 \pm 0.45$
Y98H	$2.1 \pm 0.03$	$2.95 \pm 0.16$	$2.69 \pm 0.106$	766	$894 \pm 28$
Y98N	$5.7 \pm 0.30$	$5.27 \pm 0.02$	$2.69 \pm 0.014$	2026	$1739 \pm 22$
Y112H	$1.6 \pm 0.01$	$1.36 \pm 0.01$	$5.18 \pm 0.008$	307	$335 \pm 8$
Y112N	$7.0 \pm 0.2$	$6.89 \pm 0.02$	$7.17 \pm 0.019$	978	$1006 \pm 14$

**Tabelle 3: Bindungskonstanten der VCB-Komplexe**

Die Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ) wurde sowohl direkt aus den Dissoziationsexperimenten, als auch indirekt aus den Assoziationsexperimenten bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante ( $K_d$ ) wurde aus den  $k_{\text{off}}$ -Werten der Dissoziation und den  $k_{\text{on}}$ -Werten der Assoziation berechnet. Der  $K_d$ -Wert aus den Gleichgewichtstitrationen ist zum Vergleich angegeben (Gleichungen siehe 5.5.10.).

Um die Assoziationskinetiken zu untersuchen, wurden steigende Konzentrationen der VCB-Komplexe mit dem Hyp-MIANS-Peptid versetzt und die Erhöhung des Fluoreszenzsignals sofort gemessen. Die Fluoreszenzzunahme wurde wiederum einfach exponentiell gefittet und die scheinbaren Assoziationsraten ( $k_{\text{obs}}$ ) erhalten. Die Abbildung 19C zeigt die Auftragung dieser ermittelten  $k_{\text{obs}}$ -Werte gegen die VCB-Konzentrationen. Durch eine lineare Anpassung erhält man den Anstieg der Geraden, welcher der Assoziationsrate ( $k_{\text{on}}$ ) entspricht. Der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse entspricht der Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ). Die Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.



**Abbildung 19: Dissoziations- und Assoziationsexperimente mittels *Stopped-Flow*-Technik**

**A)** Dissoziationskinetik des Wildtyp-VCB-Komplexes mit den Modellsubstraten (Hyp-MIANS und Hyp); Zu einer definierten Konzentration (50 nM) an VCB-Komplex und Hyp-MIANS-Peptid (1:1) wurde das Hyp-Peptid (im Überschuss) gegeben und sofort die Dissoziationskinetik mittels *Stopped-Flow*-Technik gemessen (Anregung: 326 nm, cut off filter 375 nm). Die Daten wurden anschließend einfach exponentiell gefittet und die Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ) bestimmt (siehe Tabelle 2, Gleichung siehe 5.5.10.4.). **B)** Dissoziationskinetiken der Mutanten-VCB-Komplexe mit den Modellsubstraten; Zu einer definierten Konzentration (200 nM) an VCB-Komplex und Hyp-MIANS-Peptid (1:1) wurde das Hyp-Peptid (im Überschuss) gegeben und sofort die Dissoziationskinetik gemessen (Anregung: 326 nm, cut off filter 375 nm). Die Daten wurden anschließend einfach exponentiell gefittet und die Dissoziationsraten ( $k_{\text{off}}$ ) bestimmt (siehe Tabelle 2, Gleichung siehe 5.5.10.4.). **C)** Assoziationskinetiken der VCB-Komplexe mit den Modellsubstraten; Zu einer definierten Konzentration an Hyp-MIANS-Peptid wurde der VCB-Komplex gegeben und sofort die Assoziationskinetik mittels *Stopped-Flow*-Technik gemessen (Anregung: 326 nm, cut off filter 375 nm). Die Daten wurden anschließend einfach exponentiell gefittet und die scheinbaren Assoziationsraten ( $k_{\text{obs}}$ ) bestimmt (siehe Tabelle 2). Durch die Auftragung dieser  $k_{\text{obs}}$ -Werte gegen die Konzentrationen des VCB-Komplexes und einer linearen Anpassung erhält man aus dem Anstieg die Assoziationsraten ( $k_{\text{on}}$ ) und aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse die  $k_{\text{off}}$ -Werte.

Vergleicht man die  $K_d$ -Werte der Gleichgewichtstitrationen mit den berechneten  $K_d$ -Werten der *Stopped-Flow*-Experimente so wird deutlich, dass beide experimentellen Ansätze sehr ähnliche Ergebnisse lieferten. Auffällig sind die Unterschiede für  $k_{\text{off}}$ -Werte des Wildtyps. Die direkte Bestimmung der Dissoziationsrate aus den Dissoziationsexperimenten ergab einen  $k_{\text{off}}$ -Wert von  $0.02 \text{ s}^{-1}$ , dagegen wurde durch die Assoziationsexperimente ein  $k_{\text{off}}$ -Wert

von  $0.37 \text{ s}^{-1}$  ermittelt. Aufgrund der Extrapolation gegen Null sind geringe  $k_{\text{off}}$ -Werte allerdings mit einem hohen Fehler behaftet. Aus diesem Grund kommt es zu der Differenz bei den Dissoziationsraten des Wildtyps.

Vergleicht man die erhaltenen Assoziations- und Dissoziationsraten der Mutanten mit denen des Wildtyps lässt sich feststellen, dass sich die  $k_{\text{on}}$ -Werte (0.5-2-fach) im Gegensatz zu den  $k_{\text{off}}$ -Werten (80-225-fach) kaum vom Wildtyp unterscheiden. Weiterhin wurde deutlich, dass die  $k_{\text{off}}$ -Werte der Asparagin-Mutanten 3-4-fach höher waren als die der korrespondierenden Histidin-Mutanten. Diese Ergebnisse werden noch einmal klarer, betrachtet man die Gleichgewichtskonstanten. Für die Histidin-Mutanten konnten  $K_{\text{d}}$ -Werte im Bereich von 300-900 nM ermittelt werden, dagegen wurden für die Asparagin-Mutanten  $K_{\text{d}}$ -Werte im Bereich von 1000-2000 nM erhalten.

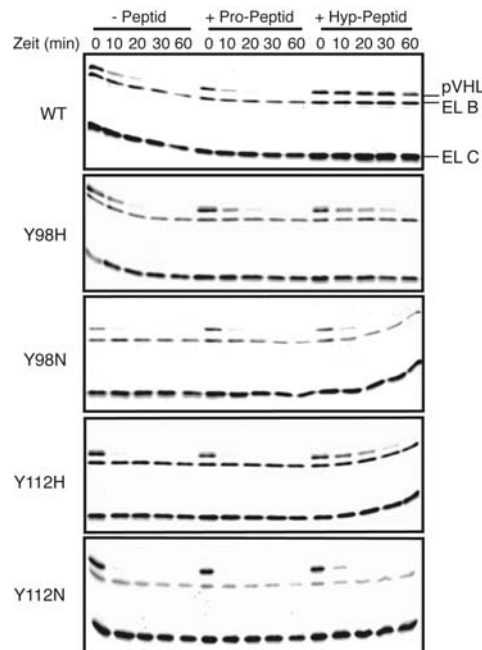
Mit den *Stopped-Flow*-Experimenten konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass die Asparagin-Mutanten aufgrund der schnelleren Dissoziation geringere Affinitäten für das Substrat aufweisen als die Histidin-Mutanten.

### **3.1.4.4. Partielle Proteolyse mit den Peptiden**

Zusätzlich zu den Fluoreszenzexperimenten wurde ein anderer qualitativer Ansatz genutzt, um Aussagen über die strukturelle Konsequenz der Substratbindung der Tumor-assoziierten VCB-Komplexe zu erhalten. Die partielle Proteolyse mit Trypsin war geeignet, um die Interaktion von pVHL mit dem Substrat bei  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  zu überprüfen. Trypsin ist eine Serinprotease, welche hauptsächlich hinter Arginin und Lysin schneidet. Die Modellsubstrate (HIF-Peptide) besitzen keine Arginine oder Lysine und stellen deshalb auch keine kompetitiven Inhibitoren der Trypsinaktivität dar.

Es wurde vermutet, dass der VCB-Komplex durch die Substratbindung stabilisiert werden kann, denn auch der Wildtyp-Komplex konnte von Trypsin geschnitten werden (Abbildung 15C). Um dies genauer zu untersuchen, wurden Trypsinverdauungen mit dem Hyp-Peptid bzw. dem Pro-Peptid und dem VCB-Komplex bei  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Komplexe wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit der Peptide (10-facher Überschuss,  $25 \text{ } \mu\text{M}$ ) mit Trypsin

inkubiert. Nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mit dem Trypsininhibitor PMSF versetzt.



**Abbildung 20: Partielle Proteolyse bei 37 °C mit HIF-Peptiden und den VCB-Komplexen**  
 Je 8  $\mu\text{g}$  VCB-Komplex wurden mit 80 ng Trypsin inkubiert. Die Peptide wurden im Überschuss zu den Ansätzen gegeben (25  $\mu\text{M}$ ). Zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30 und 60 Minuten wurden Proben entnommen und mit dem Proteaseinhibitor PMSF (1  $\mu\text{M}$ ) abgestoppt. Nach der Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Proben mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert.

Das Prolin-Peptid konnte in allen Fällen pVHL nicht stabilisieren und wies keinen Unterschied zu dem Experiment ohne Peptid auf (Abbildung 20).

Dagegen konnte der Wildtyp mit dem Hyp-Peptid signifikant stabilisiert werden und wurde im Verlauf des Experimentes nicht von Trypsin degradiert. Auch die Histidin-Mutanten wurden durch die Anwesenheit des Hyp-Peptides deutlich stabilisiert. Auch nach 30 Minuten konnte man pVHL (Y98H, Y112H) noch detektieren. Allerdings waren die Histidin-Mutanten instabiler als der Wildtyp. Die Asparagin-Mutanten zeigten nur einen sehr schwachen Effekt in Anwesenheit des Hyp-Peptides und wurden weiterhin von Trypsin geschnitten. Nach nur 20 Minuten konnte man kein pVHL (Y98N, Y112N) mehr detektieren.

Die partielle Proteolyse in Anwesenheit der HIF-Peptide zeigt deutlich, dass die Histidin-Mutanten durch die Bindung des hydroxylierten

Modellsubstrates stabilisiert werden. Dagegen wurden die korrespondierenden Asparagin-Mutanten trotz sättigender Substratkonzentrationen nicht signifikant stabilisiert.

Insgesamt zeigen die Daten, dass die Asparagin-Mutanten in Hinsicht auf die Substratbindung einen stärkeren Defekt aufweisen als die Histidin-Mutanten.

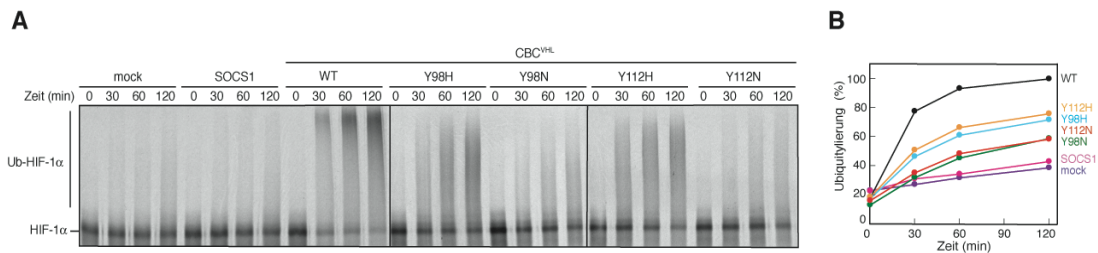
### 3.1.5. Aktivität der CBC<sup>VHL</sup>-Ubiquitin-Ligase-Komplexe

Das pVHL ist die substratbindende Untereinheit des CBC<sup>VHL</sup>-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, welcher aus Cullin 2, Elongin C, Elongin B und Rbx1 besteht. Das bisher am besten charakterisierte Substrat ist die Sauerstoff-regulierte  $\alpha$ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF. Um mögliche Unterschiede in der E3-Ligase-Aktivität zu analysieren, wurde die Ubiquitylierungs-Aktivität der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Dazu wurden 293T-Zellen mit FLAG-pVHL- und HA-Cullin2-Konstrukten transient transfiziert. Elongin B und C, sowie Rbx1 sind in der Zelle nicht limitierend. Nach der Lyse der Zellen wurde der Überstand nach der Zentrifugation mit FLAG-M2-Agarose inkubiert und der CBC<sup>VHL</sup>-Komplex präzipitiert (Miller *et al.*, 2005). Für die Ubiquitylierungsreaktion wurde das Substrat HIF1 $\alpha$  *in vitro* translatiert. Nach der IVT wurde HIF1 $\alpha$  und der präzipitierte CBC<sup>VHL</sup>-Komplex für zwei Stunden bei 4 °C vorinkubiert. Anschließend wurden der E3-Komplex und das Substrat mit dem aktivierenden und konjugierenden Enzym (E1, E2), ATP und Ubiquitin bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und nach SDS-PAGE mittels Autoradiographie ausgewertet.

Abbildung 21 zeigt ein repräsentatives Experiment zur Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$  (Abbildung 21A) sowie die Quantifizierung von 4 Einzelexperimenten (Abbildung 21B). Als Kontrollen dienten Immunpräzipitate von Zellen, die mit dem Leervektor (pcDNA) bzw. FLAG-SOCS1 transfiziert wurden. SOCS1 ist wie pVHL die substraterkennende Untereinheit eines E3-Ligase-Komplexes, bildet aber einen Komplex mit Cullin 5 und ist nicht an der Regulation von

HIF1 $\alpha$  beteiligt. In der Abbildung 21A ist keine Veränderung der HIF1 $\alpha$ -Bande erkennbar.



**Abbildung 21: Überprüfung der E3-Ligase-Aktivität der VCB-Komplexe (WT, Y98, Y112)**

**A)** Nach der Transfektion von Cullin 2 und FLAG-pVHL bzw. den Kontrollen in humane 293T-Zellen wurden die CBC<sup>VHL</sup>-Komplexe mit FLAG-M2-Agarose präzipitiert. Das Substrat HIF1 $\alpha$  wurde nach der *in vitro* Translation mit dem präzipitierten E3-Ligase-Komplex vorinkubiert, und anschließend mit dem aktivierenden Enzym (E1, Uba1), dem konjugierenden Enzym (E2, GST-Ubc5a), Ubiquitinaldehyd, Ubiquitin und ATP versetzt. Die Ubiquitylierungsreaktion wurde bei 37 °C durchgeführt und zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proben mittels Autoradiographie ausgewertet. **B)** Die Quantifizierung aus vier verschiedenen Experimenten zeigt die Ubiquitylierungseffizienz der einzelnen Komplexe. Die Kontrollen des Leervektors und eines mit FLAG-fusionierten Proteins (FLAG-SOCS1) zeigen keine Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$ .

Bei dem Wildtyp-CBC<sup>VHL</sup>-Komplex wurden schon nach 30 Minuten hochmolekulare HIF1 $\alpha$ -Reaktionsprodukte detektiert, welche multiubiquityliertes HIF1 $\alpha$  repräsentieren. Im Falle der Histidin-Mutanten wurden ebenfalls ubiquitylierte HIF-Moleküle nachgewiesen, allerdings ist die Aktivität geringer als bei dem Wildtyp-Komplex. Auch die Asparagin-Mutanten zeigten E3-Ligase-Aktivität. Die Ubiquitylierungseffizienz der Typ 2B-Mutanten lag über den Kontrollen für den Leervektor und SOCS1 (Abbildung 21B).

Die Quantifizierung aus vier Experimenten zeigt deutlich, dass die Histidin-Mutanten (Y98H, Y112H) das Substrat ubiquitylieren können. Auch die Asparagin-Mutanten können noch HIF ubiquitylieren, allerdings mit geringer Aktivität. Durch diese Experimente konnten signifikante Unterschiede in der Ubiquitylierungs-Aktivität der E3-Komplexe nachgewiesen werden, wobei die Typ 2B-Mutanten (Y98N, Y112N) wiederum die stärkeren Defekte zeigten.

### 3.1.6. Zusammenfassung Typ 2A-und 2B-Mutanten

Durch quantitative biochemische Methoden konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Mutanten der VHL-Krankheitstypen 2A und 2B, die sich im Risiko für Nierenzellkarzinome unterscheiden, gibt. Sowohl bei den Stabilitätsuntersuchungen als auch bei den Bindungsexperimenten und den Ubiquitylierungs-Aktivitäten besaßen die Typ 2B-Mutanten (Y98N, Y112N) die stärkeren Defekte. Die Typ 2A-Mutanten (Y98H, Y112H) konnten das Modellsubstrat mit einer höheren Affinität binden als die 2B-Mutanten, wurden durch die Zugabe des Modellsubstrates stabilisiert und zeigten eine höhere Ubiquitylierungs-Aktivität als die 2B-Mutanten. Demnach korreliert das Risiko, Nierenzellkarzinome zu entwickeln, mit der Stabilität von pVHL und der HIF1 $\alpha$ -Substratinteraktion.

### 3.2. Analyse von Typ 2C-assoziierten pVHL-Mutanten

Nach der Charakterisierung der Typ 2A und Typ 2B-Mutanten sollten weitere Tumor-assoziierte pVHL-Mutanten insbesondere des Typs 2C *in vitro* mit den zuvor etablierten experimentellen Ansätzen untersucht werden. Für den Typ 2C der VHL-Krankheit zeigten qualitative Studien, dass diese Mutanten noch HIF1 $\alpha$  regulieren können (Clifford *et al.*, 2001, Hoffman *et al.*, 2001). Bisher wurde nicht geklärt, welche Defekte diese Mutanten außer der Fibronectinbindung aufweisen.

Die L188V-Mutante ist die bisher am besten charakterisierte Typ 2C-Mutante. Bei einem wiederholten Screening der Patienten-DNAs wurde allerdings neben der L188V-Mutation eine zusätzliche Mutation (P81S) identifiziert (Weirich *et al.*, 2002). Bisher publizierte Studien könnten aus diesem Grund eventuell irreführend sein. Deshalb wurden neben der Doppelmutante P81S/L188V auch die Einzelmutanten P81S und L188V näher charakterisiert, um möglicherweise additive Effekte nachzuweisen.

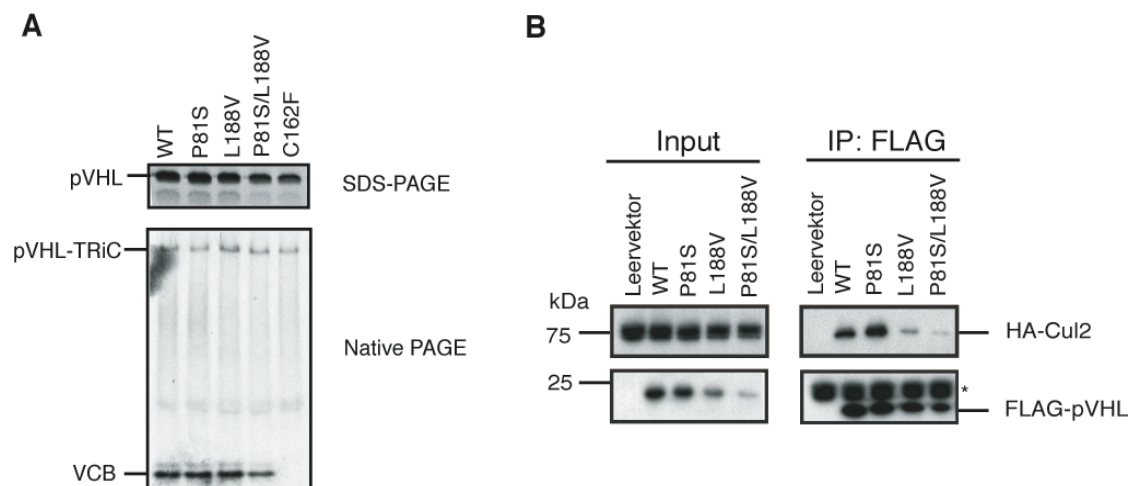


### 3.2.1. Assemblierung der Komplexe

Die Komplexe wurden, wie bereits unter 3.1.1. beschrieben, aufgereinigt. Die Ausbeute der L188V-Mutante und der Doppelmutante P81S/L188V waren wesentlich geringer als für die P81S-Mutante und den Wildtyp, was auf einen Defekt in der Stabilität oder Assemblierung der VCB-Komplexe hinweisen könnte.

#### 3.2.1.1. TRiC-abhängige Assemblierung

Die TRiC-abhängige Assemblierung des VCB-Komplexes wurde nach der *in vitro* Translation der pVHL-Konstrukte bei 30 °C in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin überprüft. Für die P81S- und die L188V-Einzelmutanten wurden keine Assemblierungsdefekte nachgewiesen, ein stabiler VCB-Komplex wurde ausgebildet (Abbildung 22A). Bei der Doppelmutante P81S/L188V wurde weniger VCB-Komplex im Nativgel detektiert, was auf einen Defekt hinweisen könnte. Als Kontrolle diente wiederum die assemblierungsdefiziente C162F-Mutante (siehe 3.1.2.1.).



**Abbildung 22: Assemblierung der VCB-Komplexe**

**A)** Die Autoradiographie der SDS-PAGE nach der *in vitro* Translation von pVHL bei 30°C in Retikulozytenlysat zeigt gleiche Mengen an pVHL. Die Autoradiographie des Nativgels nach der *in vitro* Translation zeigt die Bildung der VCB-Komplexe bzw. die Bindung von pVHL an TRiC. Als Marker wurden rekombinantes TRiC und rekombinanter VCB-Komplex aufgetragen und mit Coomassie angefärbt (Daten nicht gezeigt). **C)** Nach der Transfektion von FLAG-pVHL und Cullin 2 wurden die E3-Ligase-Komplexe (CBC<sup>VHL</sup>) mit FLAG-M2-Agarose präzipitiert und mittels SDS-PAGE und Western Blots analysiert. (\* leichte Kette des Antikörpers)

### **3.2.1.2. Immunpräzipitation der CBC<sup>VHL</sup>-Komplexe**

Um zu überprüfen, ob Defekte in der Bildung der E3-Ligase-Komplexe vorliegen, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt.

Nach der transienten Transfektion von FLAG-pVHL und HA-Cullin 2 wurden die CBC<sup>VHL</sup>-Komplexe mit FLAG-M2-Agarose präzipitiert und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 22B). Aus den Immunblots wurde deutlich, dass sehr wenig Cullin 2 mit den pVHL-Mutanten L188V und P81S/L188V kopräzipitiert werden konnte. Die E3-Ligase-Komplexe der L188V- und P81S/L188V-Mutanten wurden nicht vollständig präzipitiert, da im Vergleich zum Wildtyp und der P81S-Mutante weniger Cullin 2 an FLAG-pVHL gebunden wurde. Darüber hinaus fällt auf, dass signifikant niedrigere Mengen im Input detektiert wurden. Dies könnte auf eine geringere Stabilität dieser Mutanten bei 37 °C hinweisen. Demnach besitzen die CBC<sup>VHL</sup>-Komplexe der Mutanten L188V und P81S/L188V Assemblierungsdefekte. Dagegen wurden für den Wildtyp und die P81S-Mutante gleiche Mengen an E3-Ligase-Komplex erhalten.

Da die Untereinheiten der CBC<sup>VHL</sup>-Komplexe (L188V, P81S/L188V) nicht in stöchiometrischen Mengen vorliegen, wurden keine Ubiquitylierungs-Experimente durchgeführt, um Aussagen über die Aktivität dieser E3-Ligase-Komplexe zu erhalten.

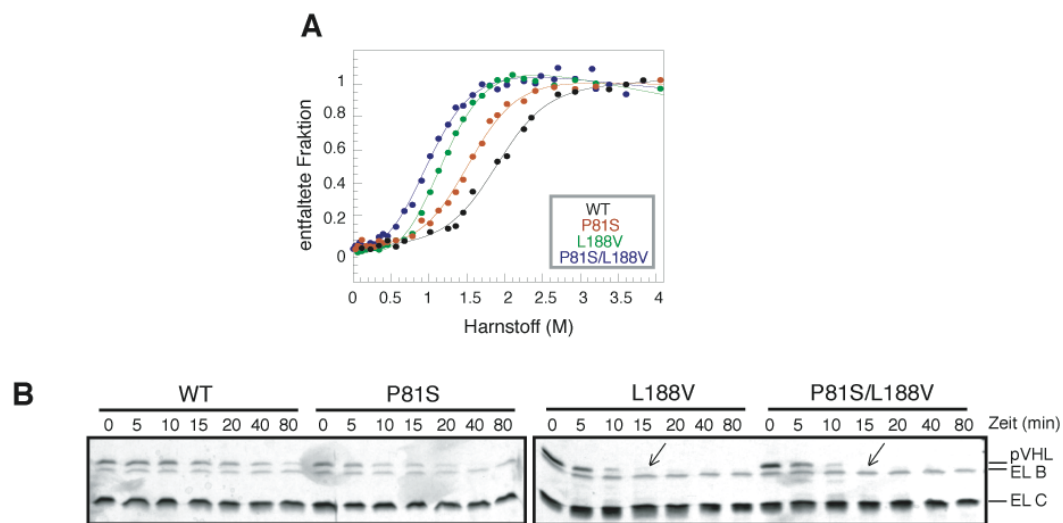
### **3.2.2. Stabilität der VCB-Komplexe**

#### **3.2.2.1. Chemische Denaturierung**

Mit den rekombinanten VCB-Komplexen P81S, L188V und P81S/L188V wurden Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge gemessen. Für Abbildung 23 wurden die Werte aus drei unabhängigen Harnstoffdenaturierungs-Experimenten gemittelt. Die Übergänge wiesen wiederum keine lokalen Minima (Intermediate) auf und zeigten Unterschiede in der Stabilität der Komplexe im Vergleich zum Wildtyp. Durch Kurvenanpassung wurden die

Anstiege (m-Werte) ermittelt. Um die Ergebnisse der Entfaltungsübergänge besser vergleichen zu können, wurde der m-Wert, wie auch schon bei den Typ 2A- und 2B-Mutanten, fixiert (1.73 kcal/(mol M)).

Die P81S-Mutante besitzt eine etwas geringere Stabilität als der Wildtyp ( $D_{50\%}=1.51$  M; WT- $D_{50\%}=1.84$  M). Die L188V-Einzelmutante und die P81S/L188V-Doppelmutante waren beide instabiler als die P81S-Mutante, wobei die L188V-Mutante ( $D_{50\%} = 1.06$  M) etwas stabiler war als die Doppelmutante ( $D_{50\%} = 0.83$  M). Die Ergebnisse der Denaturierung sind in Tabelle 4 zusammengefasst.



**Abbildung 23: Stabilitätsuntersuchungen der VCB-Komplexe**

**A)** Die VCB-Komplexe (250 nM) wurden mit steigenden Konzentrationen an Harnstoff (0- 4M) versetzt und über Nacht bei 10 °C inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 354 nm detektiert (Anregung: 290 nm). Aus den Daten wurden durch Kurvenanpassung die thermodynamischen Parameter (siehe Tabelle 4) ermittelt (unter 5.5.9.1. beschrieben (Pace, 1990, Killenberg-Jabs *et al.*, 2002, Clarke und Fersht, 1993). **B)** Rekombinanter VCB-Komplex (8 µg) wurde mit Trypsin (10 ng) bei 37 °C inkubiert und nach 0, 10, 20, 30, 60 min Proben entnommen. Sofort danach wurden die Proben mit PMSF (Proteaseinhibitor, 1 µM) abgestoppt und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach der SDS-PAGE wurde der VCB-Komplex mittels Silberfärbung angefärbt.

Durch die Harnstoff-Titrationsen konnte gezeigt werden, dass die L188V-Einzelmutante und die Doppelmutante P81S/L188V deutlich destabilisiert sind. Dabei wurde klar, dass die Doppelmutante die geringste Stabilität aufwies, die deutlich unter allen anderen bisher gemessenen Mutanten des Typs 2A und 2B lagen. Die P81S-Einzelmutante verhält sich ähnlich wie die Y98H-Mutante und ist nur geringfügig gegenüber dem Wildtyp destabilisiert.

pVHL	$\Delta G_{H_2O}(\text{kcal mol}^{-1})$	$[\text{Harnstoff}]_{50\%} (\text{M})$
WT	$3.2 \pm 0.03$	$1.84 \pm 0.03$
P81S	$2.6 \pm 0.09$	$1.51 \pm 0.05$
L188V	$1.8 \pm 0.07$	$1.06 \pm 0.04$
P81S/L188V	$1.5 \pm 0.12$	$0.83 \pm 0.07$

**Tabelle 4: Ergebnisse der chemischen Denaturierung der VCB-Komplexe**

Die Werte für die freie Energie ( $\Delta G_{H_2O}$ ) und den Mittelpunkt des Entfaltungsüberganges ( $D_{50\%}$ ) wurden durch Kurvenanpassung ermittelt. Der m-Wert wurde fixiert ( $1.73 \text{ kcal}/(\text{mol M})$ ). Die Gleichungen der Kurvenanpassung sind unter 5.5.9.1. beschrieben (Pace, 1990, Killenberg-Jabs *et al.*, 2002, Clarke und Fersht, 1993).

### 3.2.2.2. Partielle Proteolyse

Um weitere Aussagen über die Stabilität zu treffen, wurden partielle Proteolyse-Experimente bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Durch Vorexperimente wurde die optimale Trypsinkonzentration ermittelt, da das Verhältnis 1:100 zwischen VCB und Trypsin (wie es für die Typ 2A und 2B-Mutanten eingesetzt wurde) zu einem sehr schnellen Abbau der pVHL-Untereinheit bei den Mutanten L188V und P81S/L188V führte. Es wurde eine Konzentration von 10 ng Trypsin (Verhältnis 1:800) für weitere Experimente eingesetzt. Die Elongine B und C waren während des Versuches stabil (Vergleich Abschnitt 3.1.3.2.), während pVHL partiell degradiert wurde (Abbildung 23B). Bei der P81S-Mutante war pVHL nach etwa 20 Minuten noch zu detektieren. Bei der L188V-Mutante dagegen war pVHL nach 15 Minuten nur noch schwach nachzuweisen. Auch die Doppelmutante zeigte eine geringe Stabilität und konnte nach 15 Minuten nicht mehr detektiert werden.

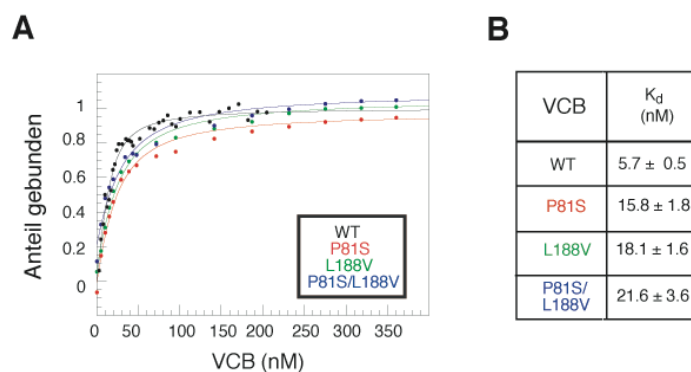
Zusammenfassend ergaben die Stabilitätsstudien mit zwei unterschiedlichen Ansätzen, der chemischen Denaturierung und der partiellen Proteolyse, das gleiche Resultat: Die P81S-Mutante war etwas instabiler als der Wildtyp. Dagegen waren die L188V-Mutante und die Doppelmutante

P81S/L188V sehr instabil, wobei der Unterschied zwischen den beiden Mutanten gering war.

### 3.2.3. Bindungsstudien der VCB-Komplexe

#### 3.2.3.1. Gleichgewichtstitrations

Die Gleichgewichtstitrations wurden mit dem Hyp-MIANS-Peptid und den rekombinanten VCB-Komplexen durchgeführt. Nach der Auftragung der VCB-Konzentration gegen das gemessene Fluoreszenzsignal (Abbildung 24A), wurde die Gleichgewichtskonstante ( $K_d$ ) ermittelt. Interessanterweise besitzen alle drei Mutanten einen ähnlichen  $K_d$ -Wert im nanomolaren Bereich und somit eine hohe Affinität für das Substrat (Abbildung 24B). Die  $K_d$ -Werte liegen im Bereich zwischen 15 - 22 nM und zeigen damit im Vergleich zum Wildtyp eine etwas geringere Affinität.



**Abbildung 24: Studien zur Substratbindung der VCB-Komplexe mit dem Modellsubstrat**

**A)** Gleichgewichtstitrations der VCB-Komplexe mit dem Hyp-MIANS-Peptid bei 20°C; Zu einer definierten Konzentration an Peptid (15 nM) wurde der VCB-Komplex titriert und das Fluoreszenzsignal bei 430 nm (Anregung: 326 nm) gemessen. Die Daten wurden exponentiell gefittet und die Gleichgewichtskonstanten bestimmt. Die Gleichung zur Kurvenanpassung befindet sich unter 5.5.10.2. (Buchberger *et al.*, 1999).

**B)** In der Tabelle sind die Gleichgewichtskonstanten ( $K_d$ ) für die VCB-Komplexe dargestellt.

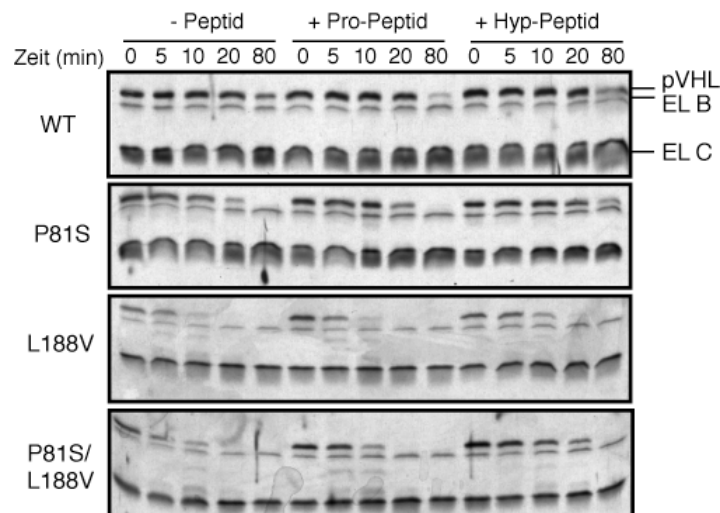
Zusätzlich zu den Gleichgewichtstitrations wurden manuelle Mischexperimente durchgeführt, um die Dissoziationsraten ( $k_{off}$ ) zu bestimmen. Die VCB-Komplexe wurden zu gleichen Konzentrationen mit dem MIANS-gekoppelten Hyp-Peptid inkubiert und nach Zugabe des nicht-

markierten Peptides die Messung gestartet. Die ermittelten  $k_{\text{off}}$ -Werte unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt).

Die Bindungsaffinitäten für die P81S-, L188V- und P81S/L188V-Mutante zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Wildtyp.

### 3.2.3.2. Partielle Proteolyse mit den Peptiden

Um zu überprüfen, ob die Substratbindung wie bei den Typ 2A-Mutanten einen Effekt auf die Stabilität der Komplexe hat, wurden Trypsinverdaus mit den Modells substraten bei 37 °C durchgeführt (Abbildung 25). Aus der Abbildung wird deutlich, dass das Prolin-Peptid wie erwartet keinen Einfluss auf die Stabilität der VCB-Komplexe hatte. Bei der P81S-Mutante war ein Effekt des Hyp-Peptides zu erkennen, pVHL wurde stabilisiert. Allerdings war aufgrund der Stabilität dieser Mutante und des Wildtyps unter den gewählten experimentellen Bedingungen ein Effekt nur bedingt messbar. Die Zugabe des Hyp-Peptides bei der L188V-Mutante und der Doppelmutante bewirkten nur eine geringfügige Stabilisierung.



**Abbildung 25: Partielle Proteolyse der VCB-Komplexe bei 37 °C mit den Peptiden**

Je 8  $\mu\text{g}$  VCB-Komplex wurde mit 10 ng Trypsin inkubiert. Die Peptide wurden im Überschuss (10  $\mu\text{M}$ ) zu den Ansätzen gegeben. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20 und 80 Minuten wurden Proben entnommen, mit dem Proteaseinhibitor PMSF (1  $\mu\text{M}$ ) abgestoppt und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte nach der SDS-PAGE mittels Silberfärbung.

Obwohl die L188V-Mutante und die Doppelmutante bei 20 °C eine hohe Substrataffinität aufwiesen (siehe  $K_d$ -Werte), wurden diese Komplexe bei 37 °C durch die Zugabe des Hyp-Peptides nur geringfügig stabilisiert.

### **3.2.4. Weitere quantitative Studien**

Da die L188V-Mutante und die Doppelmutante P81S/L188V bisher nur geringe Unterschiede zeigten, wurden weitere Experimente durchgeführt, um Aussagen über die Stabilität und vor allem über die Affinität der einzelnen Untereinheiten des VCB-Komplexes zu erhalten.

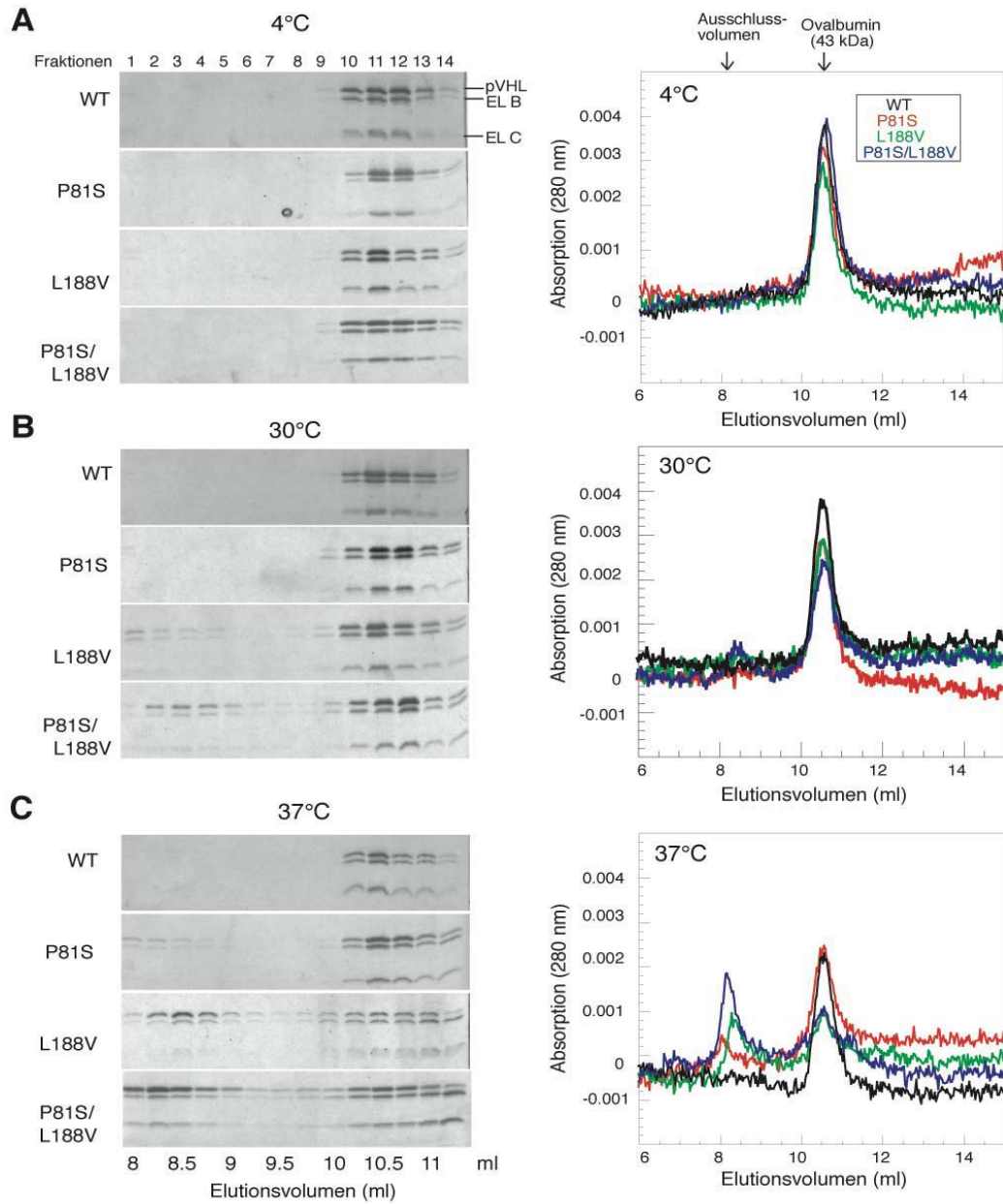
#### **3.2.4.1. Analytische Gelfiltration**

Die gereinigten rekombinanten VCB-Komplexe wurden bei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 30 °C, 37 °C) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden analytische Gelfiltrationsläufe bei 4 °C durchgeführt und die gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 26).

Bei 4 °C konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten nachgewiesen werden (Abbildung 26A). Abbildung 26B zeigt die Ergebnisse für die bei 30 °C vorinkubierten VCB-Komplexe. Hier wurde deutlich, dass die Doppelmutante einen zusätzlichen Peak im Elutionsprofil aufwies. Dieser Peak entspricht dem Ausschlussvolumen der Säule und stellt demnach aggregierten VCB-Komplex dar. Bei der Einzelmutante L188V ist im SDS-Gel ebenfalls ein zusätzlicher Peak zu erkennen. Dieser ist wahrscheinlich im Chromatogramm aufgrund des hohen Rauschsignals nicht detektierbar. Die Abbildung 26C zeigt die Resultate für die bei 37 °C vorinkubierten VCB-Komplexe. Der Effekt, der bei 30 °C bereits auftrat, wurde durch die Inkubation bei 37 °C noch verstärkt.

Die SDS-Gele zeigten deutlich, dass der Anteil an VCB-Komplex (L188V, P81S/L188V) im Ausschlussvolumen zunimmt. Auch bei der P81S-Mutante ist bei 37 °C dieser zusätzliche Peak bereits detektierbar.

Die Experimente zeigen, dass die Doppelmutante eine höhere Aggregationstendenz aufweist, als die Einzelmutante L188V. Auch die P81S-Mutante aggregiert bei 37 °C etwas stärker als der Wildtyp, aber ist stabiler als die beiden anderen Mutanten.



**Abbildung 26: Analytische Gelfiltrationen nach Inkubation der VCB-Komplexe bei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 30 °C, 37 °C)**

Je 30 µg VCB-Komplex wurden über Nacht bei den angegebenen Temperaturen inkubiert und anschließend mittels Gelfiltration (Superdex75) analysiert. Die gesammelten Fraktionen wurden mit TCA präzipitiert und im SDS-Gel analysiert. Als Marker wurden Ovalbumin und Dextranblau verwendet. **A)** Komplexe über Nacht bei 4°C vorinkubiert. **B)** Komplexe über Nacht bei 30°C vorinkubiert. **C)** Komplexe über Nacht bei 37°C vorinkubiert.



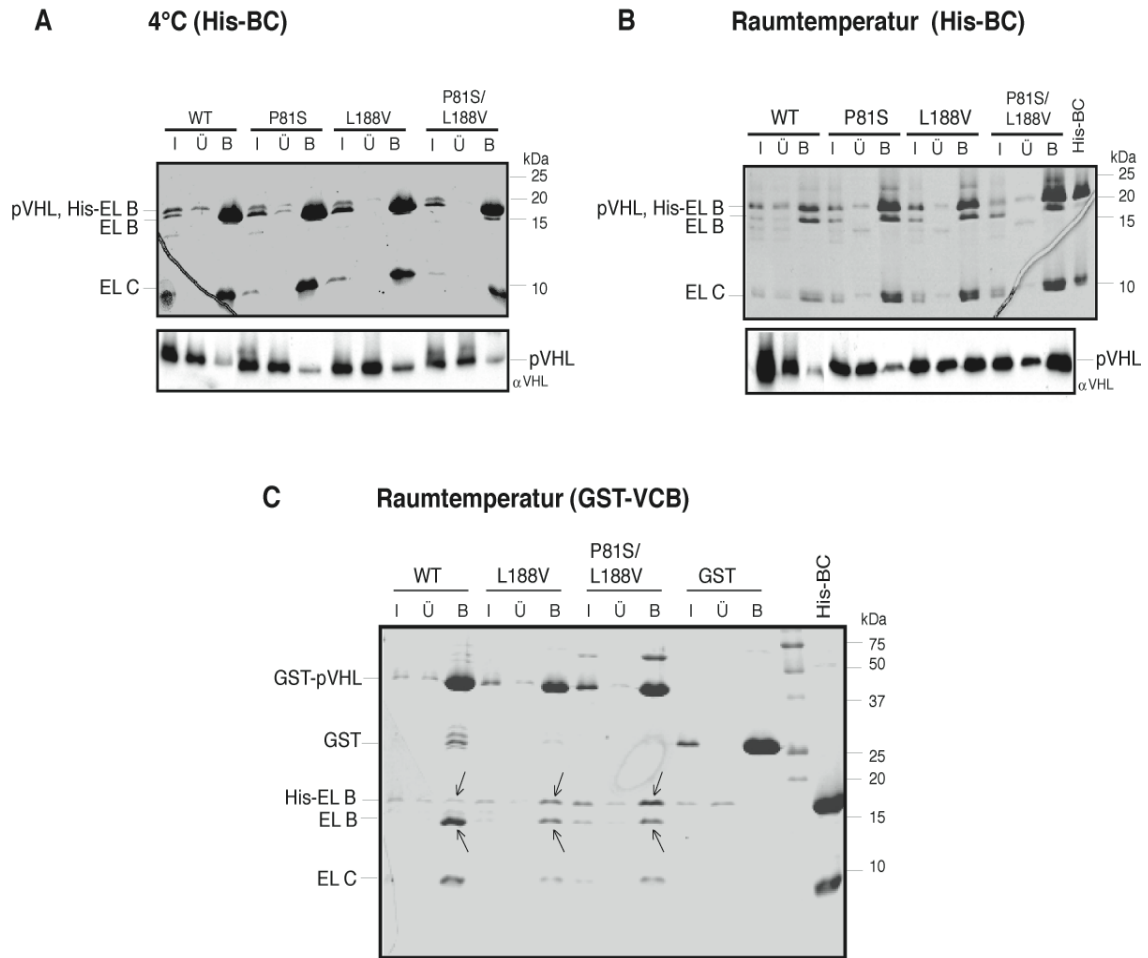
### 3.2.4.2. Kinetik der Komplex-Deassemblierung

Aus der Kristallstruktur des VCB-Komplexes geht hervor, dass der Aminosäurerest L188V an der Elongin C-Bindung indirekt beteiligt ist, indem er die Helix 1 von pVHL stabilisiert (siehe Abbildung 11). Diese Helix bildet die Hauptkontakte zu Elongin C aus.

Um zu überprüfen, ob die Einzelmutante L188V und die Doppelmutante P81S/L188V Defekte in der Assemblierung des VCB-Komplexes aufweisen, wurden *in vitro* Bindungsstudien mit rekombinanten Proteinen durchgeführt. In Konkurrenzexperimenten wurde getestet, ob die Elongine B und C unterschiedlich schnell vom Wildtyp- und Mutanten-pVHL dissoziieren.

Der Komplex aus einer Hexahistidin-Elongin B-Fusion und Elongin C (17-112) wurde nach Koexpression in *E. coli* aufgereinigt und freundlicherweise von Claudia Bex zur Verfügung gestellt. Dieser His-BC-Komplex wurde für die *in vitro* Bindungsstudien an Nickel-NTA-Agarose gebunden und anschließend mit rekombinatem VCB-Komplex bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Input, der Überstand und die an die Agarose gebundenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Zusätzlich wurden die Proben mittels Immunblot mit einem pVHL-Antikörper analysiert. Für die Aussage dieses Experiments ist die Menge von pVHL an der Matrix entscheidend. Findet ein Austausch zwischen dem rekombinanten VCB-Komplex und dem BC-Komplex statt, kann pVHL an der Agarose detektiert werden. Es liegt dann eine beschleunigte Dissoziation von pVHL vor.

Die Abbildung 27A zeigt das Konkurrenzexperiment bei 4 °C. Nur sehr wenig pVHL band an die mit His-Elongin BC beladene Agarose. Der überwiegende Teil von pVHL blieb im löslichen VCB-Komplex gebunden. Bei 4 °C konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Tumor-assoziierten Mutanten detektiert werden. Die VCB-Komplexe waren stabil und pVHL bindet nicht an die mit His-Elongin BC beladene Agarose.



**Abbildung 27: *In vitro* Bindungsstudien mit gereinigten Komponenten**

**A)** 50 µg gereinigter His-Elongin BC-Komplex wurden an Ni-NTA-Agarose gebunden und anschließend mit 10 µg gereinigten VCB-Komplex bei 4°C inkubiert (Input; I). Nach zwei Stunden wurde der Überstand abgenommen (Überstand; Ü), die Agarose (*Beads*; B) gewaschen und später die Proben mit SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) und Western Blot (αVHL) analysiert.

**B)** 50 µg gereinigter His-Elongin BC-Komplex wurden an Ni-NTA-Agarose gebunden und anschließend mit 10 µg gereinigten VCB-Komplex bei Raumtemperatur inkubiert (Input; I). Nach zwei Stunden wurde der Überstand abgenommen (Überstand, Ü), die Agarose (*Beads*; B) gewaschen und später die Proben mit SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) und Western Blot (αVHL) analysiert.

**C)** 50 µg GST-VCB-Komplex wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und anschließend mit 10 µg His-Elongin BC bei Raumtemperatur inkubiert (Input; I). Nach zwei Stunden wurde der Überstand abgenommen (Überstand; Ü), die Sepharose (*Beads*; B) gewaschen und die Proben später mit SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) analysiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich eine Probe des rekombinanten His-BC-Komplexes aufgetragen.

Dieses Konkurrenzexperiment wurde anschließend bei Raumtemperatur durchgeführt (Abbildung 27B). Die P81S-Mutante verhielt sich wie der Wildtyp-VCB-Komplex. Es wurde nur sehr wenig pVHL an der Matrix detektiert und es konnte kein Unterschied zu dem 4 °C-Experiment

nachgewiesen werden. Dagegen zeigte das Experiment bei Raumtemperatur Unterschiede zu dem 4 °C-Experiment. Sowohl bei der L188V-Mutante und auch der Doppelmutante wurde mehr pVHL an der Matrix detektiert als im Überstand (Abbildung 27B). Bei diesen pVHL-Mutanten fand also ein Austausch zwischen den Untereinheiten des rekombinanten VCB-Komplexes und des Komplexes aus His-Elongin B und C statt. Dieser Effekt war im Falle der Doppelmutante stärker als bei der Einzelmutante L188V, wie durch den Immunblot gegen pVHL deutlich wurde.

Da His-Elongin B und pVHL das gleiche Molekulargewicht besitzen, sind sie im SDS-Gel nicht unterscheidbar (nur durch Immunblots möglich). Deshalb wurden die *in vitro* Bindungsstudien auch mit rekombinatem GST-VCB-Komplex und dem His-BC-Komplex durchgeführt. Für diese Experimente wurde der rekombinante GST-VCB-Komplex an Glutathion-Sepharose gebunden und mit dem His-BC-Komplex bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wieder der Input, der Überstand und die Beads (Sepharose) im Gel analysiert.

Aufgrund des unterschiedlichen Migrationsverhaltens war es in diesem Experiment möglich, His-Elongin B (19 kDa) und GST-fusioniertes pVHL (46 kDa) zu unterscheiden. Für die Aussage dieses Experimentes ist das Verhältnis zwischen Elongin B aus dem GST-VCB-Komplex und His-Elongin B aus dem His-BC-Komplex entscheidend. Kann His-Elongin B an den GST-VCB-Komplex binden, fand ein Austausch der Elongine an GST-pVHL statt. Demnach würde der VCB-Komplex einer beschleunigten Dissoziation von pVHL unterliegen.

Die Abbildung 27C zeigt das SDS-Gel des GST- *in vitro* Bindungsexperimentes. Die Kontrolle mit GST zeigte wie erwartet, dass kein His-Elongin B an die Glutathion-Sepharose gebunden wurde. Beim Wildtyp wurde nur sehr wenig His-Elongin B an der Sepharose detektiert. Bei der L188V-Mutante bzw. der Doppelmutante P81S/L188V ist das Verhältnis zwischen His-Elongin B und Elongin B aus dem VCB-Komplex verändert. His-Elongin B konnte demnach an GST-pVHL binden. Im Falle der

Doppelmutante war diese His-Elongin B-Bande stärker als die Bande der L188V-Mutante.

Aus den *in vitro* Bindungsstudien lässt sich schließen, dass die VCB-Komplexe im Falle der L188V-Mutante bzw. der P81S/L188V-Doppelmutante einen Defekt in der Komplex-Deassemblierung aufweisen. Es kommt zu einem schnelleren Austausch der Untereinheiten des VCB-Komplexes.

Die P81S-Mutante verhält sich dagegen ähnlich wie der Wildtyp, zeigt aber in dem Experiment bei Raumtemperatur auch ein höheres Signal an der Sepharose.

### **3.2.5. Zusammenfassung der Typ 2C-Mutanten**

Durch die biochemischen Untersuchungen der P81S-Mutante konnte gezeigt werden, dass die Mutante sich weitgehend wie der Wildtyp verhält. Diese Mutante ist relativ stabil, bindet das Substrat mit einer hohen Affinität und kann durch die Zugabe des Modellsubstrates gegenüber Proteasen stabilisiert werden. Auch die Assemblierung des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes zeigte keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp, nur eine etwas erhöhte Aggregationstendenz bei 37 °C.

Dagegen zeigten die L188V-Mutante und die P81S/L188V-Doppelmutante Defekte in der Assemblierung des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes. Zusätzlich zeigte die Doppelmutante auch einen Defekt in der Assemblierung des VCB-Komplexes (Abbildung 22). Es wurde nachgewiesen, dass die L188V-Mutante und die P81S/L188V-Doppelmutante eine deutlich geringere Stabilität als der Wildtyp und die P81S-Mutante besitzen. Auch nach der Zugabe des Modellsubstrates wurden diese Mutanten weiterhin von Trypsin degradiert, obwohl sie bei 20 °C das Peptid mit der gleichen Affinität wie die P81S-Mutante binden konnten. Die Unterschiede zwischen der Einzel- und der Doppelmutante waren nur gering. Durch Stabilitätsstudien wurde aber gezeigt, dass die Doppelmutante instabiler ist. Sowohl die Harnstoffdenaturierungen, als auch die analytischen Gelfiltrationsläufe deuteten auf eine geringere Stabilität bzw. höhere Aggregationstendenz der

Doppelmutante hin. Weiterhin wurde durch *in vitro* Bindungsexperimente mit den rekombinanten Proteinen eine schnellere Dissoziation der pVHL-Untereinheit vom VCB-Komplex detektiert. Dieser Effekt war im Falle der Doppelmutante stärker.

## 4. Diskussion

Das von Hippel-Lindau-Protein (pVHL) ist ein Tumorsuppressor, und Mutationen im *VHL*-Gen führen zum von Hippel-Lindau-Tumorsyndrom. Aufgrund der unterschiedlichen klinischen Manifestationen wurde diese Erbkrankheit in verschiedene Subklassen unterteilt. Allerdings ist die molekulare Grundlage der einzelnen Phänotypen nicht genau verstanden. In bisherigen Studien wurden pVHL-Mutationen nicht quantitativ biochemisch charakterisiert, um Unterschiede der einzelnen Subtypen herauszufinden und zu erklären, warum es zu diesen spezifischen klinischen Manifestationen kommt. Auch der Wildtyp-VCB-Komplex wurde bislang nicht *in vitro* charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden neben Wildtyp-pVHL bekannte Tumor-assoziierte Mutanten der Krankheitstypen 2A und 2B auf deren Stabilität, Substrataffinität und Ubiquitylierungs-Aktivität hin untersucht. Zusätzlich wurden mit den entwickelten experimentellen Ansätzen auch Mutanten vom Typ 2C charakterisiert. Die Ergebnisse zeigten zum ersten Mal klare Unterschiede zwischen den Typen 2A und 2B auf. Für die Typ 2C-Mutanten konnten ebenfalls bisher nicht beschriebene Defekte gefunden werden.

### 4.1. Biophysikalische Charakterisierung des Wildtyp-VCB-Komplexes

Die Stabilität des rekombinanten Wildtyp-VCB-Komplexes wurde mittels Harnstofftitration und partieller Proteolyse untersucht. Die chemisch-induzierten Entfaltungsübergänge wiesen eine unerwartet geringe thermodynamische Stabilität des Komplexes auf. Eine Harnstoffkonzentration von 1.9 M führt bei 10 °C bereits zur Entfaltung von 50% des VCB-Komplexes. Auch für andere Tumorsuppressoren, wie z.B. p53 und p16, wurde eine geringe thermodynamische Stabilität nachgewiesen (Bullock *et al.*, 1997, Boice und Fairman, 1996). So wurde für die DNA-Bindedomäne von p53

bei 10 °C ein  $D_{50\%}$ -Wert von 3.25 M und einen  $\Delta G$ -Wert von 10 kcal/mol ermittelt (Bullock *et al.*, 2000). Der  $\Delta G$ -Wert ist die freie Energie, die aufgebracht werden muss, um ein Protein zu entfalten. Der Wildtyp-VCB-Komplex besitzt bei 10 °C nur einen  $\Delta G$ -Wert von 3 kcal/mol.

Die Experimente zur Stabilität der DNA-Bindedomäne von p53, p16 (INK4A) und der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit dem VCB-Komplex weisen darauf hin, dass Tumorsuppressoren generell eine geringe intrinsische Stabilität aufweisen und ihre Aktivität dadurch reguliert werden könnte. Im Falle des VCB-Komplexes ist es sehr wahrscheinlich, dass der Komplex *in vivo* durch Cullin 2 stabilisiert wird bzw. durch Substratbindung vor Entfaltung geschützt werden kann. Durch die partielle Proteolyse des Wildtyp-VCB-Komplexes mit den HIF-Peptiden konnte darüber hinaus tatsächlich gezeigt werden, dass der Komplex durch Substratbindung stabilisiert wird. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass die Schnittstelle der Protease durch das Peptid maskiert ist.

Sutovsky *et al.* führten Harnstofftitrationen mit gereinigtem pVHL in Abwesenheit der Elongine B und C durch. Es ist schon durch die Kristallstruktur klar, dass pVHL, wenn es nicht an die Elongine gebunden ist, nicht in seiner nativen Konformation vorliegt. Die Denaturierung des gereinigten pVHLs war nicht reversibel, und so konnten keine thermodynamischen Parameter ermittelt werden. Das VHL-Protein bildet ein „molten globule“ und besitzt nur geringe Stabilität, wenn es nicht an die Elongine gebunden ist (Sutovsky und Gazit, 2004).

Für die Ermittlung der Bindungsaffinitäten zwischen dem VCB-Komplex und einem Modellsubstrat wurden Gleichgewichtstitrationen und Assoziations- bzw. Dissoziationskinetiken genutzt. Der VCB-Wildtyp-Komplex bindet das Hyp-Peptid (558-567) mit einer Affinität im unteren nanomolaren Bereich (6 nM). Die hohe Affinität des VCB-Komplexes für dieses Modellsubstrat beruht auf der schnellen Assoziation und der sehr langsamen Dissoziation.

Aus der Kristallstruktur des VCB-Komplexes mit dem Hyp-Peptid (556-575) wurde klar, dass es zwei Bindungsstellen für pVHL gibt (Hon *et al.*, 2002, Min *et al.*, 2002). Die N-terminale Bindungsstelle im Hyp-Peptid beinhaltet die

Aminosäuren 561-566, die C-terminale Bindungsstelle die Reste 571-574. Dazwischen liegt eine Region (Reste 567-570), die nicht mit pVHL interagiert (außer D569). Für die Reste 559-560 wurde keine Struktur erhalten. Die Hauptkontakte neben dem Hyp564 liegen in der N-terminalen Region des Modellsubstrates.

Bisher durchgeführte Bindungsstudien mit dem rekombinanten VCB-Wildtyp-Komplex und HIF-Peptiden beschränken sich auf Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) und Oberflächen-Plasmon-Resonanz (BIAcore) (Hon *et al.*, 2002, Min *et al.*, 2002). Durch Kalorimetrie-Experimente mit dem VCB-Komplex und einem Hyp-Peptid (560-568) wurde eine Gleichgewichtskonstante ( $K_d$ ) von 610 nM ermittelt. Die BIAcore-Experimente führten zu einem  $K_d$ -Wert von 64 nM, gemessen mit einem biotinyliertem Hyp-Peptid (558-569). Experimente, bei denen Peptide mit beiden Bindungsstellen benutzt wurden (556-574), ergaben  $K_d$ -Werte von 210 nM bzw. 33 nM (BIAcore-Experimente). Auffällig war, dass die Dissoziationsraten ( $k_{off}$ ) sich nur geringfügig zwischen den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen und den BIAcore-Daten unterschieden (0.04 und 0.02 s<sup>-1</sup>). Die Assoziationsraten allerdings sind um Faktor 10 unterschiedlich. Da bei den BIAcore-Experimenten das Peptid an eine Matrix gebunden vorlag, könnte die freie Assoziation beeinträchtigt sein. Die gemessenen Assoziationsraten könnten aber auch auf die unterschiedlichen Peptide bzw. das Biotin zurückzuführen sein. Die BIAcore-Ergebnisse sind mit den in dieser Arbeit erhaltenen Gleichgewichtskonstanten aber vergleichbar, dagegen weisen die Resultate der ITC-Daten sehr geringe Affinitäten auf. Da für die Kalorimetrie-Experimente ein Peptid benutzt wurde, das aus den Resten 560-568 besteht, fehlen wahrscheinlich wichtige Reste für die Bindung an den VCB-Komplex. Der Leucinrest 559 und der Glutamatrest 560 von HIF1 $\alpha$  fehlen in der Kristallstruktur und so ist nicht klar, ob diese Aminosäurereste direkte Kontakte mit pVHL ausbilden. Aufgrund der erhaltenen Bindungsdaten ist dies sehr wahrscheinlich.



## **4.2. Das höhere Risiko für Nierenzellkarzinome im VHL-Krankheitstyp 2B korreliert mit Defekten in der pVHL-Stabilität und in HIF1 $\alpha$ -Interaktionen**

In dieser Arbeit wurden pVHL-Mutanten charakterisiert, die aufgrund ihrer klinischen Manifestationen dem von Hippel-Lindau-Tumorsyndrom Typ 2A bzw. Typ 2B zugeordnet wurden. Die Typ 2A-Mutanten Y98H bzw. Y112H und die korrespondierenden Asparagin-Mutanten (Y98N, Y112N) derselben Reste wurden näher untersucht.

Sowohl die VCB-Komplexe als auch die E3-Ubiquitin-Ligasen (CBC<sup>VHL</sup>) wiesen keine Assemblierungsdefekte auf, wie sie für andere Punktmutationen (C162F, L188Q, S65W) bereits beschrieben wurden (Clifford *et al.*, 2001). Wie die Kristallstruktur zeigt (Abbildung 10), liegen die Reste Y98 und Y112 nahe der Substratbindestelle bzw. sind direkt an der Bindung beteiligt (Y98). Demnach waren Defekte an der Substratinteraktion zu erwarten. Untersuchungen des Fluoreszenz-markierten Hyp-Peptides an Tumor-assoziierte VCB-Komplexe ermöglichten die Bestimmung von Bindungskonstanten. Es wurden deutliche Unterschiede der Mutanten zum einen zum Wildtyp-Komplex, aber auch zwischen den pVHL-Mutanten gefunden. Die Mutanten wiesen geringere Affinitäten als der Wildtyp-Komplex auf (0.3-2  $\mu$ M). Interessanterweise sind die Assoziationsraten dem Wildtyp sehr ähnlich (0.5-2-fach), wogegen die Dissoziationsraten der Mutanten deutlich höher sind als die des Wildtyps (80-225-fach). Demnach unterscheiden sich die Tumor-assoziierten Mutanten vor allem in der schnelleren Dissoziation des Substrates vom Wildtyp. Der Vergleich der Typ 2A- und Typ 2B-Mutanten zeigte, dass die 2B-Mutanten deutlich höhere Dissoziationsraten aufwiesen als die Typ 2A-Mutanten. Demzufolge wiesen die Mutanten des Typs 2B auch geringere Gleichgewichtskonstanten auf, d.h. diese Mutanten können das Peptid schlechter binden. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutationen der Aminosäurereste Y98 und Y112 zu Histidin geringere Defekte besitzen als die korrespondierenden Asparagin-Mutanten.

Durch *in vitro* Ubiquitylierungs-Experimente mit den immunpräzipitierten CBC<sup>VHL</sup>-Komplexen konnten gezeigt werden, dass die Ubiquitylierungs-Aktivität bei den Typ 2A-Mutanten höher ist als bei den Typ 2B-Mutanten. Bisher wurde zwar ein Defekt in der Substratbindung der Typ 2A- bzw. Typ 2B-Mutanten angenommen, aber signifikante Unterschiede zwischen Mutanten konnten nicht aufgezeigt werden.

Die Y98- und Y112-Mutanten wurden bisher *in vitro* mit Experimenten untersucht, die nicht im Gleichgewicht (Immunpräzipitationen, Pulldowns) waren. Aufgrund der schnelleren Dissoziationsraten der Mutanten konnten deshalb wahrscheinlich bisher keine Interaktionen mit HIF1 $\alpha$  nachgewiesen werden. Studien mit Zellextrakten aus *VHL*-negativen Zellen und *in vitro* translatiertem pVHL (Typ 2A-Mutanten) und HIF1 $\alpha$  zeigten keine Bindung an HIF (Clifford *et al.*, 2001). Die Daten für die *in vitro* Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$  sind in der Literatur sehr widersprüchlich. Hoffman *et al.* wiesen eine Ubiquitylierung von HIF1 $\alpha$  durch die Y98H-Mutante nach (Hoffman *et al.*, 2001). Dagegen detektierten Ohh *et al.* nach der Transfektion der Y98H-Mutante in *VHL*-negative Zelllinien im Gegensatz zum Wildtyp keine Regulation von HIF1/2 $\alpha$  (Ohh *et al.*, 2000). Clifford *et al.* wiesen eine partielle Regulation von HIF1/2 $\alpha$  durch die Y98H- und Y112H-Mutante nach (Clifford *et al.*, 2001). Überraschenderweise zeigten Cockman *et al.* für die Y98N-Mutante eine stärkere *in vivo* Regulation von HIF1/2 $\alpha$  als für die Y112H-Mutante (Cockman *et al.*, 2000). Die meisten dieser Analysen wurden mit stabil transfizierten Zelllinien durchgeführt. Aufgrund der Überexpression von pVHL in diesen Zelllinien könnten bestimmte Defekte maskiert werden, wie z.B. die Stabilität oder die Aktivität der Komplexe.

Die dargestellten Bindungsstudien und die Experimente zur Ubiquitylierungs-Aktivität weisen darauf hin, dass die Typ 2A-Mutanten HIF *in vivo* partiell regulieren können, im Gegensatz zu den Typ 2B-Mutanten, deren Restaktivität wahrscheinlich nicht ausreichend ist. Demnach korreliert das Risiko Nierenzellkarzinome auszubilden (Typ 2B) sowohl mit der Ubiquitylierungs-Aktivität als auch mit der Stabilität von pVHL.

Die biochemische Charakterisierung ermöglicht zudem einen interessanten pharmazeutischen Ansatz. Verbindungen, welche pVHL-Mutanten stabilisieren könnten und so auch die Stabilität von HIF beeinflussen, wären medizinisch relevant. Mit solchen Substanzen könnte das Risiko für Patienten gesenkt werden, Tumore auszubilden. Besonders für die sehr häufig auftretende Y98H- Mutante (Typ 2A) wäre dies ein guter Ansatz, um neuere Therapienansätze zu etablieren.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere bisher kaum charakterisierte Funktionen von pVHL, wie z.B. die Stabilisierung von Mikrotubuli oder die Fibronektininteraktion, für die Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen eine Rolle spielen (Hergovich *et al.*, 2003, Ohh *et al.*, 1998). Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass auch weitere bisher unbekannte Substrate von pVHL an die  $\beta$ -Domäne binden, und demnach ähnliche Defekte wie für die Bindung und Ubiquitylierung von HIF1/2 $\alpha$  bestehen.

### **4.3. Typ 2C-Mutanten besitzen Assemblierungsdefekte**

Zum weiteren Verständnis der Phänotypen wurden auch Mutanten des Typs 2C der VHL-Krankheit näher untersucht. Die L188V-Mutante wurde bereits *in vitro* und *in vivo* untersucht. Im Nacktmausmodell wurde das Wachstum von Tumoren durch diese Mutante unterdrückt (Hoffman *et al.*, 2001). Bisher ist für Typ 2C-Mutanten (F119S, V84L, L188V) eine Bindung und auch Regulation von HIF1 $\alpha$  beschrieben worden (Hoffman *et al.*, 2001, Clifford *et al.*, 2001). Durch ein neueres Screening-Verfahren wurde eine kosegregierende Mutation neben der L188V-Mutation beschrieben, die P81S-Mutation (Weirich *et al.*, 2002). Möglicherweise sind aus diesem Grund bisherige Ergebnisse der Typ 2C-Mutanten irreführend. Die P81S-Mutante allein wurde aufgrund von auftretenden Nierenzellkarzinomen dem VHL-Krankheitstyp 1 zugeordnet (Brauch *et al.*, 1999). Diese Mutation ist mit einer geringen Penetranz bzw. einem milden Phänotyp beschrieben (Hes *et al.*, 2000). Um die Defekte der Doppelmutation P81S/L188V und der

Einzelmutanten (P81S und L188V) näher zu untersuchen, wurden diese biochemisch charakterisiert.

Wie aus der Kristallstruktur hervorgeht, liegen die Aminosäurereste P81 und L188 in der Nähe der Elongin C-Bindungsstelle bzw. sind indirekt an der Bindung von Elongin C beteiligt (siehe Abbildung 11). Zusätzlich befindet sich der Leucinrest 188 in der Cul2-Box. Dieses Motiv spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der direkten Interaktion zwischen pVHL und Cullin 2 (Kamura *et al.*, 2004).

Durch Assemblierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die L188V-Mutante, aber vor allem die Doppelmutante P81S/L188V einen Defekt in der Bildung des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes besitzen. Dagegen verhielt sich die P81S-Mutante in den Experimenten zur Assemblierung wie der Wildtyp. Zusätzlich konnte durch *in vitro* Bindungsstudien bei Raumtemperatur mit gereinigten Komponenten eine schnellere Dissoziation der pVHL-Untereinheit vom VCB-Komplex für die L188V-Mutante, besonders aber für die Doppelmutante aufgezeigt werden. Auch die Experimente zur Stabilität zeigten für die Doppelmutante einen stärkeren Defekt. Sowohl bei den Harnstoffdenaturierungen, als auch bei der partiellen Proteolyse wies die P81S/L188V-Mutante die geringste Stabilität auf. Bei den analytischen Gelfiltrationsexperimenten wurde die Tendenz zur Aggregation der Doppelmutante deutlich. Aufgrund dieser Effekte bilden die L188V-Mutante und auch die Doppelmutante P81S/L188V bei 37 °C wahrscheinlich keine stabilen E3-Ligase-Komplexe, wie auch aus den Koimmunpräzipitationen hervorgeht. Die in dieser Arbeit gefundenen Defekte in der Assemblierung der Komplexe konnten zum ersten Mal nachgewiesen werden. Bisherige Studien wurden allerdings nur bei 4 °C und nicht bei 37 °C durchgeführt (Hoffman *et al.*, 2001, Clifford *et al.*, 2001). Auch bei den hier gezeigten Experimenten mittels Gelfiltration bzw. *in vitro* Bindungsstudien wurde bei 4 °C kein Unterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp detektiert. Die P81S-Mutante zeigte bei 37 °C eine geringe Aggregationstendenz, aber keine Assemblierungsdefekte. Dies könnte eine Erklärung für den milden Phänotypen der P81S-Mutante sein.

In Substratbindungsstudien wurden nur geringe Unterschiede der Typ 2C-Mutanten zum Wildtyp-Komplex gefunden. Während der Wildtyp-VCB-Komplex einen  $K_d$ -Wert von 6 nM aufwies, wurden auch für die Mutanten Gleichgewichtskonstanten im unteren nanomolaren Bereich ( $K_d$ -Werte 16-22 nM) gefunden. Diese Mutanten zeigten demnach im Gegensatz zu den Typ 2A/B-Mutanten keinen ausgeprägten Defekt in der Substratbindung. Auch die ermittelten Dissoziationsraten unterschieden sich nicht vom Wildtyp-Komplex. Bemerkenswerterweise wurden die L188V-Mutante und die Doppelmutante im Gegensatz zum Wildtyp und der P81S-Mutante bei den Trypsinexperimenten bei 37 °C durch die Zugabe des Hyp-Peptides nicht stabilisiert. Obwohl diese VCB-Komplexe bei 20 °C eine hohe Substrataffinität zum Hyp-Peptid aufwiesen, wurde die pVHL-Untereinheit bei 37 °C auch in Anwesenheit des Hyp-Peptides von Trypsin degradiert. Eine mögliche Erklärung wäre in diesem Zusammenhang nur eine lokale Stabilisierung der  $\beta$ -Domäne nach der Bindung des Substrates, die aber nicht vor der Protease schützt. Möglicherweise könnte das Volllängen-HIF1 $\alpha$  zur Stabilität der VCB-Komplexe beitragen. Bisher gibt es noch keine Experimente bzw. Daten, die auf weitere Bindungsstellen zwischen pVHL und HIF hinweisen. Aufgrund der schnellen Assoziation und der sehr langsamen Dissoziation des Substrates könnte allerdings der VCB-Komplex bzw. der CBC<sup>VHL</sup>-Komplex stabilisiert werden und so eine Regulation von HIF1 $\alpha$  möglich sein, wie es bisher für die Typ 2C-Mutanten beschrieben wurde. Diese Untersuchungen basieren allerdings entweder auf *in vitro* translatiertem pVHL bzw. HIF, oder auf immunpräzipitierten Komplexen (Hoffman *et al.*, 2001, Clifford *et al.*, 2001). Es gab bisher keine Studien bei 37 °C und auch keine Untersuchungen mit gereinigten Komponenten. Demnach waren die bisherigen Studien nicht ausreichend, um die in dieser Arbeit aufgezeigten Defekte nachzuweisen.

Die beschriebene HIF1 $\alpha$ -Regulation *in vivo* könnte auch auf einem alternativen Weg stattfinden, durch die Regulation über p53. P53 kann HIF1 $\alpha$  auch direkt regulieren, indem es dessen Degradation über MDM2 einleitet (Ravi *et al.*, 2000). Interessanterweise beschrieben Roe *et al.* eine direkte Interaktion zwischen pVHL und p53 (Roe *et al.*, 2006) in

Überexpressionsstudien. Demnach soll pVHL die Ubiquitylierung von p53 verhindern und so die Stabilität bzw. Aktivität von p53 beeinflussen. Die Bindungsstellen für p53 liegen in der  $\alpha$ -Domäne von pVHL. Roe *et al.* konnten eine Kompetition von p53 und Elongin C um die Bindung an pVHL zeigen. Wäre also der VCB-Komplex wie im Falle der Typ 2C-Mutanten etwas instabiler, könnte p53 an pVHL binden und HIF1 $\alpha$  regulieren. So würden die Typ 2C-Mutanten eine intakte HIF-Regulation besitzen. Dagegen würden der Wildtyp und auch die Typ 2A- und 2B-Mutanten, welche keine Defekte in der Assemblierung des VCB-Komplexes aufweisen, nur zu einem sehr geringen Teil an p53 binden.

Zusätzliche Experimente wären nötig, um diese Hypothese zu beweisen. Ein möglicher experimenteller Ansatz wäre die Etablierung von stabilen Zelllinien der Typ 2C-Mutanten. Für die L188V-Mutante gibt es bereits eine Zelllinie allerdings mit stark erhöhten Expressionsmengen. Durch die L188V-Mutante konnte im Nacktmausmodell gezeigt werden, dass diese Mutante die durch VHL<sup>-/-</sup>-Zelllinien induzierte Tumorbildung unterdrücken kann. Durch stabile Zelllinien mit der Doppelmutante P81S/L188V und der P81S-Mutante wäre es möglich, die zellulären Mengen von HIF, p53 und HIF-abhängigen Zielgenen zu vergleichen. Zusätzlich könnte im Nacktmausmodell überprüft werden, ob die Tumorbildung durch diese Mutanten verhindert wird. Zusätzlich zu den hier beschriebenen Typ 2C-Mutanten wäre es interessant, weitere Tumor-assoziierte Mutanten (V84L, R64P) des Typs 2C zu charakterisieren und die gefundenen Ergebnisse mit den hier erhaltenen Resultaten zu vergleichen. Weiterhin könnten Ubiquitylierungs-Experimente mit gereinigten Komponenten des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes (aus Sf9-Zellen) und *in vitro* translatiertem oder gereinigtem HIF1 $\alpha$  ebenfalls Aufschluss über eine mögliche HIF1 $\alpha$ -Bindung bzw. -Regulation geben.

Auch bei den Typ 2C-Mutanten könnten weitere Interaktionspartner von pVHL eine Rolle für den Phänotyp spielen. Ebenfalls wäre es möglich, dass zusätzliche Mutationen in anderen Genen vorliegen, die dann im Zusammenspiel mit pVHL zu Phäochromozytomen führen. Phäochromozytome sind neuroendokrine Tumoren und durch eine

Überfunktion des Nebennierenmarks charakterisiert. Wenn die Mengen an NGF (nerve growth factor) während der Entwicklung der Nebennieren limitierend werden, kommt es zur neuronalen Apoptose. Mutationen in *VHL* und dem Gen für Succinatdehydrogenase (*SDH*) führen zur Inhibierung dieser neuronalen Apoptose (Lee *et al.*, 2005). Somit können Mutationen in diesen Genen neuronale Vorläuferzellen vor der Apoptose schützen und es entstehen aus diesem Grund Phäochromozytome. Allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass HIF1 $\alpha$  aufgrund seiner zahlreichen Funktionen ebenfalls eine Rolle in diesem Prozess spielt (Maxwell, 2005).

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse für die unterschiedliche Substratbindung und Ubiquitylierungs-Aktivität der Typ 2A/B-Mutanten bzw. die Assemblierungsdefekte der Typ 2C-Mutanten des VHL-Tumorsyndroms zeigen, wie wichtig die quantitativen biochemischen Untersuchungen von Tumor-assoziierten Mutanten sind, um die molekulare Grundlage von Krankheiten, insbesondere der von Hippel-Lindau Erbkrankheit besser zu verstehen und mögliche Therapien entwickeln zu können.

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Computeranalysen

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche, Sequenzvergleiche, 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 Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Die Erstellung von Texten und Tabellen erfolgte mit Hilfe des Microsoft Office Pakets (Microsoft Corp.). Abbildungen wurden mittels Adobe Illustrator (Adobe Systems Inc.) erstellt. Für Graphiken und Kurvenanpassungen wurde das Programm KaleidaGraph verwendet.

### 5.2. Mikrobiologische Methoden

#### 5.2.1. *E. coli* Stämme

XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)</i> ]
BL21(DE3)	F' <i>ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm+ Tet<sup>r</sup> galλ (DE3)</i> EndA Hte [ <i>argU ileY leuW</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 50 µg/ml (Ampicillin), 30 µg/ml (Kanamycin) bzw. 34 µg/ml (Chloramphenicol) zugefügt. Die Dichte von *E. coli* Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt.

### **5.2.3. Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Für die Transformation von Ligationsansätzen wurden elektrokompetente XL1-Blue verwendet. Hierfür wurde mit einer Einzelkolonie aus einem frischen Ausstrich eine Übernachtskultur in 5 ml Flüssigmedium angeimpft und hieraus am nächsten Tag eine Verdünnung auf OD<sub>600</sub>=0.05 in 1 l LB-Flüssigmedium hergestellt. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.7 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 30-60 min wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 5000g, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 500 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und der letzte Schritt zunächst mit 250 ml, dann mit 10 ml 10%igem Glycerin wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in 3 ml 10% Glycerin resuspendiert, in 50µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **5.2.4. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien**

Für die Transformation von Plasmiden bzw. für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurden chemisch kompetente XL1-blue oder BL21(DE3) Zellen verwendet. Die Inokulation und die Kultivierung der Zellen erfolgten wie unter 5.2.3 beschrieben. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 wurden die Zellen durch

Zentrifugation pelletiert und in 500 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 250 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen sedimentiert, in 10 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>/15% Glycerin resuspendiert, in 100µl 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. 10 ng Plasmid-DNA bzw. 2-4 µl eines gegen Wasser dialysierten Ligationsansatzes mit 50 µl der elektrokompetenten Zellen gemischt. Diese Suspension wurde in einer Elektroporationsküvette (0.1 cm Spaltbreite) mit einem Puls von 1.8 kV und 25 µF bei einem Widerstand von 200 Ω elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen sofort in 600 µl LB-Medium aufgenommen, in ein Greiner Plastikröhrchen (10 ml) transferiert und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Für die Transformation von chemisch kompetenten Zellen wurden ca. 10-500 ng Plasmid DNA mit 50 µl der kompetenten Zellen gemischt und die Suspension im Eppendorfgefäß 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42 °C und einer anschließenden Inkubation von 2 min auf Eis wurden 600 µL LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Transformierte Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## **5.3. Zellbiologische Methoden**

### **5.3.1. Zelllinie**

HEK293T	humane embryonale Nierenzellen, mit SV40 large-T Antigen transformiertes Derivat der 293 Zelllinie, auch 293T genannt
---------	---

### 5.3.2. Kultivierung von Säugerzellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturschalen (Falcon) bei 37 °C, 7.5% CO<sub>2</sub> und 96% Luftfeuchtigkeit in Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO-BRL) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom), 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin supplementiert. Beim Erreichen von ca. 80-100% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit sterilem PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7,4]) gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Trypsin/EDTA Lösung (GIBCO-BRL) pro Schale (Ø=15cm) zugegeben und bis zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1:1 mit Medium verdünnt und abzentrifugiert (4 min, 1400g, 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 1 ml 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  $1 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Schale ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Für einen Transfektionsansatz wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß 12  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit Wasser auf 450  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 50  $\mu\text{l}$  einer 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt. Dann wurden 500  $\mu\text{l}$  2xHBS-Puffer (16.01 g/l NaCl, 0.74 g/l KCl, 9.53 g/l HEPES und 0.25 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [pH7,05]) tropfenweise am Rand des Gefäßes zugegeben, kurz durch Schütteln gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen mit Chloroquine (40  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) supplementiert. Die Transfektionslösung wurde nach kurzem Mischen tropfenweise zum Medium der vorbereiteten Zellen gegeben (1 ml Lösung pro 10 cm Schale) und diese dann für 5 h im Brutschrank inkubiert. Nach Wechsel des Mediums wurden die Zellen zur Expression der transfizierten cDNAs für weitere 48 h inkubiert.

## **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 5 ml Übernachtkultur und größere Mengen (Maxiprep) aus 500-ml-Kulturen isoliert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei  $\lambda=260$  nm bestimmt. Für doppelsträngige DNA entspricht  $\text{OD}_{260}=1$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

### **5.4.2. Restriktionsverdau von DNA**

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 5-10 U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Die Restriktionsansätze wurden etwa 2 h für analytische und mindestens 3 h für präparative Zwecke bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert.

### **5.4.3. 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 (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.5 mM 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 100 V 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).

### **5.4.4. 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 (10 mM Tris-HCl [pH8.5]) eluiert.

#### **5.4.5. Dephosphorylierung von DNA**

Um die Rezirkularisierung des Vektors in Ligationsansätzen zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Dies erfolgte nach der Gelextraktion durch die Zugabe der Shrimp-Alkaline-Phosphatase (NEB) zum Vektor. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

#### **5.4.6. Ligation von DNA**

Für die Ligation von DNA wurden Vektor und Insert etwa im molaren Verhältnis 1:5 eingesetzt. Die DNA-Mengen wurden aus der Stärke der Bande im Agarosegel abgeschätzt. Es wurde ca. 250 ng Vektor in einem 20  $\mu$ l Ligationsansatz eingesetzt. Der Ansatz wurde zusammen mit 1  $\mu$ l T4 Ligase (NEB) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Vor der Transformation wurde der Ligationsansatz 20 min gegen steriles Wasser auf einem Nitrozellulosefilter (Porengröße 0.05  $\mu$ 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  $\mu$ g Plasmid-DNA und 10 pmol Primer.

### 5.4.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikationen wurden in einem Personal Cycler der Firma Biometra durchgeführt. Standard-PCRs wurden in 50  $\mu$ l Ansätzen mit 5  $\mu$ l 10x Pfu-Puffer, 1  $\mu$ l Oligonukleotidmix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1  $\mu$ l Pfu (Stratagene), 200 ng Plasmid-DNA und 5  $\mu$ M der entsprechenden Oligonukleotide (Primer) durchgeführt. Es wurde folgendes Programm verwendet ( $x \approx$  Schmelztemperatur der Primer  $-10$  °C):

Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
20-40 Amplifikationszyklen	30-45 sec	95 °C
	30-45 sec	$x$ °C
	2 min/kb	72 °C
Endverlängerung	10 min	72 °C
Abkühlung	$\infty$ 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 50 ng Matrizen Plasmid-DNA und je 125 ng der entsprechenden Oligonukleotide mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	1 min	95 °C
18 Amplifikationszyklen:	50 sec	95 °C
	50 sec	58 °C
	2 min/1 kb	68 °C
Endverlängerung:	7 min	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 1 h bei 37 °C beseitigt. Ein Aliquot dieses Ansatzes konnte anschließend direkt in *E. coli* transformiert werden. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierungen überprüft.

## 5.5. Proteinbiochemische Methoden

### 5.5.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

#### *Bradford*

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

#### *UV/VIS Spektroskopie*

Zusätzlich wurden die Konzentrationen der Proteine bzw. Peptide spektroskopisch über die Aufnahme von Spektren im Bereich von 250-350 nm bestimmt. Der jeweilige Extinktionskoeffizient bei 280 nm wurde unter [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch) berechnet.

#### *Quantitative Aminosäureanalyse*

Die Konzentration von Peptiden und Proteinen wurden zusätzlich mit der Aminosäureanalyse bestimmt. Nach der Totalhydrolyse der Proben in HCl



wurden die Proben chromatographisch aufgetrennt und die Anzahl der einzelnen Aminosäuren erhalten. Die Konzentration wurde anschließend über die Stoffmenge und das Volumen berechnet.

### **5.5.2. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

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-Glycin Gele (Sambrook, 1989) richtete sich nach dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine.

Proteinproben wurden in Probenpuffer (2x SDS-Probenpuffer: 125 mM Tris [pH6.8], 20% Glycerin, 2% SDS, 100 mM DTT und 0.01% Bromphenolblau) aufgenommen, durch Erhitzen (5 min bei 95 °C) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 15-30 mA aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris, 196 mM Glycin und 0.1% SDS verwendet.

Für die Auftrennung von Proteinen mit stark unterschiedlichen Molekulargewichten wurden Gradientengele (4-20%) verwendet.

Als Molekulargewichtstandard diente Precision Plus Protein Standard (BioRad).

Die Proteine wurden entweder durch Silberfärbung oder Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Heukeshoven, 1985).

### **5.5.3. Native Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen über native Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgte ebenfalls unter Verwendung des „mighty small“ Gelsystems der Firma Hoefer (Amersham Pharmacia). Es wurden Gradientengele (4-20%) und Laufpuffer (50 mM Tris, 196 mM Glycin) bzw. Probenpuffer ohne SDS verwendet. Als Marker diente rekombinanter VCB-Komplex und rekombinantes TRiC, welches freundlicherweise von M. Schremp (Abteilung

Hartl) bereitgestellt wurde. Die Proteine wurden durch Coomassiefärbung bzw. durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

#### **5.5.4. Western Blot**

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mit Transferpuffer auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran (Millipore) überführt. Der Transfer erfolgte bei RT für mindestens 2h in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.01% SDS und 10% Methanol) bei einer konstanten Spannung von 8 V. Anschließend wurde die Membran mit einer Blocklösung (5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer [25 mM Tris [pH7.5], 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 0.1% Tween20]) für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Membran wurde anschließend mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit TBST gewaschen und anschließend für 30 min bei RT mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in TBST inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x) in TBST wurden gebundene Antikörper mittels Chemilumineszenz (ECL Western Blot Detection Kit, Amersham) nach Herstellerangaben nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurden folgende monoklonale Maus Antikörper verwendet: anti-FLAG M2 (Sigma) 1:5000 und anti-Tubulin (Sigma) 1:10000. Weiterhin wurden die polyklonalen Antikörper anti-Rbx (NeoMarkers) 1:1000 und anti-CUL2-NTD (Transduction Laboratories) 1:1000 verwendet.

#### **5.5.5. Koimmunpräzipitation des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes**

Für die Koimmunpräzipitationen wurden 293T Zellen in einer 10 cm Schale bis zu einer Konfluenz von etwa 90% kultiviert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 5 ml PBS durch Abschaben von der Platte geerntet. Die abzentrifugierten Zellen (4 min, 1400g, 4 °C) wurden in 500 µl Puffer C (20 mM Hepes/KOH [pH7,5], 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 µl/ml Leupeptin, 2 µg/ml Antipain) resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch das Auf-und Abpipettieren durch

eine Nadel (26 gauge) lysiert. Anschließend wurde die NaCl-Konzentration erhöht (0.2 M) und die Proben wurden zuerst für 30 min bei 20000g und dann für 60 min bei 40000g bei 4 °C zentrifugiert.

Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde durch Bradford (BioRad) photometrisch bestimmt. Es wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein für die Präzipitation eingesetzt und das Volumen durch Zugabe von Lysepuffer angeglichen. Inputproben wurden entnommen und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Die Zelllysate wurden über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert (35  $\mu$ l anti-FLAG M2-Agarose). Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (5 min, 500g, 4 °C) und die Matrix dreimal mit je 500  $\mu$ l 25 mM Tris/HCl [pH7,5], 0.5 M NaCl, 0.1% NP40, 1 mM EDTA gewaschen. Die Proteine wurden durch Aufkochen in 1x SDS-Probenpuffer bei 95 °C eluiert und denaturiert. Es wurden je 5  $\mu$ l Probe durch SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

#### **5.5.6. *In vitro* Translation**

VHL und HIF1 $\alpha$  wurden mittels des T7 TNT-Translations-Transkription-Systems von Promega nach Angaben des Herstellers mit <sup>35</sup>S-Methionin hergestellt. HA-VHL-pcDNA3-Konstrukte wurden bei 37 °C oder 30 °C translatiert. Die Reaktion von HIF1 $\alpha$ -pcDNA3 wurde bei 30 °C in Anwesenheit von 100  $\mu$ M FeCl<sub>2</sub> durchgeführt.

#### **5.5.7. Ubiquitylierungsreaktion**

Die Koimmunpräzipitation des CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes wurde, wie unter 5.5.5. beschrieben, durchgeführt, allerdings wurden die Präzipitate dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Agarose mit 50  $\mu$ l Assay-Puffer (40 mM Tris/HCl [pH7.5], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM DTT, 25  $\mu$ M MG132) versetzt und mit 2  $\mu$ l *in vitro*-translatiertem, <sup>35</sup>S-gelabeltem HIF1 $\alpha$  für 2 h bei 4 °C inkubiert. Für die anschließende Ubiquitylierungsreaktion wurde zu dem Ansatz 7  $\mu$ l Assay-Puffer mit 125 ng E1 (Uba1, Affiniti), 625 ng E2 (GST-Ubc5a, Affiniti), 2.4  $\mu$ g

Ubiquitin (Sigma), 1.2  $\mu\text{g}$  Ubiquitinaldehyd (Biomol) und 3.3 mM ATP pipettiert und die Reaktion durch Transfer auf 37 °C gestartet. Nach 0, 30, 60, 120 min wurden Proben entnommen und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Nach der anschließenden Denaturierung der Proben für 5 min bei 95 °C wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde danach 20 min bei Raumtemperatur fixiert (25% Methanol, 10% Essigsäure und 3% Glycerin) und mit einem Gelrockner für 45 min bei 80 °C auf einem Whatman-Papier getrocknet. Durch anschließende Autoradiographie wurde das Experiment ausgewertet.

Die Quantifizierung aus vier Einzelerperimenten erfolgte mit einem Phosphoimager. Für jeden Zeitpunkt wurde die Ub-HIF1 $\alpha$ -Menge durch den Gesamtgehalt an HIF1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$  + Ub-HIF1 $\alpha$ ) dividiert, um Unterschiede bei der Beladung bzw. der Inputs zu korrigieren. Die ubiquitylierten Fraktionen wurden normalisiert. Die maximale Ubiquitylierung des Wiltyp-CBC<sup>VHL</sup>-Komplexes bei 120 min entspricht 100%.

### 5.5.8. Reinigung der VCB-Komplexe

Der VCB-Komplex wurde nach einem leicht abgewandelten Protokoll nach Stebbins *et al.* aufgereinigt (Stebbins *et al.*, 1999). GST-pVHL, Elongin B (pVB) und Elongin C (17-112, pBB75C) wurden in *E.coli* bei 25 °C koexprimiert. Die Induktion mit 1 mM IPTG und Ampizillin erfolgte bei einer OD<sub>600</sub>=0.7. Nach 6 Stunden wurde erneut IPTG und Ampizillin zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach 18 h geerntet und in Lysepuffer (50 mM Tris/HCl [pH8.0], 200 mM NaCl, 10 mM DTT) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte mit einem Emulsiflex C5 Zellhomogenisator (Avestin). Der Überstand der anschließenden Zentrifugation bei 40000g für 45 min wurde mit Glutathion-Sepharose (Amersham Bioscience, äquilibriert in Lysepuffer) bei 4 °C für 2 h inkubiert. Die Sepharose wurde einmal mit Lysepuffer und einmal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl [pH8.0], 500 mM NaCl, 10 mM DTT) gewaschen. Anschließend wurden die mit GST-VCB-Komplex beladene Sepharose mit Thrombin (SIGMA, 50-100 U/1 l LB-Kultur) über Nacht

inkubiert. Der VCB-Komplex wurde von der GST-beladenen Sepharose abgetrennt und der VCB-Komplex über eine präparative Gelfiltration (Superdex S75 von Amersham Bioscience) weiter aufgereinigt (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 200 mM KCl, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA). Nach der Gelfiltration wurde der Komplex mit einer hohen Reinheit erhalten. Die Komplexe wurden gegen den Messpuffer (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl, 5 mM DTT) dialysiert, aliquotiert, schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Konzentrationen der Komplexe wurden photometrisch und mittels quantitativer Aminosäureanalyse bestimmt. Zusätzlich wurden die molekularen Massen der Untereinheiten der VCB-Komplexe mittels Massenspektrometrie bestätigt.

### **GST-VCB-Komplexe**

Der GST-VCB-Komplex wurde, wie oben beschrieben, exprimiert und aufgereinigt. Die Glutathion-Sepharose wurden nicht mit Thrombin inkubiert, sondern mit reduziertem Glutathion (10 mM in Lysepuffer) eluiert. Nach anschließender Dialyse und Gelfiltration (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 200 mM KCl, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA) wurden die GST-VCB-Komplexe im Gel analysiert. Die Fraktionen, die den rekombinanten GST-VCB-Komplex enthielten, wurden vereinigt und gegen Messpuffer (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl, 5 mM DTT) dialysiert. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **5.5.9. Stabilitätsmessungen**

### **5.5.9.1. Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge**

#### **Denaturierung**

Der VCB-Komplex (500 nM) wurde mit steigenden Konzentrationen an Harnstoff (0-4 M, Fluka) über Nacht bei  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Messpuffer (20 mM Tris/HCl [pH7.9], 75 mM KCl, 5 mM DTT) inkubiert, um ein Gleichgewicht zwischen

dem nativen und denaturierten Zustand einzustellen. Durch Fluoreszenzspektroskopie wurde die chemische Denaturierung der Proteine bei 10 °C mit einem HITACHI-F4500 gemessen. Das Differenzspektrum (nach Anregung bei 290 nm) des entfalteten und nativen Zustandes wies bei 354 nm ein Maximum auf, welches als analytische Wellenlänge für die Messungen des Tryptophansignals verwendet wurde.

Die Bandbreiten betragen 5 nm und das Probenvolumen lag bei 300  $\mu$ l (5 mm Küvetten von Binniger Analytik). Es wurden für jede Konzentration zehn Werte aufgenommen (Integrationszeit 1 sec) und diese dann gemittelt. Zusätzlich wurde durch Anregung bei 278 nm und Detektion bei 304 nm das Tyrosinsignal gemessen. Die Entfaltungsübergänge zeigten keine lokalen Minima oder Maxima, weshalb für die Entfaltung der VCB-Komplexe ein Zweizustandsmodell angenommen wurde.

Das Fluoreszenzsignal wurde auf den entfalteten Anteil ( $F_{denaturiert}$ ) des Proteins mit folgenden Gleichungen normalisiert (Pace, 1990):

$$y_N = a_N x + b_N$$

$$y_D = a_D x + b_D$$

$$F_{denaturiert} = \frac{(y_{obs} - y_N)}{(y_D - y_N)}$$

wobei  $y_N$  und  $y_D$  die Fluoreszenzsignale des nativen (N) bzw. des denaturierten (D) Zustandes sind,  $x$  die Harnstoffkonzentration,  $a$  ist der Anstieg des nativen bzw. des denaturierten Zustandes und  $b$  der Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse aus der linearen Kurvenanpassung,  $y_{obs}$  ist das gemessene Fluoreszenzsignal.

Die Entfaltungskurven wurden nach folgenden Gleichungen gefittet, um die Mittelwerte der Übergangskurven ( $D_{50\%}$ ),  $m$ -Werte ( $m$ ) und die freie Energie ( $\Delta G_{H_2O}$ ) zu bestimmen (Clarke und Fersht, 1993, Killenberg-Jabs *et al.*, 2002).

$$y_{obs} = \frac{(y_N + a_N x) + (y_D + a_D x)e^{(mx - \Delta G_{H_2O})/RT}}{1 + e^{(mx - \Delta G_{H_2O})/RT}}$$
$$y_{obs} = \frac{(y_N + a_N x) + (y_D + a_D x)e^{(-m(D_{50\%} - x))/RT}}{1 + e^{(-m(D_{50\%} - x))/RT}}$$

### Renaturierung

Ein Aliquot VCB-Komplex wurde in 5 M Harnstoff über Nacht bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde der VCB-Komplex mit steigenden Konzentrationen an Harnstoff und 20 mM Tris/HCl [pH7.9], 75 mM KCl, 5 mM DTT versetzt. Die Proben wurden über Nacht bei 10 °C inkubiert und die Messungen bzw. Auswertung wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 5.5.9.2. Partielle Proteolyse

Untersuchungen zur Stabilität gegenüber Proteasen wurden mit Trypsin durchgeführt. 8 µg VCB-Komplex wurden mit 10-80 ng Trypsin (Promega, Sequenzierqualität) bei 37 °C in Messpuffer (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl, 5 mM DTT) inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mit 1 µM PMSF die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

#### 5.5.9.3. Analytische Gelfiltration

Je 30 µg VCB-Komplex wurde über Nacht bei 4 °C, 30 °C oder 37 °C mit dem Messpuffer (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl, 5 mM DTT) inkubiert. Anschließend wurde mittels analytischer Gelfiltration (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl, 5 mM DTT) das Elutionsverhalten untersucht. Es wurde eine Superdex S75 (Amersham, 25 ml) und eine Flussrate von 0.3 ml/min verwendet. Als Marker wurden Blue Dextran und Ovalbumin genutzt. Die gesammelten Proben bzw. Fraktionen (je 500 µl) wurden anschließend mit TCA präzipitiert und im SDS-Gel analysiert.

## 5.5.10. Bindungsstudien

### 5.5.10.1. Modellsubstrate

Für die Untersuchungen der Substratbindung der VCB-Komplexe wurden Peptide synthetisiert, die vom HIF1 $\alpha$  abgeleitet wurden. Das Hyp-Peptid (DLEMLAP\*YIPC, P\* ist hydroxyliert) und das Pro-Peptid (DLEMLAPYIPC) beinhalten die Reste 558-567 aus HIF1 $\alpha$  mit einem Cystein am C-Terminus. Dieser Cysteinrest wurde für die Kopplung der Fluoreszenzgruppe eingeführt. Für die Kopplung an *2-(4-Maleimidyl-Anilino)-Naphthalen-6-Sulfonsäure* (MIANS, Molecular Probes) wurde das Hyp-Peptid über Nacht gegen 0.1 M Mes/NaOH [pH6.0] dialysiert. Anschließend wurde das Peptid mit einem zweifachen Überschuss an MIANS versetzt und die Kopplungsreaktion für 4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol gestoppt. Die Peptide wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und über eine analytische HPLC und Massenspektrometrie eine 90%ige Reinheit nachgewiesen. Die Konzentrationen der Peptide wurden photometrisch und mittels quantitativer Aminosäureanalyse bestimmt. Die Peptide wurden in Messpuffer (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl, 5 mM DTT) dialysiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Peptide ohne den Fluoreszenzmarker wurden in 100 mM HEPES/NaOH pH 7.0 gelöst und wie oben beschrieben die Konzentrationen bestimmt. Für Fluoreszenzmessungen wurde  $\lambda_{\text{ex}}$  (Anregungswellenlänge) durch 3D-Spektren bestimmt und auf 326 nm festgelegt.

### 5.5.10.2. Gleichgewichtstitrationen

Die Bindungsstudien wurden bei 20 °C durchgeführt. Als Messpuffer wurden 40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl und 5 mM DTT verwendet. Die Gleichgewichtstitrationen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 326 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm auf einem Hitachi F-4500 durchgeführt. Es wurde eine 1 cm Küvette und 5 nm Bandbreiten benutzt. Die Hyp-MIANS-Peptid-Konzentration betrug 15 nM für den Wildtyp, P81S,



L188V, P81S/L188V; 50 nM für die Histidin-Mutanten und 500 nM für die Asparagin-Mutanten. Der VCB-Komplex wurde zu dem Peptid titriert. Für den Wildtyp und die 2C-Mutanten wurde von 2.5-250 nM gemessen, bei den 2A/2B-Mutanten von 25-6000 nM. Die detektierten Signale wurden gegen das Volumen korrigiert. Um die Gleichgewichtskonstante ( $K_d$ ) zu bestimmen wurden die Daten nach folgender Gleichung gefittet (Buchberger *et al.*, 1999):

$$y = \frac{\frac{x + P + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{x + P + K_d}{2}\right)^2 - xP}}{P} (F_{\max} - F_0) + F_0$$

wobei  $y$  das gemessene Fluoreszenzsignal darstellt,  $x$  die VCB-Konzentration,  $P$  die Peptidkonzentration,  $F_{\max}$  die Amplitude des Signals und  $F_0$  das Signal ohne den VCB-Komplex.

### 5.5.10.3. Einfluss der MIANS-Gruppe auf die Bindung

Um den Einfluss der MIANS-Gruppe auf die Bindung an den VCB-Komplex zu bestimmen, wurden Verdrängungsexperimente bei 20 °C durchgeführt. Der VCB-Komplex wurde 1:1 mit dem Hyp-MIANS-Peptid (je 100 nM) und dem Messpuffer (40 mM Tris/HCl [pH8.0], 150 mM KCl, 5 mM DTT) versetzt. Zu diesen Ansätzen wurde das Hyp-Peptid mit steigenden Konzentrationen (0-2000 nM) zugegeben und bei 20 °C inkubiert. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal bei 430 nm (nach einer Anregung bei 326 nm) detektiert.

Die erhaltenen Daten wurden nach folgenden Gleichungen gefittet (Cho *et al.*, 2005):

$$FP = FP_0 + \left( \frac{(FP_{\max} - FP_0)}{(1 + 10^{(\log(FP) - \log(IC_{50}))})} \right)$$

wobei  $FP$  das gemessene Fluoreszenzsignal darstellt,  $FP_0$  ist das Fluoreszenzsignal, wenn die Konzentration des Hyp-Peptides Null ist,  $FP_{\max}$

ist das Signal bei sättigender Hyp-Peptid-Konzentration, IC50 ist die Konzentration für eine halbmaximale Inhibition der Bindung.

Aus dem IC50-Wert wiederum ist es möglich den  $K_d$ -Wert für das nicht nicht-gelabelte Peptid (Hyp-Peptid) zu berechnen (Cheng, 2001):

$$K_i = \frac{IC50}{1 + (D/K_d)}$$

wobei  $K_i$  dem  $K_d$ -Wert des nicht gelabelten Peptides entspricht, D der Konzentration des MIANS-Peptides und  $K_d$  der Gleichgewichtskonstanten des gelabelten Peptides (Hyp-MIANS).

#### 5.5.10.4. Stopped-Flow-Experimente

Diese Studien wurden im Labor von Prof. A. Fersht am CPE in Cambridge, UK durchgeführt.

Die Experimente mittels *Stopped-Flow*-Technik wurden mit einem Applied Photophysics SX.18MV-Instrument bei einer Anregung von 326 nm und einem cut-off-Filter von 375 nm auf der Emissions-Seite aufgenommen.

Die Dissoziationsraten ( $k_{off}$ ) wurden durch Verdrängungsexperimente erhalten. Der VCB-Komplex wurde zu gleiche Mengen mit dem Hyp-MIANS-Peptid inkubiert (50 nM Wildtyp, 200 nM Mutanten) und sofort nach Zugabe des Hyp-Peptides (25-50-facher Überschuss) wurde die Messung gestartet. Es wurden 10 Messungen gemittelt. Die erhaltenen Daten wurden einfach exponentiell nach folgender Gleichung gefittet:

$$y = \Delta F * (1 - e^{(-k_{off} * x)}) + F_0$$

wobei  $y$  das gemessene Fluoreszenzsignal darstellt,  $\Delta F$  ist die maximale Fluoreszenzänderung,  $k_{off}$  die Dissoziationsrate,  $x$  die Zeit und  $F_0$  der Ausgangswert.

Assoziationskinetiken wurden unter der Annahme einer Reaktion pseudo erster Ordnung durchgeführt. Zu 200 nM Hyp-MIANS-Peptid wurde der VCB-Komplex im Überschuss (750- 2000 nM, 4-8 verschiedene Konzentrationen) zugegeben und die Fluoreszenzänderung detektiert. Die Daten wurden wiederum gemittelt und einfach exponentiell gefittet (Gleichung siehe Dissoziationskinetik, anstatt  $k_{\text{off}}$  wurde  $k_{\text{obs}}$  ermittelt). Aus der Gleichung erhält man die scheinbare Assoziationsrate ( $k_{\text{obs}}$ ). Durch die Auftragung der verschiedenen  $k_{\text{obs}}$ -Werte gegen die VCB-Konzentration erhält man durch einen linearen Fit den Anstieg und den Schnittpunkt mit der y-Achse. Der Anstieg entspricht der Assoziationsrate ( $k_{\text{on}}$ ) und der Schnittpunkt die Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ).

#### **5.5.10.5. Partielle Proteolyse mit Peptiden**

Die Proteaseverdau wurden, wie bereits unter 5.5.9.2. beschrieben, bei 37 °C durchgeführt. Die Modellsubstrate wurden in 10-fachem Überschuss (25  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt.

#### **5.5.10.6. *In vitro* Bindungsexperimente**

##### **Ni-NTA-Bindungsexperiment**

Ni-NTA-Agarose wurden dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  Assay-Puffer (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl, 10 mM Imidazol) equilibriert. Je 50  $\mu\text{g}$  rekombinantes His-Elongin BC (Elongin BC-Komplex gereinigt aus *E.coli*, freundlicherweise von Claudia Bex zur Verfügung gestellt) wurden an die Agarose gebunden (Volumen 250  $\mu\text{l}$ ) und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurden dreimal mit 500  $\mu\text{l}$  Assay-Puffer (+40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA, 0,25% NP-40, 1mM DTT, 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Antipain, 4,3  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Leupeptin, 4,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Trypsin Inhibitor, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pepstatin, 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Chymostatin) gewaschen. Anschließend wurde die Agarose mit je 10  $\mu\text{g}$  rekombinanten VCB-Komplex für drei Stunden bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand nach der Zentrifugation (5 min, 500g) wurde ebenso analysiert, wie an die

Agarosematrix gebundene Proteine. Nach der SDS-PAGE wurden die Proben durch Coomassie-Färbung oder Western Blot untersucht.

### **Glutathion-Sepharose-Bindungsexperiment**

Glutathion-Sepharose wurden dreimal mit 500  $\mu$ l Assay-Puffer (40 mM Tris/HCl [pH7.9], 150 mM KCl, 5 mM DTT) äquibriert. Je 50  $\mu$ g rekombinanter GST-VCB-Komplex wurde an die Sepharose gebunden (Volumen 250  $\mu$ l) und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Glutathion-Sepharose wurde dreimal mit 500 $\mu$ l Assay-Puffer (+40  $\mu$ g/ml BSA, 0,25% NP-40, 1mM DTT, 6  $\mu$ g/ml Antipain, 4,3  $\mu$ l/ml Leupeptin, 4,5  $\mu$ g/ml Aprotinin, 5  $\mu$ g/ml Trypsin Inhibitor, 5  $\mu$ g/ml Pepstatin, 6  $\mu$ g/ml Chymostatin) gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose mit je 10  $\mu$ g rekombinanten His-Elongin BC-Komplex für drei Stunden bei 4 °C bzw. Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand nach der Zentrifugation (5 min, 500g) wurde ebenso analysiert, wie an die Sepharose gebundene Proteine. Nach der SDS-PAGE wurden die Proben durch Coomassie-Färbung oder Western Blot untersucht.

## 5.6. Verwendete Plasmide

### 5.6.1. Expression in *E.coli*

Name	Vektor	Insert	Quelle
pBB75	pBB75-C	ElonginC 17-112	Stebbins et al. 1999
pVB wt	pVB	pVHL <sub>19</sub> wt / Elongin B	Stebbins et al. 1999
pVB Y98H	pVB	pVHL <sub>19</sub> Y98H / EL B	Claudia Bex
pVB Y98N	pVB	pVHL <sub>19</sub> Y98N / EL B	diese Arbeit
pVB Y112H	pVB	pVHL <sub>19</sub> Y112H / EL B	diese Arbeit
pVB Y112N	pVB	pVHL <sub>19</sub> Y112N / EL B	diese Arbeit
pVB P81S	pVB	pVHL <sub>19</sub> P81S / EL B	diese Arbeit
pVB L188V	pVB	pVHL <sub>19</sub> L188V / EL B	diese Arbeit
pVB P81S/L188V	pVB	pVHL <sub>19</sub> P81S/L188V / EL B	diese Arbeit

### 5.6.2. Expression in Säugerzellen

Name	Vektor	Insert	Quelle
Flag-pVHL <sub>19</sub> wt	pCMV2C	WT-pVHL <sub>19</sub>	Claudia Bex
Flag-pVHL <sub>19</sub> Y98H	pCMV2C	Y98H-pVHL <sub>19</sub>	diese Arbeit
Flag-pVHL <sub>19</sub> Y98N	pCMV2C	Y98N-pVHL <sub>19</sub>	diese Arbeit
Flag-pVHL <sub>19</sub> Y112H	pCMV2C	Y112H-pVHL <sub>19</sub>	diese Arbeit
Flag-pVHL <sub>19</sub> Y112N	pCMV2C	Y112N-pVHL <sub>19</sub>	diese Arbeit
Flag-pVHL <sub>19</sub> P81S	pCMV2C	P81S-pVHL <sub>19</sub>	diese Arbeit
Flag-pVHL <sub>19</sub> L188V	pCMV2C	L188V-pVHL <sub>19</sub>	diese Arbeit
Flag-pVHL <sub>19</sub> P81S/L188V	pCMV2C	P81S/L188V-pVHL <sub>19</sub>	diese Arbeit
HA-pVHL <sub>19</sub> wt	pCDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> wt	Hergovich <i>et al.</i> , 2003
HA-pVHL <sub>19</sub> 98H	pcDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> Y98H	Hergovich <i>et al.</i> , 2003
HA-pVHL <sub>19</sub> 98N	pcDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> Y98N	Hergovich <i>et al.</i> , 2003
HA-pVHL <sub>19</sub> C162F	pcDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> C162F	Hergovich <i>et al.</i> , 2003
HA-pVHL <sub>19</sub> Y112H	pcDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> Y112H	diese Arbeit
HA-pVHL <sub>19</sub> Y112N	pcDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> Y112N	diese Arbeit
HA-pVHL <sub>19</sub> P81S	pcDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> P81S	diese Arbeit
HA-pVHL <sub>19</sub> L188V	pcDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> L188V	diese Arbeit
HA-pVHL <sub>19</sub> P81S/L188V	pcDNA-HA	pVHL <sub>19</sub> P81S/L188V	diese Arbeit
HA-Cullin2	pcDNA3.1 HA	Cul2	Maher E., University of Birmingham
Flag-Socs1	pCMV2	Socs1	Claudia Bex
HIF1 $\alpha$ wt	pcDNA3	HIF1 $\alpha$ wt	diese Arbeit

## 6. Literatur

Appelhoff, R. J., Tian, Y. M., Raval, R. R., Turley, H., Harris, A. L., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., und Gleadle, J. M. (2004). Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* **279**, 38458-38465

Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., und Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J* **22**, 4082-4090

Boice, J. A., und Fairman, R. (1996). Structural characterization of the tumor suppressor p16, an ankyrin-like repeat protein. *Protein Sci* **5**, 1776-1784

Bradley, J. F., Collins, D. L., Schimke, R. N., Parrott, H. N., und Rothberg, P. G. (1999). Two distinct phenotypes caused by two different missense mutations in the same codon of the VHL gene. *Am J Med Genet* **87**, 163-167

Brauch, H., Kishida, T., Glavac, D., Chen, F., Pausch, F., Hofler, H., Latif, F., Lerman, M. I., Zbar, B., und Neumann, H. P. (1995). Von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet* **95**, 551-556

Brauch, H., Weirich, G., Hornauer, M. A., Storkel, S., Wohl, T., und Bruning, T. (1999). Trichloroethylene exposure and specific somatic mutations in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **91**, 854-861

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

Buchberger, A., Gassler, C. S., Buttner, M., McMacken, R., und Bukau, B. (1999). Functional defects of the DnaK756 mutant chaperone of *Escherichia coli* indicate distinct roles for amino- and carboxyl-terminal residues in substrate and co-chaperone interaction and interdomain communication. *J Biol Chem* **274**, 38017-38026

Bullock, A. N., Henckel, J., DeDecker, B. S., Johnson, C. M., Nikolova, P. V., Proctor, M. R., Lane, D. P., und Fersht, A. R. (1997). Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14338-14342

Bullock, A. N., Henckel, J., und Fersht, A. R. (2000). Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* **19**, 1245-1256

Chan, D. A., Sutphin, P. D., Yen, S. E., und Giaccia, A. J. (2005). Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol* **25**, 6415-6426

Chen, F., Kishida, T., Duh, F. M., Renbaum, P., Orcutt, M. L., Schmidt, L., und Zbar, B. (1995). Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* **55**, 4804-4807

Cheng, H. C. (2001). The power issue: determination of KB or Ki from IC50. A closer look at the Cheng-Prusoff equation, the Schild plot and related power equations. *J Pharmacol Toxicol Methods* **46**, 61-71

Cho, H., Park, H., und Yang, E. G. (2005). A fluorescence polarization-based interaction assay for hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 275-280

Clarke, J., und Fersht, A. R. (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry* **32**, 4322-4329

Clifford, S. C., Cockman, M. E., Smallwood, A. C., Mole, D. R., Woodward, E. R., Maxwell, P. H., Ratcliffe, P. J., und Maher, E. R. (2001). Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mol Genet* **10**, 1029-1038

Cockman, M. E., Masson, N., Mole, D. R., Jaakkola, P., Chang, G. W., Clifford, S. C., Maher, E. R., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., und Maxwell, P. H. (2000). Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* **275**, 25733-25741

Collins, G. A., und Tansey, W. P. (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev*

Duan, D. R., Pause, A., Burgess, W. H., Aso, T., Chen, D. Y., Garrett, K. P., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Linehan, W. M., und Klausner, R. D. (1995). Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science* **269**, 1402-1406

Dunn, A. Y., Melville, M. W., und Frydman, J. (2001). Review: cellular substrates of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *J Struct Biol* **135**, 176-184

Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., *et al.* (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43-54

Feldman, D. E., Spiess, C., Howard, D. E., und Frydman, J. (2003). Tumorigenic mutations in VHL disrupt folding in vivo by interfering with chaperonin binding. *Mol Cell* **12**, 1213-1224

Feldman, D. E., Thulasiraman, V., Ferreyra, R. G., und Frydman, J. (1999). Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. *Mol Cell* **4**, 1051-1061

Gnarra, J. R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F. M., und et al. (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7**, 85-90

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

Groulx, I., Bonicalzi, M. E., und Lee, S. (2000). Ran-mediated nuclear export of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein occurs independently of its assembly with cullin-2. *J Biol Chem* **275**, 8991-9000

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

Hes, F. J., McKee, S., Taphoorn, M. J., Rehal, P., van Der Luijt, R. B., McMahon, R., van Der Smagt, J. J., Dow, D., Zewald, R. A., Whittaker, J., Lips, C. J., MacDonald, F., Pearson, P. L., und Maher, E. R. (2000). Cryptic von Hippel-Lindau disease: germline mutations in patients with haemangioblastoma only. *J Med Genet* **37**, 939-943

Heukeshoven, J. u. D., R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Elektrophoresis* **6**, 103-112

Hicke, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* **9**, 107-112

Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., Jentsch, S., und Muller, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO  
SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nature* **419**, 135-141

Hoffman, M. A., Ohh, M., Yang, H., Klco, J. M., Ivan, M., und Kaelin, W. G., Jr. (2001). von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet* **10**, 1019-1027



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

Huang, J., Zhao, Q., Mooney, S. M., und Lee, F. S. (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* **277**, 39792-39800

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

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 O<sub>2</sub> sensing. *Science* **292**, 464-468

Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Klausner, R. D., und Pause, A. (1999). Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12436-12441

Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., und Ratcliffe, P. J. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472

Kaelin, W. G., Jr. (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* **2**, 673-682

Kaelin, W. G., Jr. (2005). The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 627-638

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

Kietzmann, T., Cornesse, Y., Brechtel, K., Modaressi, S., und Jungermann, K. (2001). Perivenous expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor alpha-subunits, HIF1alpha, HIF2alpha and HIF3alpha, in rat liver. *Biochem J* **354**, 531-537

Killenbergs-Jabs, M., Kern, G., Hubner, G., und Golbik, R. (2002). Folding and stability of different oligomeric states of thiamin diphosphate dependent homomeric pyruvate decarboxylase. *Biophys Chem* **96**, 259-271

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., und Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**, 635-644

Kubota, H., Hynes, G., und Willison, K. (1995). The chaperonin containing t-complex polypeptide 1 (TCP-1). Multisubunit machinery assisting in protein folding and assembly in the eukaryotic cytosol. *Eur J Biochem* **230**, 3-16

Lackowitz, J. (1983). Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Plenum Press, New York*

Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., und et al. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* **260**, 1317-1320

Lee, S., Chen, D. Y., Humphrey, J. S., Gnarr, 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

Lee, S., Nakamura, E., Yang, H., Wei, W., Linggi, M. S., Sajan, M. P., Farese, R. V., Freeman, R. S., Carter, B. D., Kaelin, W. G., Jr., und Schlisio, S. (2005). Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell* **8**, 155-167

Lindau, A. (1926). Studien über Kleinhirnzysten. Bau, Pathogenese und Beziehungen zur Angiomatosis retinae. *Acta Pathol Microbiol Scand (I)*  
Lisztwan, J., Imbert, G., Wirbelauer, C., Gstaiger, M., und Krek, W. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev* **13**, 1822-1833

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* **280**, 22205-22211

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

Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., und Poellinger, L. (2001). Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* **414**, 550-554

Maxwell, P. H. (2005). A common pathway for genetic events leading to pheochromocytoma. *Cancer Cell* **8**, 91-93

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

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-1alpha 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

Ohh, M., Park, C. W., Ivan, M., Hoffman, M. A., Kim, T. Y., Huang, L. E., Pavletich, N., Chau, V., und Kaelin, W. G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* **2**, 423-427

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

Oshikawa, K., Matsumoto, M., Yada, M., Kamura, T., Hatakeyama, S., und Nakayama, K. I. (2003). Preferential interaction of TIP120A with Cul1 that is not modified by NEDD8 and not associated with Skp1. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 1209-1216

Pace, C. N. (1990). Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol* **8**, 93-98

Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., und Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**, 773-785

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

Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., und Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* **272**, 11205-11214

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

Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwala, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., und Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* **14**, 34-44

Roe, J. S., Kim, H., Lee, S. M., Kim, S. T., Cho, E. J., und Youn, H. D. (2006). p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell* **22**, 395-405

Sambrook, J., Fritsch, E.F. Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. *CSH Laboratory Press*

Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235-246

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

Sutovsky, H., und Gazit, E. (2004). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a molten globule under native conditions: implications for its physiological activities. *J Biol Chem* **279**, 17190-17196

Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., und Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**, 94-102

von Hippel, E. (1904). Über eine seltene Erkrankung der Netzhaut. *Graefes Arch Ophthalmol*, 59-83

Weirich, G., Klein, B., Wohl, T., Engelhardt, D., und Brauch, H. (2002). VHL2C phenotype in a German von Hippel-Lindau family with concurrent VHL germline mutations P81S and L188V. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 5241-5246

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

Woodward, E. R., Buchberger, A., Clifford, S. C., Hurst, L. D., Affara, N. A., und Maher, E. R. (2000). Comparative sequence analysis of the VHL tumor suppressor gene. *Genomics* **65**, 253-265

Zbar, B., Kishida, T., Chen, F., Schmidt, L., Maher, E. R., Richards, F. M., Crossey, P. A., Webster, A. R., Affara, N. A., Ferguson-Smith, M. A., *et al.* (1996). Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* **8**, 348-357

Zheng, J., Yang, X., Harrell, J. M., Ryzhikov, S., Shim, E. H., Lykke-Andersen, K., Wei, N., Sun, H., Kobayashi, R., und Zhang, H. (2002a). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell* **10**, 1519-1526

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., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Harper, J. W., und Pavletich, N. P. (2002b). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**, 703-709

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-Triphosphat
B	Beads (Sephrose, Agarose)
CBC	Cullin 2-Elongin B-Elongin C
Cul2	Cullin 2
dATP	Desoxyadenosin Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL B	Elongin B
EL C	Elongin C
FCS	fetal calf serum
FT	flow through
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIF	hypoxia inducible factor (Hypoxie induzierter Transkriptionsfaktor)
Hyp	Hydroxyprolin
IC <sub>50</sub>	Konzentration der halbmaximalen Inhibition der Bindung
IP	Koimmunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktopyranosid
IVT	<i>in vitro</i> Translation
kb	Kilobasen
K <sub>d</sub>	Gleichgewichtskonstante
kDa	Kilo Dalton
K <sub>i</sub>	inhibitorische Konstante
k <sub>obs</sub>	scheinbare Assoziationsrate
k <sub>off</sub>	Dissoziationsrate
k <sub>on</sub>	Assoziationsrate
L	Lysat
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
MIANS	Maleimidyl-Anilino-Naphthalen-Sulfonic-acid
mRNA	messenger RNA
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NP-40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
ODD	oxygen-dependent degradation
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Pulldown ( <i>in vitro</i> Bindungsexperiment)

## Abkürzungsverzeichnis

---

PHD	Prolylhydroxylase
PMSF	Phenylmethylysulphonylfluorid
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SCF	Skp1-Cullin-F-box
SDS	sodium dodecylsulphate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOCS	suppressor of cytokine signalling
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRiC	TCP-1 ring complex
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

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Alexander Buchberger für die Vergabe des interessanten Projektes bedanken. Durch die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Stefan Jentsch möchte ich mich für das stetige Interesse und die Unterstützung an meinem Projekt bedanken.

Herrn Prof. Michael Schleicher danke ich für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens.

Den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission danke ich für das Interesse an der Arbeit.

Herrn Prof. Sir Alan Fersht und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Labor und die Unterstützung bei den *Stopped-Flow*-Messeungen. Ein besonderer Dank gilt Dr. Chris Johnson und Dr. Per Jemth für die Beantwortung vieler wissenschaftlicher Fragen.

Danken möchte ich vor allem auch der Arbeitsgruppe Buchberger für die nette Stimmung im Labor und die vielen experimentellen bzw. sonstigen Tipps.

Ein weiteres Dankeschön gilt der gesamten Abteilung für Molekulare Zellbiologie.

Es war eine gute Zeit.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden. Was wäre die Arbeit nur ohne euch! DANKE!

Meinem Freund Martin danke ich für seine stetige Unterstützung, sowohl in wissenschaftlicher als auch in persönlicher Hinsicht.



## LEBENS LAUF – KATJA KNAUTH

---

**Name** Katja Knauth  
**Adresse** Hirsch-Gereuth-Str. 80  
81369 München  
Tel.: 089/74080380  
**Geburtsdatum** 01. September 1976  
**Geburtsort** Frankfurt (Oder)

---

### Schulbildung

1983-1990 10. Polytechnische Oberschule Frankfurt (Oder)  
1990-1996 Sportbetonte Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe,  
Frankfurt (Oder)  
Abschluss mit Abitur im Juni 1996

### Studium

1996-2001 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Studiengang: Diplom-Biochemie  
Diplomarbeit „ Untersuchung der Dimerisierungsdomäne des  
*Legionella pneumophila* Mip-Proteins“  
(Max-Planck-Forschungsstelle „Enzymologie der  
Proteinfaltung“; Prof. G. Fischer)  
Abschluss mit Diplom Biochemie im Juli 2001

### Doktorarbeit

Seit Jan. 2002 Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried  
Abteilung für Molekulare Zellbiologie (Prof. Stefan Jentsch)