

# Funktion von CDC48 und Ubiquitin- bindenden Faktoren im proteasomalen Abbau

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

Vorgelegt von  
Diplom-Biochemiker  
Holger Richly

2005

Promotionsgesuch eingereicht am 11.2.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 25.4.2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Charles David

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen noch eine Doktorprüfung durchzuführen. Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, den 11.2.2005

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Stefan Jentsch bedanken, der massgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Sein Interesse und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben mein Wirken stets entscheidend weitergebracht.

Zudem möchte ich mich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission an der Ludwig-Maximilians-Universität bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Charles David für die Begutachtung dieser Arbeit.

Grosser Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe von Stefan Jentsch. Es war mir eine grosse Freude in der lockeren und positiven Atmosphäre zu arbeiten und zu erfahren, dass Forschung trotz vieler Arbeitsstunden Spass machen kann. Besonderer Dank gilt meinen Kollegen Sigurd Braun, Michael Rape und Sebastian Rumpf, die mich mit ihren guten Ratschlägen und Experimenten unterstützt haben. Weiterhin danke ich Alexander Buchberger und Christian Schuberth für eine interessante Zusammenarbeit. Ich möchte mich ausserdem bei Herrn Günter Pfeifer und Herrn Prof. Dr. Baumeister bedanken, die eine strukturelle Untersuchung des CDC48 Proteins ermöglicht haben.

Weiterhin gilt mein Dank all denen, die mich auf meinem Weg unterstützt haben. Ich danke Marta, meiner Mutter, meinem Bruder und meinen Grosseltern.

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Dezember 2000 und Dezember 2004 unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt.

Teile der Dissertation sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., **Richly, H.**, and Jentsch, S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-677.

Schuberth, C., **Richly, H.**, Rumpf, S., and Buchberger, A. (2004). Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. *EMBO Rep* 5, 818-824.

**Richly, H.**, Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegel, C., and Jentsch, S. (2005). A Series of Ubiquitin Binding Factors Connects CDC48/p97 to Substrate Multiubiquitylation and Proteasomal Targeting. *Cell* 120, 73-84.



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom System	2
1.2 E3-Enzyme bestimmen die Substratspezifität	4
1.3 E4-Enzyme katalysieren die Multiubiquitylierung von UFD-Substraten	6
1.4 Funktionen der Ubiquitylierung	7
1.5 Das 26S Proteasom	9
1.6 Physiologische Funktionen von CDC48/p97	12
1.7 Die Regulation von OLE1 in <i>S. cerevisiae</i>	15
Zielsetzung der Arbeit	17
2. Ergebnisse	18
2.1 Aufreinigung und Charakterisierung der AAA-ATPase CDC48	18
2.2 Darstellung des rekombinanten CDC48 <sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex	20
2.3 Charakterisierung des E4-Enzyms UFD2	21
2.4 CDC48 <sup>UFD1/NPL4</sup> wirkt bei der Substratbeladung von UFD2	23
2.5 CDC48 <sup>UFD1/NPL4</sup> bewirkt eine Limitierung der Kettenlänge während der Multiubiquitylierung	25
2.6 Die Limitierung der Kettenlänge wird spezifisch durch CDC48 hervorgerufen	27
2.7 RAD23 und DSK2 interagieren mit UFD2	28
2.8 Die Proteine CDC48, UFD2 und RAD23 bilden einen ternären Komplex	31

2.9	Substratübertragung von UFD2-katalysierten Ubiquitin-Konjugaten	33
2.10	Die Bindungseigenschaften von RAD23 sind unabhängig von der E4 Aktivität	35
2.11	Bindungseigenschaften der UBA-Domäne	36
2.12	Assoziation von Ubiquitin-bindenden Faktoren mit dem 26S Proteasom	38
2.13	Proteasomaler Abbau des Transkriptionsfaktors SPT23	40
2.14	Das ERAD-Substrat <sup>Deg1</sup> Sec62 wird in einem UFD2-abhängigen Abbauweg degradiert	43
3.	Diskussion	45
3.1	Ein Zusammenspiel von Ubiquitin-bindenden Faktoren ermöglicht einen gerichteten proteasomalen Abbau	45
3.2	Funktion der AAA-ATPase CDC48 während der Multiubiquitylierung	47
3.3	Modell für eine UFD2-abhängige Degradation	50
3.4	UFD2 ist ein wichtiger Schalter in Abbauprozessen	51
3.5	Übertragung von Substrat zum Proteasom	52
3.6	Direkte und Substrat-vermittelte Interaktion mit dem Proteasom	54
3.7	Der Transkriptionsfaktor SPT23 und ERAD-Substrate werden in UFD2-abhängigen Degradationswegen abgebaut	56
4.	Material und Methoden	59
5.	Literaturverzeichnis	79
6.	Abkürzungsverzeichnis	90



## Zusammenfassung

In eukaryontischen Zellen wird eine Vielzahl von Proteinen nach einer Modifikation mit Ubiquitin durch spezielle Substrat-Rezeptoren zum 26S Proteasom transportiert. Die AAA-ATPase CDC48, deren Kofaktoren und andere Ubiquitin-bindende Faktoren scheinen in diesen Prozess involviert zu sein. Die genaue Funktion von CDC48 und das Zusammenspiel der Faktoren in Degradationsprozessen sind jedoch nur unzureichend aufgeklärt. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Faktoren der Substrat-Rekrutierung, der Multiubiquitylierung und der Substratweitergabe zum Proteasom physikalisch interagieren und ein Netzwerk bilden, welches Substrate gezielt zum Proteasom leitet. CDC48 spielt in diesem Abbauweg eine zentrale Rolle, da es mit Hilfe der Kofaktoren UFD1/NPL4 in der Erkennung und Übertragung des Substrats auf das E4-Enzym UFD2 wirkt. Weiterhin wird durch CDC48 eine Termination der Ubiquitylierung erreicht, die einer exzessiven Bildung nicht-linearer Ubiquitinketten entgegenwirkt und so den Degradationsprozess optimiert. Die Multiubiquitylierung durch UFD2 ist über die Rezeptorproteine RAD23 und DSK2 mit dem Proteasom gekoppelt. Die Weiterleitung des Substrats zum Proteasom erfolgt in einem konzertierten Mechanismus, der über ternäre Komplexe aus RAD23, UFD2 und CDC48 bzw. durch Assoziation der beteiligten Ubiquitin-bindenden Faktoren am Proteasom erfolgt. Das in Gegenwart von CDC48 durch UFD2 ubiquitylierte Substrat kann über die UBA-Domänen der Rezeptoren RAD23 und DSK2 spezifisch gebunden und zum Proteasom übertragen werden. *In vivo* kontrolliert der dargestellte Abbauweg die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors SPT23, welcher massgeblich über diesen UFD2-abhängigen Abbauweg degradiert wird. Zudem scheint SPT23 über einen parallelen Degradationsweg mittels des Proteins RPN10 abgebaut zu werden. Die Proteolyse von missgefalteten Proteinen des Endoplasmatischen Retikulums (ERAD) erfolgt ebenfalls über den hier dargestellten Abbauweg.

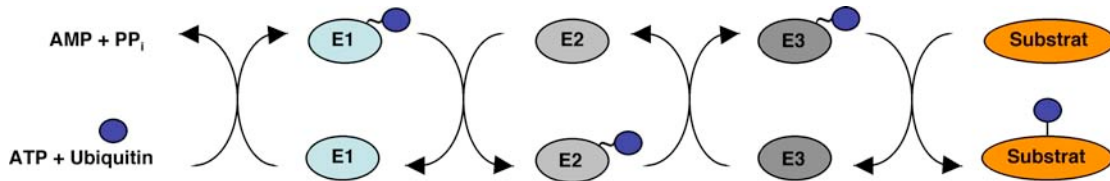
## 1. Einleitung

Die Zellen eines Organismus müssen auf Umweltsignale reagieren, um überleben zu können. Eine Anpassung an neue Umweltbedingungen erfolgt über multiple zelluläre Prozesse, die Cytokinese, Differenzierung und Stoffwechsel betreffen können. Dies geschieht durch eine Regulation bestimmter Proteine, die häufig als Enzyme oder Transkriptionsfaktoren wirken. Die Aktivität eines Proteins kann über allosterische Mechanismen, meist durch Bindung eines inhibierenden Moleküls, oder durch dessen zelluläre Lokalisation reguliert werden. Die Aktivierung und Inaktivierung von Proteinen erfolgt auch über posttranslationale Modifikationen, wobei bestimmte Aminosäuren innerhalb dieser Proteine mit einem spezifischen Signal markiert werden. Dazu zählen unter anderem kovalente Modifikationen wie Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitylierung und Sumoylierung. Zudem wird die zelluläre Proteinkonzentration durch die Neusynthese und den spezifischen Abbau gesteuert. Der selektive Abbau eines Proteins wird in eukaryotischen Zellen durch ein spezielles System ermöglicht, welches die Substrat-Proteine durch Modifikation mit dem Protein Ubiquitin zum Abbau markiert.

### 1.1 Das Ubiquitin-Proteasom System

Die Rolle von Ubiquitin im Abbau von Proteinen wurde erstmals in einem *in vitro* System aus Retikulozytenextrakt ermittelt. In diesem System werden Proteine durch Ubiquitin, ein hochkonserviertes 76 Aminosäuren umfassendes Protein, kovalent modifiziert und damit zum Abbau markiert (Schlesinger et al., 1975). Die biochemischen Prozesse (Abb.1.1) der Übertragung von Ubiquitin-Molekülen auf ein Protein-Substrat (Ubiquitylierung) sind durch das sequentielle Wirken von Proteinen dreier Enzymklassen charakterisiert (Hershko and Ciechanover, 1992). Der Carboxylrest des C-terminalen Glycins von Ubiquitin wird in einer ATP-abhängigen Reaktion durch ein spezifisches Aktivierungs-Enzym (E1)

aktiviert. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Thioesterbindung zwischen einem konservierten Cysteinrest des E1 und dem Ubiquitin-Molekül (Hershko, 1996).



**Abbildung 1.1: Die Ubiquitylierung von Substrat verläuft über eine Enzymkaskade.**

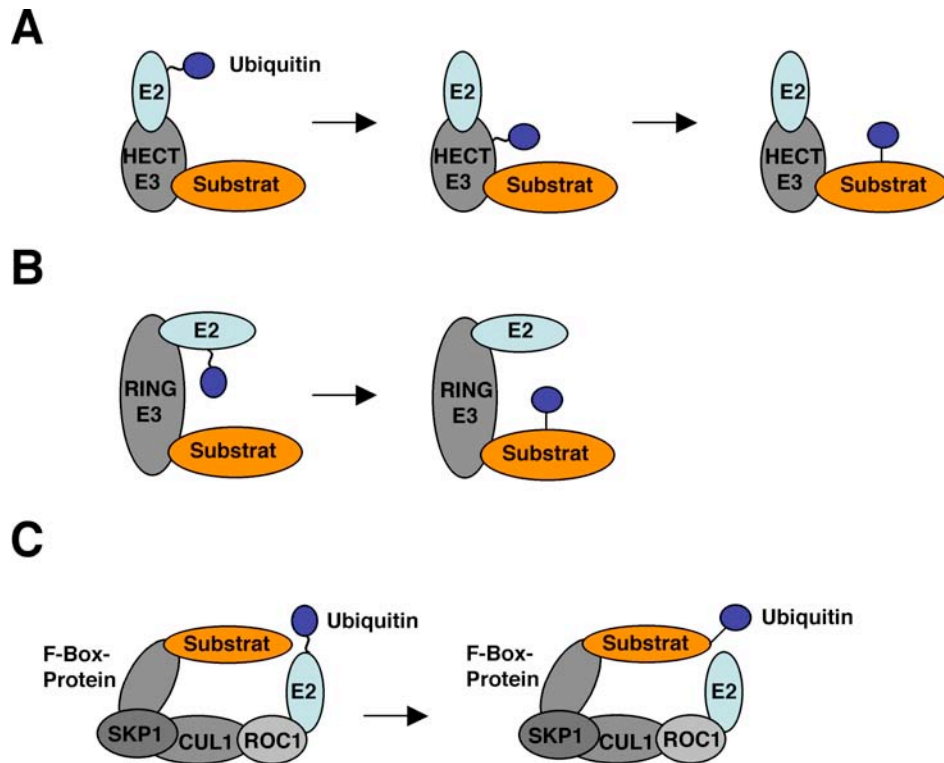
Das E1-Enzym wird in einer ATP-abhängigen Reaktion mit Ubiquitin beladen. Dieses überträgt das aktivierte Ubiquitin auf ein UBC-Protein (E2), welches den Ubiquitinrest wiederum an eine HECT-Ubiquitin-Ligase (E3) weiterreicht. Das E3-Enzym überträgt das Ubiquitin schliesslich auf einen Lysinrest des Substrates. Nach wiederholtem Durchlaufen dieser Enzym-Kaskade sind die Substrate durch Ubiquitinketten modifiziert (Scheffner et al., 1995).

Das aktivierte Ubiquitin wird nun in einer zweiten Reaktion auf ein Cystein im aktiven Zentrum eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (*ubiquitin conjugating enzyme*, E2) übertragen (Jentsch, 1992). E2-Enzyme benötigen meist zusätzliche Faktoren, sogenannte E3-Ligasen, um spezifische Ubiquitylierungsreaktionen zu vermitteln. Man unterscheidet verschiedene Klassen von Ubiquitin-Ligasen. HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen sind durch eine C-terminale Region gekennzeichnet, die sogenannte HECT-Domäne (*homologous to E6-AP C-Terminus*). Diese ca. 350 Aminosäuren umfassende Domäne verfügt über einen hochkonservierten Cysteinrest, der durch das E2-Enzym mit Ubiquitin beladen wird (Scheffner et al., 1995; Huibregtse et al., 1995) und die spezifische Übertragung des Ubiquitinrestes auf das Substrat katalysiert (Abb.1.1). Dabei wird das Ubiquitin-Molekül über den C-Terminus durch eine Isopeptidbindung mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysins des Substrat-Proteins verknüpft (Jentsch, 1992). RING-Finger-E3-Ligasen gehen hingegen keine Thioesterbindung mit Ubiquitin ein, sondern fungieren als Plattform zur Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat-Protein (Abb.1.2).

In *S. cerevisiae* kodiert das Gen UBA1 für das E1-Enzym (McGrath et al., 1991) und es existieren elf Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2-Enzyme), sogenannte UBC-Proteine, die Ubiquitin auf Substrat-Proteine übertragen. Dabei handelt es sich um meist kleine Proteine, die durch eine hochkonservierte UBC-Domäne gekennzeichnet sind, in der das aktive Zentrum liegt. Die Deletion der Gene, die E2-Enzyme kodieren, führen in *S. cerevisiae* zu unterschiedlichen Phänotypen. Dies verdeutlicht, dass UBC-Proteine diverse zelluläre Funktionen ausüben. Zudem weisen UBC-Proteine eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisierung auf (Jentsch, 1992).

## 1.2 E3-Enzyme bestimmen die Substratspezifität

Die Substratbindung wird vermutlich über spezielle Interaktionsmotive der E3-Ligasen hergestellt (Abb.1.2). Diesbezüglich gut untersucht ist die HECT-E3-Ligase RSP5, welche für den Abbau diverser Proteine essentiell ist. Die Substratbindung bei diesem Enzym wird über sogenannte WW-Domänen hergestellt. Diese etwa 30 Aminosäuren umspannende Region interagiert mit prolinreichen Sequenzen von Substratproteinen (Hicke and Riezmann, 1996). In gleicher Weise wird ein C-terminales PXY-Motiv des Transkriptionsfaktors SPT23 erkannt, dessen nachfolgende Ubiquitylierung die proteasomale Prozessierung ermöglicht (Sudol et al., 1995; Shcherbik et al., 2004; Hoppe et al., 2000). Neben den HECT-Domain-E3-Ligasen existiert die Klasse der RING-Finger-E3-Ligasen, die in monomere (Abb.1.2B) und multimere RING-Finger-E3-Ligasen gegliedert ist. Zu Letzteren zählen der APC/C und SCF Multiproteinkomplex (Abb.1.2C), die durch spezielle Module zur Bindung von Substrat und ubiquityliertem E2-Enzym gekennzeichnet sind. Während der APC/C Komplex für die Degradation von mitotischen Cyclinen und des Anaphase-Inhibitors Securin notwendig ist, hat der SCF Komplex ein breiteres Spektrum an Substraten, das neben Cyclinen unter anderem auch Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und  $\beta$ -Catenin umfasst (Vodermaier, 2004).



**Abbildung 1.2: HECT und RING-Finger Ubiquitin-Ligasen**

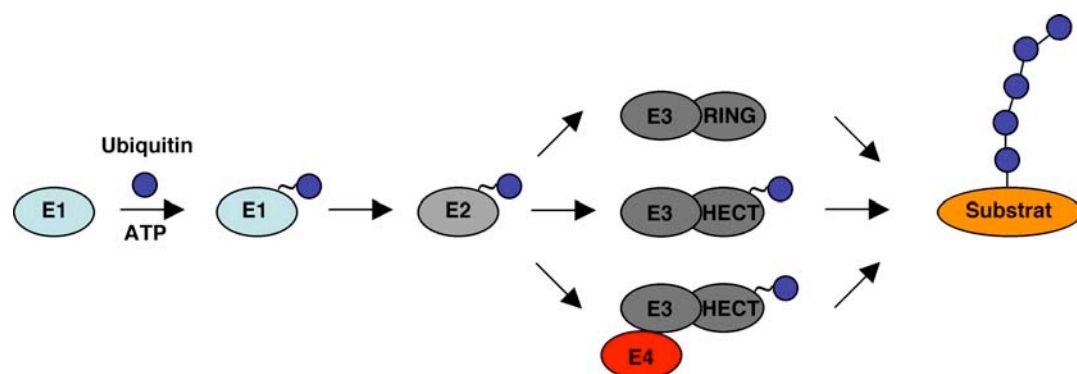
(A) HECT-Ubiquitin-Ligasen sind monomere Proteine, die über spezifische Bindungsmodule mit dem Substrat interagieren. Die HECT-Domäne verfügt über einen konservierten Cysteinrest der durch ein E2-Enzym mit Ubiquitin beladen wird und dieses auf das gebundene Substrat überträgt. (B) Monomere RING-Finger-E3-Ligasen interagieren mit E2-Enzymen und vermitteln die Übertragung von Ubiquitin auf gebundene Substrat-Proteine. (C) Ein Vertreter der Klasse der multimeren RING-Finger Ubiquitin-Ligasen ist der SCF-Komplex. Die Substratbindung wird durch ein F-Box Protein hergestellt, welches über SKP1 und CUL1 mit dem ROC1 Protein assoziiert. Letzteres besitzt die RING-Finger-Domäne, welche zur Interaktion mit dem Ubiquitin-beladenen E2-Enzym benötigt wird.

Die Rekrutierung des E2-Enzyms wird durch ein Zink-bindendes RING-Finger Protein ermöglicht, ROC1 im SCF bzw. APC11 im APC/C Komplex, welches mit Cullin-Proteinen assoziiert (Tang et al., 2001; Vodermaier, 2004). Die Substrat-Bindung wird beim SCF-Komplex über F-Box Proteine hergestellt, die ihrerseits über das SKP1 Protein mit der CUL1 Untereinheit verbunden sind (Zheng et al., 2002). SCF-Komplexe assoziieren mit unterschiedlichen F-Box Proteinen, sodass eine Vielzahl von Substraten ubiquityliert werden kann. Die Substraterkennung beim APC/C Komplex ist weniger gut charakterisiert.

Substrate werden über spezifische Sequenzelemente gebunden, die als *Destruction-Box* oder KEN-Box bezeichnet werden (Glotzer et al., 1991; Pflieger and Kirschner, 2000). Die Rezeptoren der Substraterkennung scheinen CDC20 bzw. CDH1 zu sein, die zudem zur Aktivierung der Ubiquitylierungsfunktion essentiell sind (Peters, 2002).

### 1.3 E4-Enzyme katalysieren die Multiubiquitylierung von UFD-Substraten

In einigen Fällen wird zur Ausbildung langer Ubiquitinketten ein weiterer Faktor benötigt (Abb.1.3). In *S. cerevisiae* konnten in einem *screen* mit UFD-Substraten (*ubiquitin fusion degradation*) u.a. das *UFD4* und *UFD2* Gen isoliert werden (Johnson et al., 1995). *UFD4* ist eine HECT-E3-Ligase, die aber nur die Übertragung von maximal 2 Ubiquitinresten auf ein UFD-Substrat ermöglicht. Zur weiteren Ubiquitylierung und damit Herstellung eines Erkennungssignals für das 26S Proteasom bedarf es des *UFD2*-Proteins (Koepl et al., 1999). *UFD2* ist durch eine C-terminale U-Box-Domäne charakterisiert, die strukturell zum RING-Finger-Motiv homolog ist und vermutlich die E4 Funktion vermittelt (Aravind and Koonin, 2000).



**Abbildung 1.3: E4-Enzyme arbeiten kooperativ mit HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen.**

Die Ubiquitylierung eines Protein-Substrates kann über unterschiedliche E3-Enzyme erfolgen. Neben den HECT- und RING-Finger-E3-Ligasen werden UFD-Substrate über HECT-Ligasen ubiquityliert, die zur einer weiteren Multiubiquitylierung eines zusätzlichen Faktors (E4) bedürfen (Koepl et al., 1999).

Die Multiubiquitylierung scheint kooperativ von E3- und E4-Enzymen ausgeführt zu werden, da die Katalyse durch UFD2 nur in Gegenwart der E3-Ligase UFD4 abläuft (Koegl et al., 1999). In ähnlicher Weise reguliert das Protein CHIP die Ubiquitylierungsaktivität des E3-Enzyms Parkin (Imai et al., 2002) und der E3/E4 Komplex aus CHN-1 und UFD-2 die Ubiquitylierung von UNC-45 in *C. elegans* (Hoppe et al., 2004).

## 1.4 Funktionen der Ubiquitylierung

Die klassische Funktion der Ubiquitylierung besteht in der Markierung von Proteinen zum Abbau. Dazu wird an einem Lysinrest des Substrats eine Multiubiquitinkette synthetisiert, deren Ubiquitinreste hauptsächlich über das Lysin-48 verknüpft sind (Chau et al., 1989). Ubiquitinketten, die über Lysin-63 verbunden sind, scheinen wichtige Abbau-unabhängige Funktionen in diversen Prozessen, wie Endocytose, Stressantwort und DNA-Reparatur wahrzunehmen (Soetens et al., 2001; Spence et al., 1995). Diese spezifische Modifikation wird durch spezielle Enzyme wie dem MMS2/UBC13 Heterodimer und dem TRAF6 E3-Enzym katalysiert (Deng et al., 1999; Hofmann and Pickart, 1999). Der MMS2/UBC13 Komplex kooperiert unter anderem mit den RING-Finger-Proteinen RAD5 und RAD18, sowie dem E2-Enzym RAD6, was zur spezifischen Ubiquitylierung des Polymerase-Kooperativitätsfaktors PCNA führt und eine essentielle Funktion in der DNA-Reparatur darstellt (Ulrich and Jentsch, 2000; Hoege et al., 2002). Die über Lysin-29 verlaufende Ubiquitylierung ist weniger gut charakterisiert. Sie ist für den Abbau von Ubiquitin-Fusionsproteinen wichtig. Diese werden mit einem initialen Ubiquitin-Molekül modifiziert, welches eine Lysin-29 Verknüpfung aufweist. Diese Ubiquitylierung ist für den proteasomalen Abbau allerdings nicht ausreichend, jedoch eine notwendige Voraussetzung für die nachfolgende UFD2-katalysierte Ubiquitylierung, die über das Lysin-48 verläuft und somit das Substrat-Protein zum Abbau markiert (Johnson et al., 1995, Koegl et al., 1999). Synthetisch hergestellte Ubiquitinketten, die über Lysin-29 konjugiert sind, bilden eine Interaktionsfläche für die Proteine UFD3 und

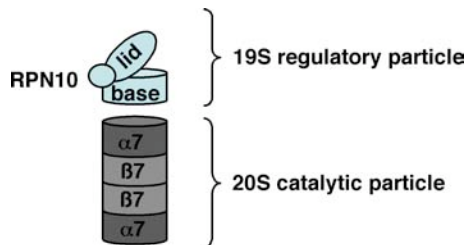
UBP14 (Russell et al., 2004). Die physiologische Relevanz dieser Interaktion ist allerdings unbekannt.

Neben Multiubiquitylierung ist auch Monoubiquitylierung ein wichtiger Regulator zellulärer Prozesse. Die Histone H2A und H2B werden in C-terminalen Bereichen durch eine Monoubiquitylierung modifiziert (Busch et al., 1981; Spencer et al., 1999). Die Ubiquitylierung des Histons H2B durch das E2-Enzym RAD6 spielt in der Meiose eine entscheidende Rolle (Robzyk et al., 2000; Jentsch et al., 1987). Es wird vermutet, dass die Ubiquitylierung einen Einfluss auf die Struktur der Histone hat und damit die Zugänglichkeit der Promotor-DNA für die Transkriptionsmaschinerie beeinflusst. Weiterhin wird Endocytose durch Monoubiquitylierung reguliert. Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, werden an cytoplasmatischen Domänen ubiquityliert und durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen (Hicke, 2001; Rotin et al., 2000). Das Ubiquitinsignal scheint die Internalisierung in Primäre Endosomen zu unterstützen und die Proteine für den lysosomalen Abbau zu markieren (Lucero et al., 2000). Monoubiquitylierung kontrolliert ausserdem die Aktivität der Endocytose-Maschinerie. Die Aktivität des EPS15 Proteins, welches für die Knospung von Clathrin Vesikeln zuständig ist, wird ebenfalls durch ein einzelnes Ubiquitin-Molekül reguliert (Hicke, 2001). Die Invagination der späten Endosomenmembran in multivesikuläre Teilchen (*multivesicular body*; MVB) wird durch sogenannte ESCRT-Komplexe geleitet. Dabei entscheidet das Monoubiquitinsignal, ob die Proteine in MVBs sortiert und damit lysosomal abgebaut oder in die Membran der Vakuole integriert werden (Babst et al., 2002a; Babst et al., 2002b). Eine wichtige Komponente des ESCRT-I Komplexes stellt das Endosomen lokalisierte VPS23 dar. Dieses Protein entspricht einem inaktivem E2-Enzym, da es keine konjugierende Funktion ausübt, sondern die Erkennung des Mono-Ubiquitinsignals vermittelt (Katzmann et al., 2001). Auch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird durch Monoubiquitylierung beeinflusst. Zur Transaktivierung des Transkriptionsfaktors VP16 bedarf es der Ubiquitinierung durch den SCF<sup>MET30</sup> Komplex (Salghetti et al., 2001).



## 1.5 Das 26S Proteasom

Multiubiquitylierte Proteine werden vom Proteasom spezifisch erkannt und abgebaut. Das Proteasom-Holoenzym, auch 26S Proteasom genannt, ist ein 2.5 MDa grosser Komplex, der unter allen Eukaryonten hochkonserviert ist (Hochstrasser, 1996). Die Gesamtstruktur kann in zwei Subkomplexe gegliedert werden (Abb.1.4), den katalytischen Komplex (20S Komplex) und den regulatorischen Komplex (19S Komplex). Der 20S Komplex besteht aus vier gestapelten Ringen, die aus jeweils sieben homologen Proteinen aufgebaut sind. Die beiden inneren  $\beta$ -Ringe weisen die proteolytisch aktiven Zentren auf, die in das Innere der zylindrischen Struktur weisen. (Groll et al., 1997; Baumeister et al., 1998). Die äusseren  $\alpha$ -Ringe sind mit dem regulatorisch wirkenden 19S Partikel verbunden, der in zwei Strukturen unterteilt werden kann, die als *lid* und *base* bezeichnet werden (Glickman et al., 1998). Die N-terminalen Reste der  $\alpha$ -Untereinheiten nehmen eine regulatorische Funktion wahr, da sie den Substrat-Zugang in die Proteolyse-Kammer blockieren (Groll et al., 2000).



**Abbildung 1.4: Das 26S Proteasom.**

Das 26S Proteasom besteht aus einem 20S Partikel (*catalytic particle*) und einem 19S Partikel (*regulatory particle*), der seinerseits in *lid* und *base* unterteilt ist. Die 19S Untereinheit ist an der Bindung und Entfaltung des Substrats beteiligt, während die Proteolyse innerhalb des 20S Partikels stattfindet, der aus 4 heptameren Ringen von  $\alpha$  und  $\beta$  Proteinen besteht. Das Protein RPN10 assoziiert mit *lid* und *base*, dient aber auch in löslicher Form als Substrat-Rezeptor.

Der *base* Komplex weist sechs homologe ATPasen (RPT1-6) auf, die an der Entfaltung des Substrates und dessen Translokation in den 20S Partikel

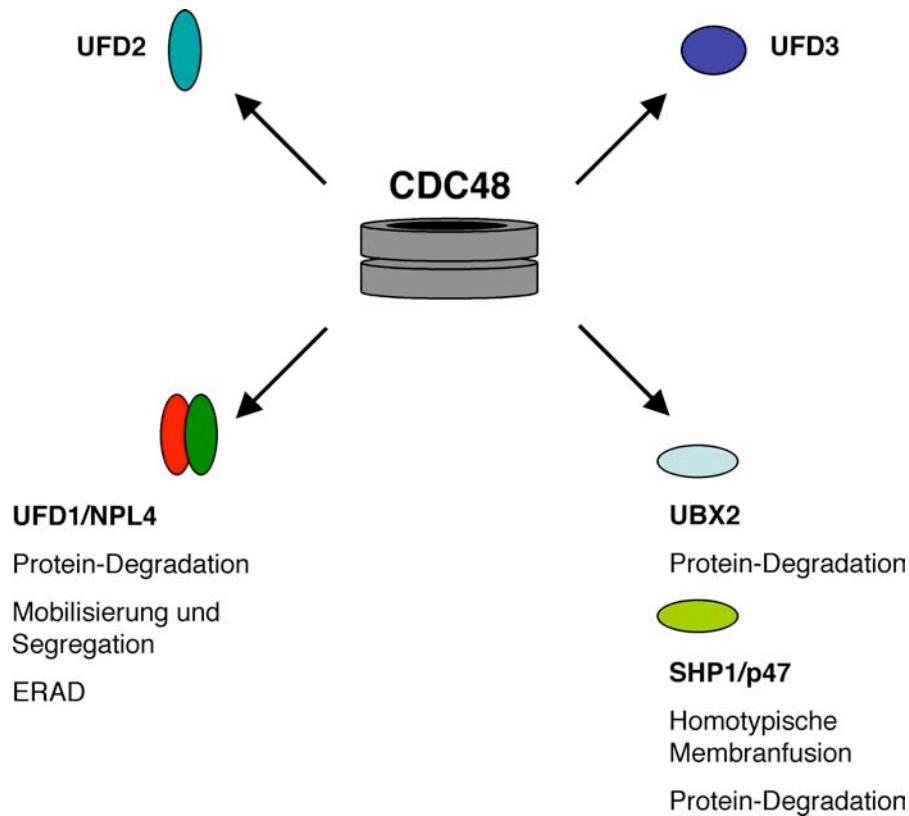
beteiligt sind (Strickland et al., 2000). Die Funktion des *lid* Komplexes ist noch ungeklärt, obwohl dieser für den Abbau multiubiquitylierter Protein notwendig zu sein scheint (Glickman et al., 1998). Um einen effizienten Abbau zu gewährleisten, müssen ubiquitylierte Substrate durch Substrat-Rezeptoren zum 26S Proteasom transportiert werden. Die Erkennung von Ubiquitin-Konjugaten erfolgt dabei wahrscheinlich über die Oberfläche einer Tetra-Ubiquitinstruktur und ist durch hydrophobe Wechselwirkung mit dem Rezeptormolekül zu erklären (Sloper-Mould et al., 2001). In der Zelle existieren spezielle Proteine, die Ubiquitin-Konjugate binden und somit am Transport zum Proteasom beteiligt sein könnten. Als mögliche Substrat-Rezeptoren wurden die Proteine RAD23, DSK2, RPN10 und RPT5 diskutiert (Chen and Madura, 2002; Elsasser et al., 2004, Verma et al., 2004; Lambertson et al., 1999; Lam et al., 2002). Eine Funktion dieser Proteine im Transport von Substraten konnte bislang aber noch nicht gezeigt werden. RAD23 und DSK2 verfügen über eine sogenannte UBL Domäne (*ubiquitin-like domain*) im Bereich des N-Terminus, welche eine Interaktion mit dem Proteasom ermöglicht (Schauber et al., 1998; Kim et al., 2004). Ein weiteres Charakteristikum ist die UBA-Domäne (*ubiquitin associated domain*), ein Modul zur Interaktion mit Ubiquitin-Konjugaten (Hofmann and Bucher, 1996; Wilkinson et al., 2001). Das Protein RPN10 ist Bestandteil des Proteasoms und wahrscheinlich an der Schnittstelle zwischen *base* und *lid* lokalisiert (Abb.1.4) (Glickman et al., 1998; Hartmann-Petersen et al., 2001). RPN10 ist in geringen Mengen als löslicher Rezeptor im Cytosol vorhanden und bindet über die UIM-Domäne (*ubiquitin-interaction-motif*) an Ubiquitin-Konjugate (Fu et al., 1999; van Nocker et al., 1996; Verma et al., 2004). Eine Deletion von RPN10 ist in *S. cerevisiae* nicht lethal, sodass RPN10 nicht der primäre Rezeptor für ubiquityliertes Substrat ist (van Nocker et al., 1996; Lam et al., 2002). Wie die Substrat-Rezeptoren RPN10, RAD23 und DSK2 allerdings mit den Proteinen der Multiubiquitylierungsmaschinerie kommunizieren, ist bislang unbekannt. Die nachfolgende Substratbindung am Proteasom findet vermutlich über Leucinreiche Proteinbindungsdomänen (*leucine-rich repeats*) der Proteine RPN1 und RPN2 sowie über die sechs ATPasen des 19S

Partikels statt (Gottesman et al., 1997). Die gebundenen Substrate werden schliesslich ubiquityliert und entfaltet bevor sie im katalytischen Partikel abgebaut werden (Weissman, 2001). Die Proteolyse durch das Proteasom ist streng ATP-abhängig (DeMartino et al., 1994; Glickman et al., 1998; Hershko et al., 1984). In Analogie zu molekularen Motoren oder Chaperonen verursachen die energiegetriebenen Konformationsänderungen der ATPasen wahrscheinlich ein Öffnen bzw. Schliessen des aus  $\alpha$ -Untereinheiten bestehenden Kanals, Entfalten des Substrates und die Translokation des entfalteten Substrates in das Lumen des katalytischen Partikels (Amos et al., 1997). Die Protein-Substrate werden dort in Peptide gespalten, die in ihrer Länge zwischen 3 bis 23 Aminosäuren liegen (Kisselev et al., 1999; Nussbaum et al., 1998).

Neben dem vollständigen Abbau ist das Proteasom auch an der Prozessierung von Proteinen beteiligt. Dieser Vorgang wurde für den heterodimeren Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beschrieben, dessen eine Unter-einheit als inaktives Vorläuferprotein (p105) synthetisiert wird (Fan and Maniatis, 1991; Palombella et al., 1994). Das NF- $\kappa$ B p105 Protein wird in einer Ubiquitin-abhängigen Reaktion durch das Proteasom zu einer 50 kDa-Form prozessiert (Lin et al., 1996). Ein vollständiger Abbau des p105 Vorläuferproteins durch das Proteasom wird dabei durch eine N-terminale, hochstabile *Rel homology domain* verhindert (Lin and Kobayashi, 2003). Ein limitierter Proteasom-abhängiger Abbau wurde zudem in *S. cerevisiae* für die Transkriptionsfaktoren SPT23 und MGA2 beobachtet (Hoppe et al., 2000; Rape et al., 2001; Shcherbik et al., 2003). Diese Proteine werden ebenfalls als Vorläuferproteine synthetisiert und in die Phospholipidmembran eingebettet. Sie verfügen über sogenannte IPT Dömanen, die auch als Strukturmerkmal in der *Rel homology domain* von NF- $\kappa$ B vorliegen. Die proteasomale Prozessierung von SPT23 erfolgt nach der Ubiquitylierung der Vorläuferproteine, die durch die HECT-E3-Ligase RSP5 katalysiert wird (Hoppe et al., 2000). MGA2 hingegen scheint in einem RSP5-unabhängigen Mechanismus prozessiert zu werden (Shcherbik et al., 2003).

## 1.6 Physiologische Funktionen von CDC48/p97

AAA-Proteine sind kooperativ wirkende ATPasen, die oligomere Strukturen ausbilden (Hanson et al., 1997). Eines der meist studierten Vertreter dieser Enzymklasse ist das Hexamer CDC48 bzw. dessen Säugerhomologes p97. CDC48 ist durch eine N-terminale Proteinbindungsdomäne und zwei Kopien einer AAA-Domäne gekennzeichnet (Walker et al., 1982; Bruderer et al., 2004; Dreveny et al., 2004) und spielt in vielen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle (Abb.1.5). CDC48/p97 ist in bestimmte Membranfusionsvorgänge involviert und übernimmt eine Rolle ähnlich der AAA-ATPase NSF (*N-Ethylmalmeide-sensitive fusion protein*) (Rothman, 1994; Söllner et al., 1993). Dazu zählen Fusionsvorgänge des endoplasmatischen Retikulums (*homotypic membrane fusion*) und der Wiederaufbau des Golgi-Komplexes nach der Zellteilung (Latterich et al., 1995; Rabouille et al., 1998). Während der Golgi-Membran-Fusion wirkt der zusätzliche Faktor SHP1/p47, der an der N-terminalen Domäne von CDC48/p97 bindet und die ATPase Aktivität moduliert (Kondo et al., 1997; Meyer et al., 1998). Dadurch scheint die Bindung von CDC48/p97 zum t-SNARE Syntaxin5 hergestellt zu werden. Das Aufbrechen dieser cis-SNARE Komplexe durch CDC48/p97 ermöglicht schliesslich die Fusion mit einem spezifischen v-SNARE-Molekül und damit die Membranfusion (Patel et al., 1998; Rabouille et al., 1998). Zudem wird die Wiederherstellung der Kernmembran nach der Mitose durch p97 reguliert, wobei sowohl p47 als auch der heterodimerre Kofaktor UFD1/NPL4 eine Rolle spielen (Hetzer et al., 2001). Ausserdem scheint der Komplex aus CDC48 und UFD1/NPL4 den Abbau der Kernspindel nach der Mitose zu regulieren (Cao et al., 2003). Eine entscheidende Rolle spielt CDC48/p97 in der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse. Zusammen mit dem heterodimeren Kofaktor UFD1/NPL4 bewirkt CDC48 die Mobilisierung und Segregation des prozessierten und ubiquitylierten Transkriptionsfaktors p90 (Rape et al., 2001). In ähnlicher Weise konnte p97 mit der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse des Inhibitors I $\kappa$ B in Verbindung gebracht werden (Dai et al., 1998).



**Abbildung 1.5: Funktionen von CDC48**

Die AAA-ATPase CDC48 spielt in unterschiedlichen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle. Mittels des Kofaktors SHP1 ist CDC48 an Vorgängen der homotypischen Membranfusion beteiligt. Über die Kofaktoren UBX2, SHP1 und UFD1/NPL4 wirkt CDC48 in Prozessen der Ubiquitin-abhängigen Protein-Degradation. Der heterodimere Kofaktor UFD1/NPL4 dient zudem der Mobilisierung und Segregation des ubiquitylierten Transkriptionsfaktors SPT23 und ist für ERAD essentiell. Die physiologische Relevanz der Interaktion mit UFD2 und UFD3 ist noch unbekannt.

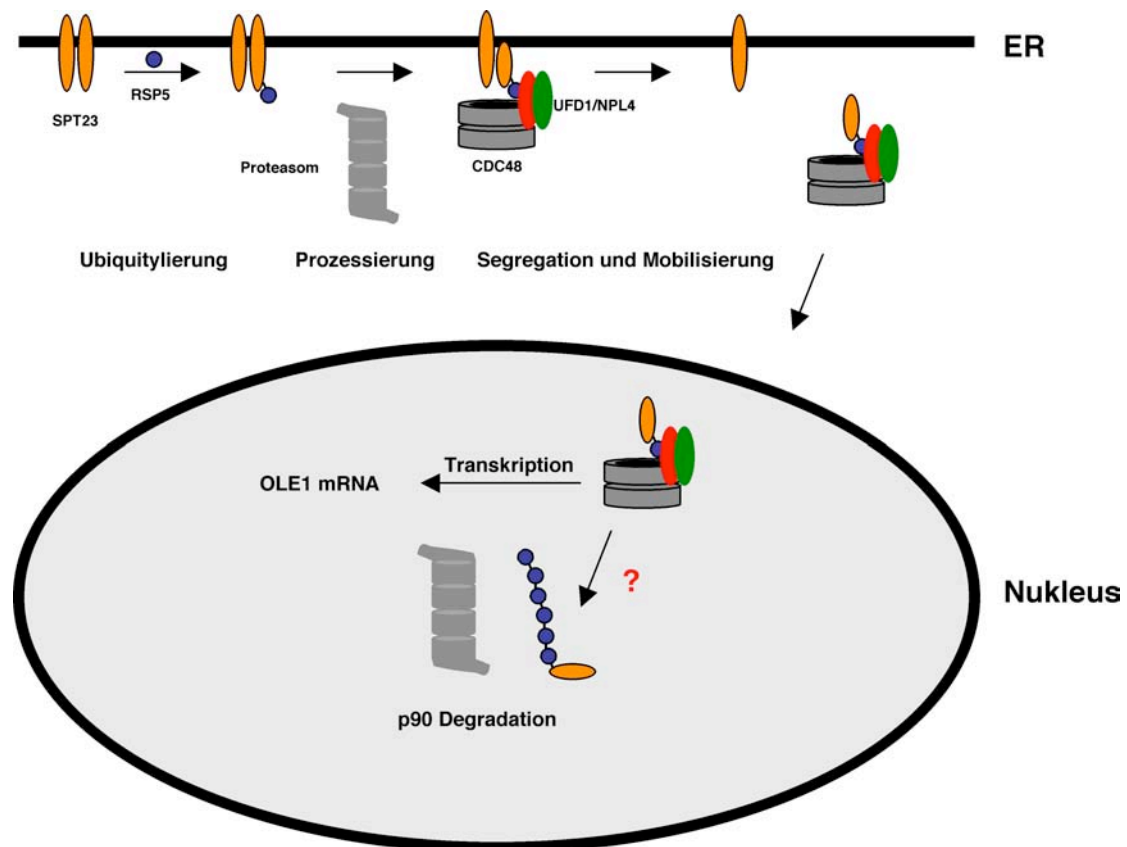
Ein weitere wesentliche Aufgabe des CDC48<sup>UFD1NPL4</sup> Komplexes ist die Teilnahme an ERAD-Prozessen (*ER associated degradation*). ERAD ist für den Abbau integraler und lumenaler Proteine verantwortlich und spielt eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle, wodurch missgefaltete oder nicht funktionsfähige Proteine spezifisch abgebaut werden können (Sommer and Wolf, 1997). Daneben übernimmt dieser Abbauweg auch regulative Aufgaben über welche die Aktivität von ER-ständigen Enzymen moduliert wird (Braun et al, 2002). Die abzubauenen Proteine werden zunächst durch den SEC61 Kanal an die Oberfläche der cytosolischen Membranseite transportiert, um

dort spezifisch ubiquityliert zu werden (Tsai et al., 2002; Pilon et al., 1997; Wilkinson et al., 2000; Zhou et al., 1999). Die Ubiquitylierung erfolgt zumeist durch das membranständige UBC6 bzw. UBC7, welches mit dem HRD1/HRD3 E3-Ligase Komplex kooperiert (Bays et al., 2001). Die Ubiquitylierung von ERAD-Substraten könnte möglicherweise als Erkennungssignal für das Ubiquitin-selektive Chaperon CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> dienen und eine Lösung des Substrates aus der Membran und schliesslich den proteasomalen Abbau ermöglichen (Rape et al., 2001; Bays et al., 2001; Braun et al., 2002; Rabinovich et al., 2002; Ye et al., 2001; Ye et al., 2003). Die Funktion von CDC48/p97 in proteasomalen Abbauwegen scheint zudem mit der Klasse der UBX-Domänen (*ubiquitin regulatory X*) in Zusammenhang zu stehen (Schuberth et al., 2004; Decottignies et al.; 2004). Weitere Interaktoren von CDC48 wurden in einem *screen* mit einer artifiziellen N-terminalen Ubiquitininfusionen gefunden. Dazu zählen neben UFD1 die UFD-Proteine UFD2 und UFD3 (Koepl et al., 1999; Gishlain et al., 1996). Die physiologische Relevanz der Interaktion dieser Proteine mit CDC48 ist allerdings noch unklar.

Die Aktivitäten von CDC48 in unterschiedlichen zellulären Prozessen können möglicherweise durch die strukturellen Veränderungen während der ATP-Hydrolyse erklärt werden. Die beiden ATPase-Domänen jeder Untereinheit liegen gestapelt vor, sodass eine ringförmige Struktur mit einem zentralen Kanal entsteht (Huyton et al., 2003). In Abhängigkeit des ATPase-Zyklus wird die Konformation des Homohexamers umstrukturiert. Die energiereiche Hydrolyse von ATP wird in bestimmte mechanische Bewegungen transformiert, die eine Rotation der AAA-Domänen zueinander, ein Öffnen oder Schliessen des zentralen Kanals und eine Veränderung der Konformation der flexiblen N-Domäne bewirken (Rouiller et al., 2000; Rouiller et al., 2002).

## 1.7 Die Regulation von OLE1 in *S. cerevisiae*

Ein wichtiger Regulationsweg bei dem das Ubiquitin-Proteasom-System und CDC48 beteiligt sind, ist die Kontrolle der Bereitstellung von ungesättigten Fettsäuren. Für die Funktion und die Integrität des Membransystems der Zelle ist die Fluidität der Membran von grosser Signifikanz. Die Mobilität integraler Membranproteine, die korrekte Ausbildung der Membranstrukturen von Organellen und der Kernmembran werden entscheidend durch das Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren bestimmt. Die Menge an ungesättigten Fettsäuren wird durch sogenannte Fettsäuresaturasen bestimmt, die spezifisch Doppelbindungen in gesättigte Fettsäuren einführen. In der Hefe kodiert das essentielle *OLE1* Gen für eine  $\Delta 9$ -Fettsäuresaturase (Stukey et al., 1989). Die Konzentration des OLE1 Proteins wird in *S. cerevisiae* durch die Proteine SPT23 und MGA2 reguliert (Zhang et al., 1999) (Abb.1.6). Der Transkriptionsfaktor SPT23 wird als inaktives p120 Vorläuferprotein synthetisiert und in der Membran des ER verankert. Nach Dimersierung wird SPT23 durch die HECT-E3-Ligase RSP5 ubiquityliert und anschliessend proteasomal prozessiert. Dadurch entsteht ein lösliches Fragment (p90), welches jedoch mit dem nicht prozessierten Partnermolekül (p120) verbunden bleibt (Hoppe et al., 2000). Die Segregation und Mobilisierung der ubiquitylierten p90-Form erfolgt in einer ATP-abhängigen Reaktion durch den CDC48<sup>UFD1NPL4</sup> Komplex (Rape et al., 2001). Im Zellkern bewirkt p90 schliesslich die Transkription des essentiellen *OLE1* Gens. Eine Ebene der Regulation von OLE1 entspricht einem negativen *feedback loop*. Das von OLE1 katalysierte Reaktionsprodukt Palmitoleinsäure (16:1) inhibiert die Prozessierung des p120 Vorläuferproteins und verhindert damit eine weitere Transkription des *OLE1* Gens. Weiterhin zeigen die ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (18:2) und  $\alpha$ -Linolensäure (18:3) den gleichen Effekt auf die Prozessierung (Hoppe et al., 2000). OLE1 ist zudem ein kurzlebige Protein, welches nach Wirken des CDC48<sup>UFD1NPL4</sup> Komplexes durch ER assoziierte Degradation (ERAD) abgebaut wird (Braun et al., 2002).



**Abbildung 1.6: Prozessierung und Mobilisierung des Transkriptionsfaktors SPT23.**

SPT23 wird als p120 Vorläuferprotein synthetisiert und in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert. Nach Dimerisierung und anschließender Ubiquitylierung durch die E3-Ligase RSP5 wird eines der Proteinmoleküle proteasomal prozessiert. Das entstandene p90 Fragment wird durch die Aktivität des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes vom p120 Partnerprotein segregiert und ins Cytoplasma mobilisiert. Nach Transport in den Zellkern wirkt p90 als Transaktivator der OLE1 Transkription. Die Degradation von p90 findet vermutlich ebenfalls im Zellkern statt.

Aufgrund dieser Kontrollmechanismen vermag die Zelle die Menge an OLE1-Protein gezielt steuern und sich so auf die gegebenen Umweltbedingungen einstellen zu können. Die Degradation von SPT23 ist allerdings noch nicht verstanden. Man kann aber mutmassen, dass der Transkriptionsfaktor nach dem Prozess der Transaktivierung vermutlich im Zellkern proteasomal abgebaut wird.



## Zielsetzung der Arbeit

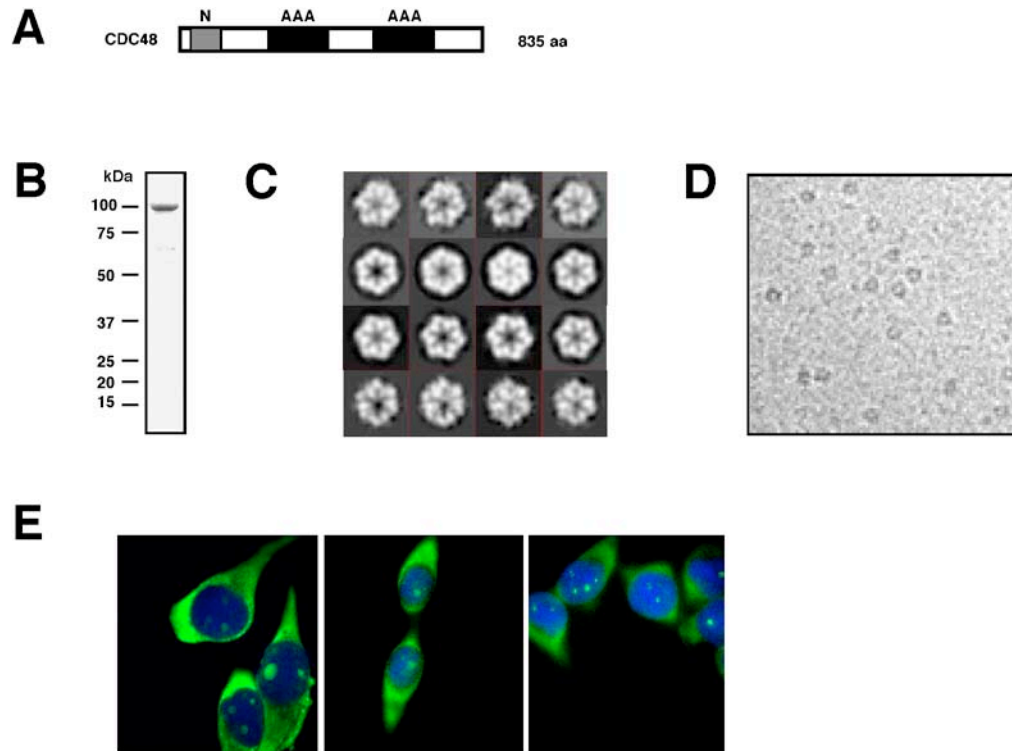
Die AAA-ATPase CDC48 ist eine essentielle Komponente des proteasomalen Abbaus in *S. cerevisiae*. Neben der beschriebenen Segregase- und Mobilisierungsfunktion für den Transkriptionsfaktor SPT23 und membranständige Proteine (ERAD), bindet CDC48 an den Multiubiquitylierungsfaktor UFD2. Die starke Interaktion dieser Proteine legt eine Kooperation beider Proteine in Ubiquitylierungsprozessen nahe. In dieser Arbeit sollte die physiologische Bedeutung dieser Wechselwirkung untersucht werden und damit ein Erklärungsansatz für die Funktion von CDC48 im proteasomalen Abbau gefunden werden. Ein weiterer Schwerpunkt sollte die durch Ubiquitin-bindende Proteine vermittelte Substratübertragung zum Proteasom sein. Dazu wurde gezielt nach Faktoren gesucht, die mit UFD2 interagieren und Protein-Substrate nach UFD2-abhängiger Multiubiquitylierung binden. Schliesslich sollte der Einfluss dieser Faktoren im Abbau des Transkriptionsfaktors SPT23 und im ERAD-Prozess analysiert werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Aufreinigung und Charakterisierung der AAA-ATPase CDC48

Das Homohexamer CDC48/p97 ist durch zwei AAA-ATPase-Domänen und eine N-terminale Domäne gekennzeichnet (Abb.2.1A) und eine wesentliche Komponente des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Um biochemische und strukturelle Studien mit CDC48 durchführen zu können, wurde das Protein in *E. coli* als Fusion mit einem His-Epitop überexprimiert und in zwei sequentiellen Schritten bestehend aus einer Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose und einer anschließenden Gelfiltration über eine Superose 6-Säule aufgereinigt. Der Proteinkomplex eluierte in einem einzelnen Peak bei einem Molekulargewicht von etwa 600kDa, was auf eine vollständige Hexamerisierung schließen lässt. Zur strukturellen Charakterisierung wurde das aufgereinigte, homogene Protein (Abb. 2.1B) in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von W. Baumeister (Max Planck Institut für Biochemie) untersucht. Es wurden elektronen-mikroskopische Aufnahmen der Proteinpartikel nach Negativ-Staining (Abb. 2.1C) oder, nach Einbettung der Proteinpartikel in Eis, elektron-kryo-mikroskopische Aufnahmen erhalten (Abb. 2.1D). Die hexamere Struktur bzw. sechsfache Symmetrie des Proteinkomplexes konnte veranschaulicht werden, in guter Übereinstimmung mit den publizierten Daten der Strukturen von p97 und VAT, dem CDC48 Homologen aus *Thermoplasma acidophilum* (Huyton et al., 2003; Rouiller et al., 2002; Rockel et al., 1999). Der Durchmesser des Hexamers wurde auf 13,8 nm bestimmt und im Negativ-Staining konnte die Separation der sechs Protomere durch radiale Vertiefungen demonstriert werden. Die starke Anfärbung des Zentrums deutet auf die Existenz eines zentralen Kanals hin, was ebenfalls in Einklang mit den strukturellen Daten des VAT-Komplexes bzw. p97 ist (Rockel et al., 1999; Rouiller et al., 2002). Die Übersicht verschiedener Aufnahmen des Proteinkomplexes (Abb. 2.1.C) zeigt Schnitte aus unterschiedlichen Ebenen des Hexamers und liefert somit eine grobe

Annäherung der dreidimensionalen Struktur. Die Funktionalität des Proteinkomplexes wurde durch kolorimetrische ATPase-Assays bestätigt (Daten nicht gezeigt).



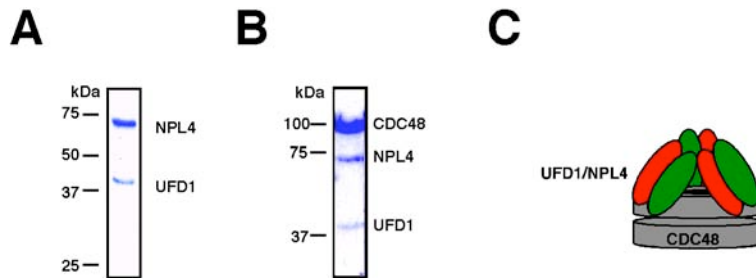
**Abbildung 2.1: Aufreinigung und Charakterisierung der AAA-ATPase CDC48.**

(A) CDC48 ist gekennzeichnet durch eine N-terminale Bindungs-Domäne und zwei AAA-ATPase Domänen. (B) Aufreinigung von rekombinantem CDC48 nach Expression in *E. coli*. Nach Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration wurde das aufgereinigte Protein elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme des CDC48 Hexamers nach Negativ-Staining. Die einzelnen Protomere des Komplexes sowie ein zentraler Kanal können veranschaulicht werden. Der Durchmesser des CDC48-Komplexes wurde auf 13,8 nm bestimmt. (D) Strukturelle Darstellung des Hexamers in elektron-kryo-mikroskopischen Aufnahmen. Nach Einbettung in Eis wurden die Komplexe elektronenmikroskopisch untersucht. Die ringförmige Struktur des Komplexes konnte abermals verdeutlicht werden. (E) Lokalisierung von p97 in HeLa Zellen. Ein Konstrukt zur Expression von <sup>FLAG</sup>p97 wurde stabil in HeLa Zellen transformiert und mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Die Zellkerne sind durch DAPI (blau) angefärbt. p97 (grün) wurde mit Hilfe des Flag-Epitops durch indirekte Immunfluoreszenz sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern detektiert.

Zur Lokalisierung der AAA-ATPase wurden Immunofluoreszenz Studien durchgeführt (Abb 2.1E). Dazu wurde ein FLAG markiertes p97-Konstrukt stabil in HeLa Zellen exprimiert. Nach Fixierung und Inkubation mit primären und Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. p97 ist überwiegend im Cytoplasma lokalisiert, kommt aber auch im Zellkern in Form von granulären Partikeln vor. Von CDC48 ist eine vergleichbar nukleäre Lokalisierung in Abhängigkeit von der Phosphorylierung eines C-terminalen Tyrosins bekannt (Madeo et al., 1998).

## 2.2 Darstellung des rekombinanten CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex

Der Komplex aus p97 und den Kofaktoren UFD1/NPL4 wurde erstmals in Säugerzellen identifiziert und nachfolgend als Komponente in diversen physiologischen Prozessen gefunden (Meyer et al., 2000). Um funktionelle Studien durchführen zu können, wurden die Kofaktoren von CDC48 ebenfalls rekombinant aufgereinigt. Dazu wurde eine GST-Fusion von UFD1 und HIS<sub>6</sub>-markiertes NPL4 in *E. coli* koexprimiert und über zwei sequentielle Affinitätschromatographieschritte, zunächst mit Ni-NTA Agarose und anschliessend mit Glutathione-Sepharose, aufgereinigt. Für einige Anwendungen wurde der GST-Teil von UFD1 durch Thrombin abgeschnitten (Abb. 2.2A). Nach Zugabe von rekombinantem CDC48 zum gereinigtem UFD1/NPL4 Heterodimer konnte der vollständige CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex erhalten werden. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurde das Proteingemisch einer Gelfiltration unterzogen. Das Material eluierte in einem scharfen Peak bei etwa 1000 kDa und zeigte eine eindeutige Interaktion von CDC48 und dem heterodimeren Kofaktor (Abb. 2.2B). Der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex bildet wahrscheinlich eine Struktur aus einem hexameren CDC48, welches mit drei heterodimeren UFD1/NPL4 Molekülen interagiert (Abb. 2.2C). Eine strukturelle Charakterisierung des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes war nicht möglich, da unter den Fixierungsbedingungen der Elektronenmikroskopie die Komplexe nicht intakt blieben.



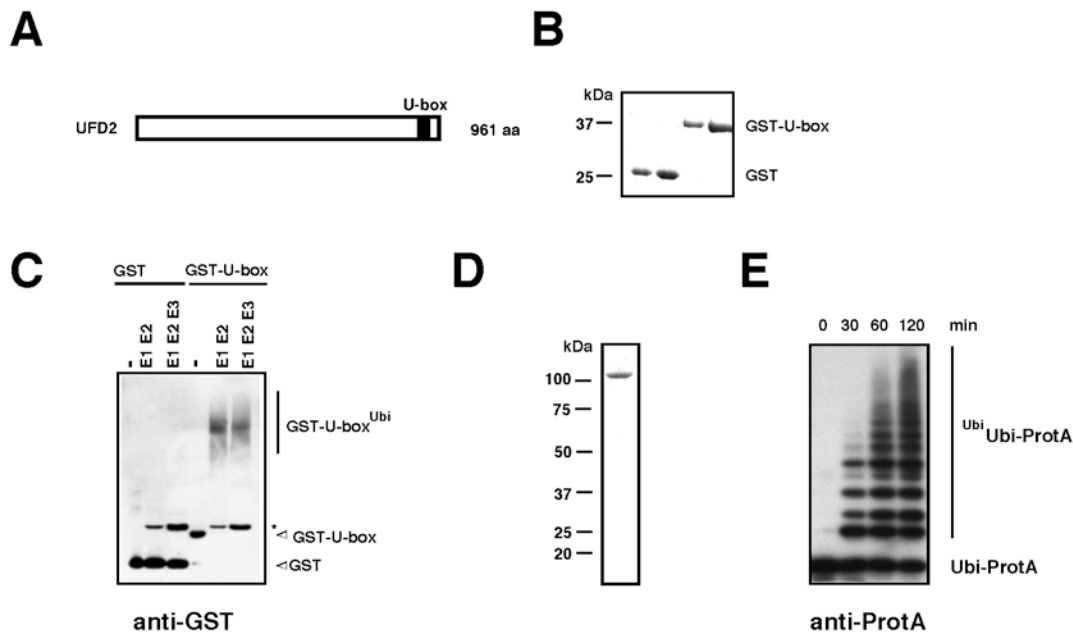
**Abbildung 2.2: Aufreinigung des rekombinanten CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes.**

(A) Der UFD1/NPL4 Komplex wurde durch eine zweifache Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose und Glutathione-Sepharose aufgereinigt. Der GST-Teil von UFD1 wurde durch Thrombin abgeschnitten, und die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. (B) Der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex wurde durch Inkubation des UFD1/NPL4 Komplexes (A) mit CDC48 hergestellt. Nach einer Gelfiltration wurde ein Aliquot des Eluats durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. (C) Hypothetisches Modell für den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex.

### 2.3 Charakterisierung des E4-Enzyms UFD2

UFD2 wurde in einem *screen* zur Identifizierung von Mutanten gefunden, welche das kurzlebige Ubiquitin-Fusionsprotein Ubi-Pro- $\beta$ Galactosidase (Ubi-Pro $\beta$ Gal) stabilisieren (Johnson et al., 1995). Es ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 110kD und durch eine konservierte Domäne gekennzeichnet, die sogenannte U-Box, welche den C-Terminus des Proteins umfasst (Abb. 2.3A). Die U-Box ist den RING-Fingern von bestimmten E3-Ubiquitin-Ligasen strukturell ähnlich (Aravind and Koonin, 2000; Ohi et al., 2003) und es wurde angenommen, dass die Aktivität des E4-Enzyms auf die Präsenz der U-Box zurückzuführen ist. Es konnte demonstriert werden, dass die U-Box von UFD2 die für die RING-Finger Proteine typische Autoubiquitylierung zeigt. Experimentell wurde dieses mit einem *in vitro* Ubiquitylierungsassay nachgewiesen. Dazu wurden sowohl GST und eine Fusion aus GST und U-Box in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (Abb. 2.3B) und einer Ubiquitylierungsreaktion unterzogen (Abb. 2.3C). Die beiden Proteine wurden mit E1-, E2- und optional E3-Enzymen aus Extrakten in Gegenwart von ATP und Ubiquitin inkubiert. Die benutzten Extrakte wurden

aus Baculovirus-infizierten SF9-Zellen erhalten, welche die entsprechenden Enzyme stark überexprimierten.



**Abbildung 2.3: Charakterisierung des E4-Enzyms UFD2.**

(A) Schematische Darstellung von UFD2. Das E4-Enzym UFD2 ist nur über eine Domäne, die sogenannte U-Box, gekennzeichnet. (B) Aufreinigung des GST-U-Box Proteins. GST und GST-U-Box wurden in *E. coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Beide Proteine (jeweils 1 und 2  $\mu$ g) wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. (C) Die U-Box wird autoubiquityliert. GST und GST-U-Box wurden mit E1- und E2- bzw. mit E1-, E2- und E3-Enzymen in einem Ubiquitylierungsassay inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden in anti-GST Immunoblots untersucht. Die U-Box wurde spezifisch und vollständig ubiquityliert. Der Asterisk kennzeichnet ein kreuzreaktives Protein. (D) Rekombinantes UFD2. Nach Aufreinigung wurde das Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. (E) Aktivität von rekombinantem UFD2 im Ubiquitylierungsassay. Das Substrat Ubiquitin-ProteinA wurde mit rekombinantem UFD2 und E1-, E2- und E3-Extrakten aus den entsprechenden Bacculo-infizierten SF9-Zellen in einem *in vitro* Experiment ubiquityliert (Koegl et al., 1999). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus den Reaktionsansätzen entnommen und in einem Westernblot gegen ProteinA analysiert.

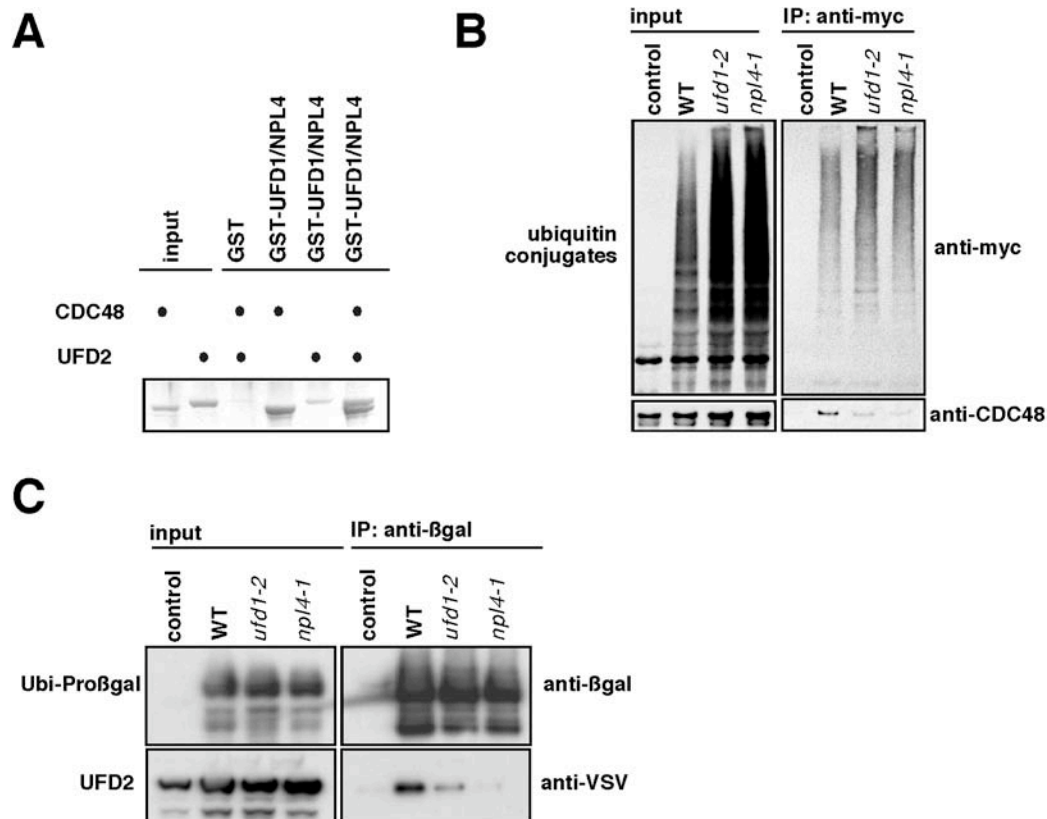
Es konnte gezeigt werden, dass die U-Box im Gegensatz zum Kontrollprotein GST spezifisch ubiquityliert wird. Die Ubiquitylierungsreaktion war vollständig unabhängig von Ubiquitin Ligasen (E3), d.h. sie fand bereits in Gegenwart von E1- und E2-Enzymen statt. Zur weiteren Funktionsanalyse wurde UFD2

in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abb. 2.3D). Das homogen aufgereinigte Protein wurde schliesslich in einer *in vitro* Ubiquitylierungsreaktion auf Funktionalität getestet. Dazu wurde das UFD-Substrat Ubiquitin-ProteinA mit Baculovirus-infizierten SF9-Zell Extrakten, die E1-, E2- und E3-Enzyme stark überexprimierten, und aufgereinigtem UFD2 in Gegenwart von ATP und Ubiquitin inkubiert (Abb. 2.3E). Dabei konnte eine Zunahme der Ubiquitylierung in Abhängigkeit der Reaktionszeit beobachtet werden und damit die Aktivität des aufgereinigten Proteins nachgewiesen werden.

#### 2.4. CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> wirkt bei der Substratbeladung von UFD2

Die Interaktion von UFD2 und CDC48 *in vitro* und *in vivo* gab Anlass zu der Vermutung, dass CDC48 möglicherweise an der Substratbeladung von UFD2 mitwirkt. Da CDC48 eng mit den Kofaktoren UFD1/NPL4 zusammenarbeitet, sollte der Zusammenhang zwischen UFD2 und dem CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex untersucht werden. Das präferenzielle Binden oligo-ubiquitylierter Substrate, sowohl durch UFD2 als auch durch den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex (Koegl et al., 1999; Rape et al., 2001) deutete auf eine enge Kooperation dieser Faktoren hin. In Bindungsstudien sollte zunächst überprüft werden, ob der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex mit UFD2 interagieren kann. Dazu wurden GST und eine GST-Fusion von UFD1 im Komplex mit NPL4 mit rekombinantem CDC48, UFD2 oder beiden Proteinen inkubiert (Abb. 2.4A). Der UFD1/NPL4 Komplex interagierte spezifisch mit CDC48, eine direkte Interaktion mit UFD2 war hingegen sehr schwach. Allerdings wurde eine über CDC48 vermittelte Interaktion zwischen UFD1/NPL4 und UFD2 beobachtet. In Immunpräzipitations-Experimenten in Zusammenarbeit mit Michael Rape konnte desweiteren gezeigt werden, dass CDC48 nur in Abhängigkeit des Kofaktors UFD1/NPL4 mit Ubiquitin-Konjugaten interagiert (Abb. 2.4B). Damit konnte verdeutlicht werden, dass CDC48 Ubiquitin-Konjugate über den Faktor UFD1/NPL4 rekrutiert. Schliesslich stellte sich die Frage, inwiefern die Substrat-Beladung des E4-Enzyms UFD2 von der Aktivität des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup>

Komplexes abhängt. Dazu wurden Experimente durchgeführt, in welchen vsv-markiertes UFD2 und Ubi-Pro $\beta$ gal (vergl.2.3) *in vivo* koexprimiert wurden.



**Abbildung 2.4: CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> wirkt bei der Substratbeladung von UFD2**

(A) Der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> interagiert mit UFD2. Äquimolare Mengen an GST oder GST Fusionen von UFD1 im Komplex mit NPL4, wurden an Glutathione-Sepharose gebunden und mit rekombinantem CDC48, UFD2 oder beiden Proteinen inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Der Input zeigt 6% des eingesetzten UFD2 und 3% des eingesetzten CDC48 Proteins. (B) Die Interaktion von CDC48 und ubiquitylierten Proteinen ist in *ufd1-2* und *npl4-1* Mutanten reduziert. WT, *ufd1-2* und *npl4-1* Zellen, die myc-markiertes Ubiquitin exprimierten, wurden bei 37°C inkubiert und Ubiquitin-Konjugate mit anti-myc Antikörpern immunpräzipitiert. Copräzipitiertes CDC48 wurde mittels anti-CDC48 Antikörpern detektiert. Als Kontrolle (control) wurden Zellen eingesetzt, die unmarkiertes Ubiquitin exprimierten. (C) UFD2 bindet das Substrat Ubi-Pro $\beta$ gal in *ufd1-2* und *npl4-1* Mutanten mit geringerer Affinität. Ubi-Pro $\beta$ gal wurde aus Zell-Lysaten von WT, *ufd1-2* und *npl4-1* Mutanten immunpräzipitiert. Die Zellen wurden wie in (B) bei der restriktiven Temperatur (37°C) inkubiert und copräzipitiertes UFD2 wurde mittels anti-VSV Antikörpern im Immunoblot analysiert. Die Kontrolle (control) bezeichnet Zellen, die kein Ubi-Pro $\beta$ gal exprimieren.



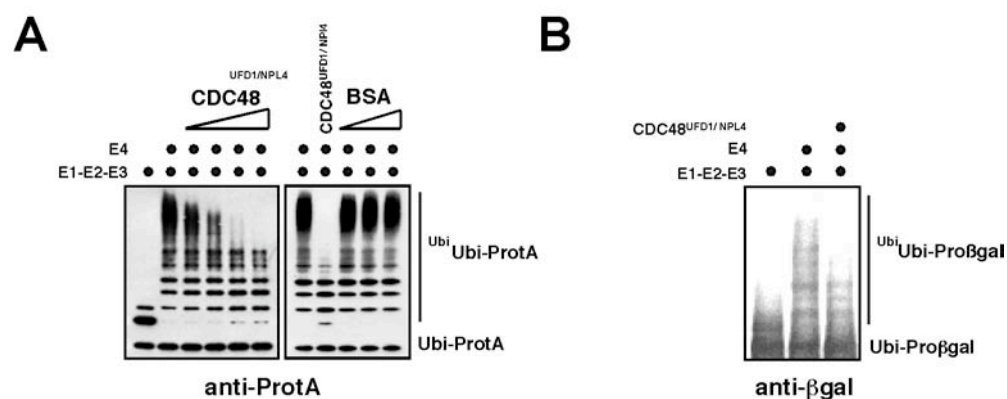
Immunpräzipitationen mit anti- $\beta$ -galactosidase Antikörpern zeigten eine starke Interaktion von UFD2 mit dem UFD-Substrat in WT Zellen (Abb 2.4C). In UFD1 und NPL4 Mutanten war diese Wechselwirkung jedoch stark reduziert und es konnte geschlussfolgert werden, dass der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex die Substratbeladung von UFD2 vermittelt.

Damit übernimmt der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex eine Aufgabe in der Rekrutierung und Übertragung von oligo-ubiquitylierten Substraten. CDC48 scheint die Faktoren UFD1/NPL4 und UFD2 über unterschiedliche Domänen zu binden und damit die Bildung eines ternären Komplexes zu bewirken. Die enge räumliche Anordnung der Proteine ermöglicht, dass UFD2 durch den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex mit Substrat beladen werden kann.

## 2.5. CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> bewirkt eine Limitierung der Kettenlänge während der Multiubiquitylierung

Im Folgenden stellte sich also die Frage, inwiefern dem CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex auch nach Übertragung des Substrates auf UFD2 eine Bedeutung während der Multiubiquitylierung zukommt. Aus diesem Grund wurde eine UFD2-katalysierte Ubiquitylierung in Gegenwart des rekombinant aufgereinigten Komplexes durchgeführt. In dem verwendeten Ubiquitylierungsassay wurden Ubiquitin-Fusionsproteine (Ubiquitin-ProteinA, Ubiquitin-Pro- $\beta$ Galactosidase) in Gegenwart von SF9 Zell-Extrakten, die jeweils E1, E2 oder E3 stark überexprimierten, Ubiquitin, rekombinantem UFD2 und einem ATP-Regenerationssystem inkubiert. Dabei liess sich beobachten, dass mit ansteigender Menge des zugegebenen CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes eine Limitierung der Kettenlänge bis zu einer Anzahl von etwa 3-6 Ubiquitinresten erfolgte (Abb. 2.5A, links). Eine weitere Limitierung der Ubiquitylierung wurde nicht beobachtet, d.h der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex verursachte nicht grundsätzlich eine Inhibierung der E4 Aktivität. Zudem war dieser Effekt hochspezifisch, da vergleichsweise höhere Konzentrationen an BSA keinen Effekt auf die Multiubiquitylierung hatten (Abb. 2.5A, rechts) und

andere Proteine, wie zum Beispiel UFD3 oder GST, ebensowenig zu einer Limitierung der Kettenlänge führten (Daten nicht gezeigt). Die Limitierung der Kettenlänge ist nicht Substrat-spezifisch, da der beobachtete Effekt auch bei anderen Substraten wie der Ubiquitin-Pro- $\beta$ Galactosidase (Abb. 2.5B) und Ubiquitin-GST auftrat (Richly et al., 2005). Die Reproduzierbarkeit der Kettenlimitierung durch den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex für unterschiedliche Ubiquitin-Fusionenproteine deutet auf einen konservierten Mechanismus zur Einschränkung der Ubiquitylierungsreaktion hin.

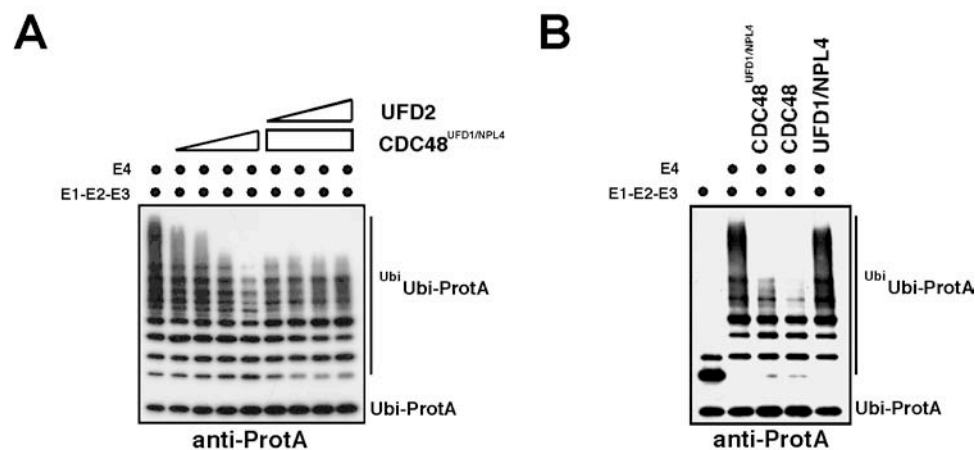


**Abbildung 2.5: CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> bewirkt eine Limitierung der Kettenlänge während der Multiubiquitylierung.**

(A) links: Es wurden *in vitro* Ubiquitylierungsreaktionen mit E1, E2 und E3 (Spur 1) oder mit denselben Enzymen in Gegenwart von E4 (0.25 $\mu$ M) (Spur 2) durchgeführt. Ansteigende Mengen an CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> wurden den Reaktionen zugegeben in einem molaren Verhältnis von 1:1, 2:1, 4:1 und 8:1 des Komplexes gegenüber dem Substrat (0.125 $\mu$ M) (Spuren 3-6). Rechts: Ein vergleichbares Experiment wurde durchgeführt einerseits in Gegenwart des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes (Spur 2; 8:1 Verhältnis zum Substrat) oder BSA (8:1, 40:1, 80:1 gegenüber dem Substrat). Die Reaktionsprodukte wurden in anti-ProteinA Immunoblots analysiert. (B) Ähnlich wie in (A). Das Substrat Ubi-Pro $\beta$ gal wurde in Ubiquitylierungsreaktionen in Gegenwart des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes untersucht. Der CDC48 Komplex wurde ebenfalls im Überschuss eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden in anti- $\beta$ Galaktosidase Immunoblots analysiert.

## 2.6 Die Limitierung der Kettenlänge wird spezifisch durch CDC48 hervorgerufen

Die Limitierung der Ubiquitinkettenlänge durch den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex war auf eine Anzahl von 3 bis 6 Ubiquitinresten begrenzt und stets wurden längere Ubiquitinketten beobachtet als in einer Reaktion ohne E4 (d.h. nur in Gegenwart von E1-, E2- und E3-Enzymen). Um den Mechanismus der Limitierung besser zu verstehen, wurde ein Experiment durchgeführt, bei welchem in einer Multiubiquitylierungsreaktion nach Zugabe von rekombinantem CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex anschliessend eine ansteigende Konzentration von UFD2 zugesetzt wurde (Abb. 2.6A).



**Abbildung 2.6: Die Limitierung der Kettenlänge wird spezifisch durch CDC48 bewirkt.**

(A) Ein Überschuss an UFD2 verhindert nicht die Limitierung der Kettenlänge. Die Ubiquitylierungsreaktionen wurden durchgeführt wie in Abb. 2.5A in Gegenwart ansteigender Mengen des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes bis zu einem 8 fachen molaren Überschuss über das Substrat mit konstanten Mengen an UFD2 (0.125µM) (Spuren 1-5). Anschliessend wurde die Konzentration von UFD2 schrittweise auf 3µM gesteigert (Spuren 6-9). Die Reaktionsprodukte wurden in anti-ProteinA Immunoblots analysiert. (B) Die Limitierung der Kettenlänge wird durch CDC48 hervorgerufen. Die Reaktionen wurden durchgeführt wie in Abb. 2.5A. Hexameres CDC48 (1µM) (Spur 4), UFD1/NPL4 Heterodimer (1µM) (Spur 5) oder beides (Spur 3) wurden den Reaktionsansätzen hinzugefügt. Dies entsprach einem 8 fachen molaren Überschuss über das Substrat (0.125µM). Die Reaktionsprodukte wurden in anti-ProteinA Immunoblots analysiert.

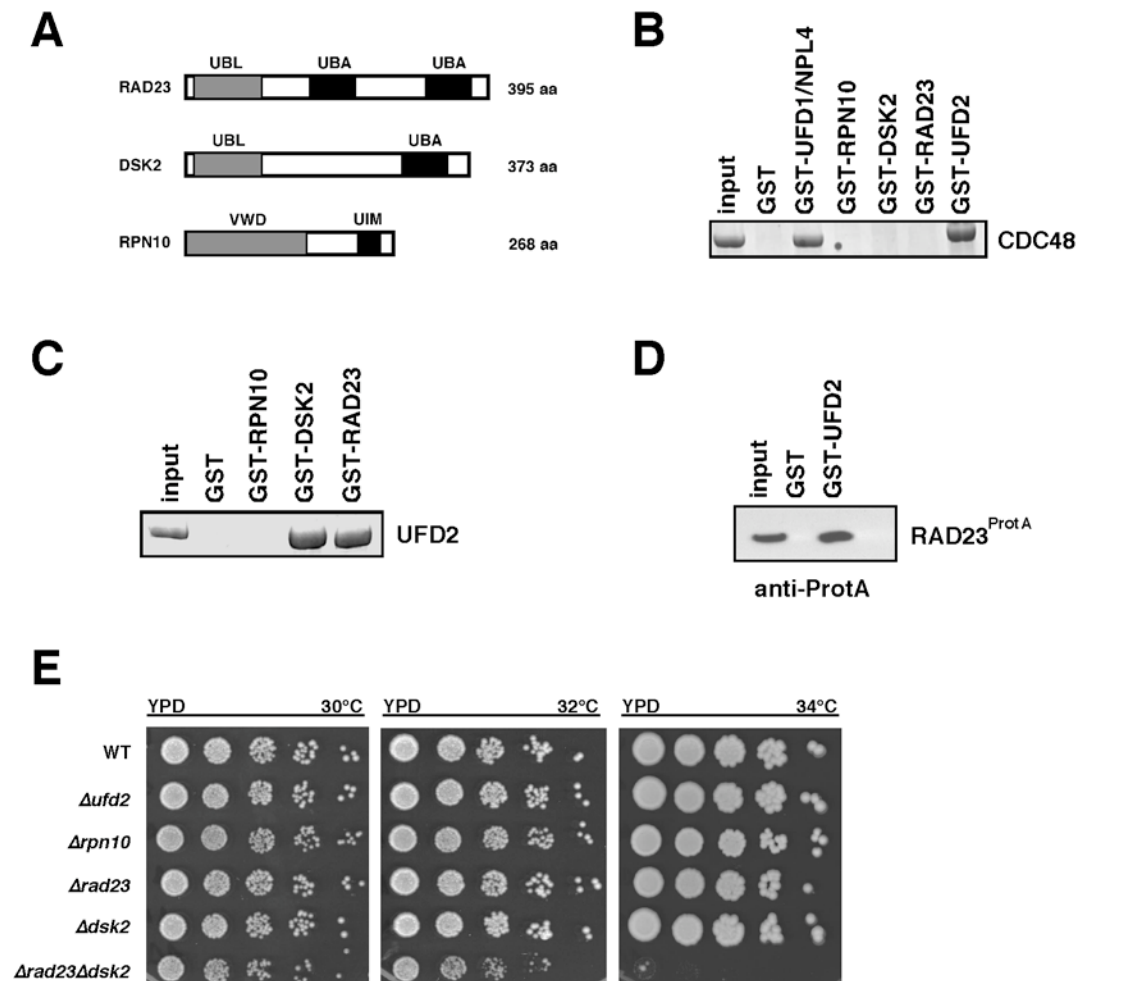
Bei gleichbleibender Konzentration von CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup>, einem molaren Verhältnis von 8:1 des Komplexes gegenüber dem Substrat, wurde in den Reaktionen nun die Konzentration an rekombinantem UFD2 schrittweise erhöht. Trotz ansteigender Konzentration von UFD2 konnte die CDC48 vermittelte Limitierung der Kettenlänge nicht aufgehoben werden, d.h. es wurde keine weitere Verlängerung der Ubiquitin-Ketten beobachtet. Damit konnten ein Titrationseffekt oder ein Inaktivierungsmechanismus ausgeschlossen werden. Die Limitierung der Ubiquitinkettenlänge liegt demnach einem anderen Mechanismus zu Grunde, der vielleicht mit der Affinität von Ubiquitinketten zu den Komponenten des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes begründet werden kann. Um einen detaillierten Einblick in die Limitierung der Kettenlänge zu erhalten, wurde untersucht, ob der gesamte CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex oder nur CDC48 bzw. der heterodimere Kofaktor UFD1/NPL4 die Limitierung verursacht. Dazu wurden Multiubiquitylierungsreaktionen in Gegenwart des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes oder aber nur CDC48 bzw. UFD1/NPL4 Komplex durchgeführt (Abb 2.6B). Es zeigte sich, dass CDC48 allein für den beschriebenen Effekt während der Multiubiquitylierung verantwortlich ist, nicht jedoch der Kofaktor UFD1/NPL4. Dies war insofern unerwartet, da auch das heterodimere UFD1/NPL4 ubiquitylierte Spezies bindet und, wie bereits gezeigt, als Substrat-Rekrutierungsfaktor für CDC48 dient.

Damit kommen CDC48 zwei wichtige Funktionen im Verbund mit UFD2 zu. Einerseits ist CDC48 mit Hilfe der Kofaktoren UFD1/NPL4 in die Substratübertragung auf UFD2 involviert, andererseits bewirkt CDC48 eine Limitierung der Multiubiquitin-Kettenlänge.

## 2.7 RAD23 und DSK2 interagieren mit UFD2

Um eine Verbindung der UFD2-katalysierten Ubiquitylierungsreaktion und dem Transport des Substrates zum Proteasom herzustellen, sollte nach einem Zusammenhang zwischen den Faktoren UFD2 bzw. CDC48 und

Substrat-Rezeptor Proteinen gesucht werden. Wie diese Rezeptoren aber mit den Proteinen der Multiubiquitylierungsmaschinerie kommunizieren, war bislang unbekannt. Um dieser Frage nachzugehen, sollten zunächst charakterisierte Substrat-Rezeptoren (Abb.2.7A) auf ihre Interaktion mit Komponenten der Multiubiquitylierung untersucht werden. Die enge Kooperation von UFD2 und CDC48 während der Multiubiquitylierung war Anlass Bindungsstudien durchzuführen, die Aufschluss über eine mögliche Interaktion der Multiubiquitin-Rezeptoren mit CDC48 bzw. UFD2 geben sollten. Es wurden GST-Pulldown Experimente mit rekombinanten Proteinen durchgeführt, um direkte Interaktionen nachweisen zu können. Dazu wurden GST und Fusionen aus GST mit UFD2, RPN10, RAD23, DSK2 sowie UFD1 zusammen mit <sup>His</sup>NPL4 in *E. coli* überexprimiert und durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Es wurden Präzipitations-Experimente durchgeführt, in welchen zunächst die GST-Fusions-Proteine an die Glutathione-Matrix gebunden und anschliessend mit rekombinanten Proteinen oder Zellextrakt inkubiert wurden. Aus diesen Versuchen resultierte, dass rekombinantes CDC48 mit dem UFD1/NPL4 Komplex und UFD2 (Abb. 2.7B), jedoch mit keinem der genannten Rezeptoren interagiert (Meyer et al., 2000; Koegl et al., 1999). CDC48 scheint also nicht direkt an den Prozess der Substrat-Weitergabe gekoppelt zu sein. Interessanterweise konnte eine Interaktion von rekombinant aufgereinigtem UFD2 mit den Ubiquitin-bindenden Rezeptoren RAD23 und DSK2 nachgewiesen werden. Das Protein RPN10 zeigt hingegen keine Affinität zu UFD2 (Abb.2.7C). UFD2 selbst scheint somit Multiubiquitylierung und den Transport durch die Rezeptor-Proteine RAD23 und DSK2 zu verknüpfen. In einem weiteren Experiment wurde die Interaktion zwischen UFD2 und RAD23 bestätigt, wobei eine Fusion aus GST und UFD2 zur Präzipitation von endogenem RAD23 aus Zellextrakt mit chromosomal markiertem RAD23 benutzt wurde (Abb. 2.7D). Die Bindungseigenschaften von RAD23 und DSK2 liessen vermuten, dass diese Rezeptoren in der Substratweitergabe zum 26S Proteasom redundant wirken können.



**Abbildung 2.7: DSK2 und RAD23 binden UFD2.**

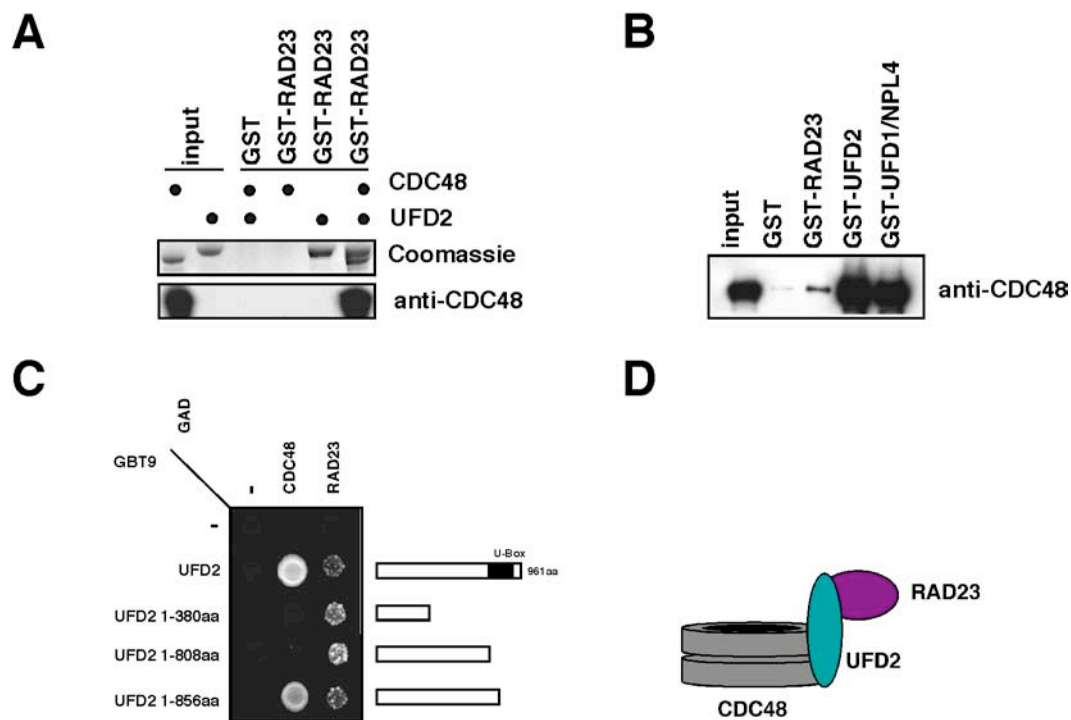
(A) Anordnung der UBA (*ubiquitin associated domain*) und UBL (*ubiquitin-like domain*) Domänen der Proteine RAD23 und DSK2. RPN10 verfügt über eine N-terminale VWD (*von Willebrand factor domain*) und eine C-terminale UIM (*ubiquitin interaction motif*) Domäne. (B) Äquimolare Mengen an GST oder GST-Fusionen von UFD1/NPL4, RPN10, DSK2, RAD23 und UFD2 wurden an Glutathione-Sepharose gebunden und mit rekombinantem CDC48 inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Der Input zeigt 15% des eingesetzten Proteins. (C) UFD2 bindet RAD23 und DSK2. Präzipitations-Experimente wie in (B) mit GST bzw. GST-Fusionen mit RPN10, DSK2 und RAD23 nach Inkubation mit rekombinantem UFD2. Der Input zeigt 15% des eingesetzten Proteins (D) UFD2 präzipitiert RAD23 aus Zellextrakten. GST und GST-UFD2 wurden mit Zell-Extrakten inkubiert, welche ProteinA-markiertes RAD23 exprimierten. Das Präzipitat wurde durch anti-ProteinA Immunoblots untersucht. Der Input zeigt 2% des eingesetzten Proteins. (E) Redundanz der Substratrezeptoren RAD23 und DSK2. Der Wildtypstamm und die jeweiligen Deletionsmutanten wurden in serieller Verdünnung auf YPD Medium getropft und bei 30°C, 32°C und 34 °C für 3 Tage inkubiert. Die  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  Doppelmutante ist bei 34°C nicht lebensfähig.

Diese Annahme stützt sich unter anderem auf die Temperatursensitivität der *Δrad23 Δdsk2* Doppelmutante (Abb. 2.7E). Der Wildtypstamm, *Δdsk2*, *Δrad23*, *Δufd2*, *Δrpn10* Deletionsmutanten sowie die *Δrad23 Δdsk2* Doppelmutante wurden in serieller Verdünnung auf YPD-Platten geträufelt und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Während die Einzelmutanten bei den getesteten Temperaturen keinen Unterschied zum Wildtyp zeigen, beobachtet man bei der *Δrad23 Δdsk2* Doppelmutante mit ansteigender Temperatur Wachstumsdefekte und schliesslich Lethalität bei 34°C. Damit scheinen die Proteine RAD23 und DSK2 nach der Multiubiquitylierung durch UFD2 für die Weitergabe des Substrates erforderlich zu sein und in ihrer Funktion zu überlappen. Man kann nun eine Klassifizierung der Substrat-Rezeptoren vornehmen und RAD23 und DSK2 UFD2-abhängigen Abbauwegen zuordnen. RPN10 ist wahrscheinlich Bestandteil von Abbauwegen, die ohne die Aktivität von UFD2 funktionieren.

## 2.8 Die Proteine CDC48, UFD2 und RAD23 bilden einen ternären Komplex

Die Interaktion von UFD2 und CDC48 findet vor und während der Multiubiquitylierung statt, die Bindung zwischen UFD2 und RAD23 in dem nachgeschalteten Prozess der Substratweitergabe. Es stellte sich nun die Frage, ob die beiden Prozesse konzertiert ablaufen oder ob CDC48 durch RAD23 verdrängt wird, beide Proteine also um gleiche Bindungsstellen auf UFD2 konkurrieren. Pulldown-Experimente mit rekombinanten Proteinen zeigten, dass CDC48 mit RAD23 nicht direkt interagiert, aber in Gegenwart von UFD2 mit dem Fusionsprotein GST-RAD23 präzipitiert (Abb. 2.8A). Damit konnte die Bildung eines ternären Komplexes demonstriert und ein direkter Übergang von Multiubiquitylierung zur Substratweitergabe in einem konzertierten Mechanismus postuliert werden. Die Verwendung aufgereinigter Proteine lässt ausserdem den Schluss zu, dass ubiquityliertes Substrat zur Stabilisierung der Interaktionen nicht benötigt wird. Die Bildung des ternären Komplexes wurde zudem in einem weiteren Experiment bestätigt (Abb. 2.8B).

Dazu wurde CDC48 aus Zellextrakten mit GST-Fusionsproteinen präzipitiert und mittels eines CDC48 Antikörpers im Immunoblot nachgewiesen.



**Abbildung 2.8: CDC48, UFD2 und RAD23 bilden einen ternären Komplex.**

(A) Bildung eines ternären Komplexes mit rekombinanten Proteinen. Präzipitations-Experimente mit äquimolaren Mengen an GST oder GST-RAD23 in Gegenwart oder Abwesenheit von rekombinatem CDC48 und UFD2 (wie dargestellt). Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und in Coomassie-Färbung bzw. in anti-CDC48 Immunoblots detektiert. Die Inputs zeigen 40% des eingesetzten UFD2 bzw. 7% des eingesetzten CDC48. (B) RAD23 assoziiert in Zellextrakten schwach mit CDC48. Äquimolare Mengen von GST bzw. Fusionen von GST und RAD23, UFD2 und UFD1 im Komplex mit NPL4 wurden an Glutathione-Sepharose immobilisiert. Nach Inkubation mit Zell-Extrakt (WT; DF5) wurden die gebundenen Proteine im SDS-PAGE aufgetrennt und in anti-CDC48 Immunoblots analysiert. Der Input zeigt 2% des eingesetzten Extraktes. (C) CDC48 und RAD23 Interaktionsdomänen von UFD2. *Two-hybrid*-Interaktionen von UFD2 oder C-terminalen Deletionskonstrukten von UFD2. Die UFD2 Konstrukte sind rechts schematisch gezeigt. (D) Modell des ternären Komplexes. UFD2 bindet mit einer N-terminalen Domäne an RAD23 und mit einer einer C-terminalen Region an CDC48. CDC48 interagiert über einen C-terminalen Bereich bzw. die AAA-Domänen mit UFD2 (Richly et al., 2005).

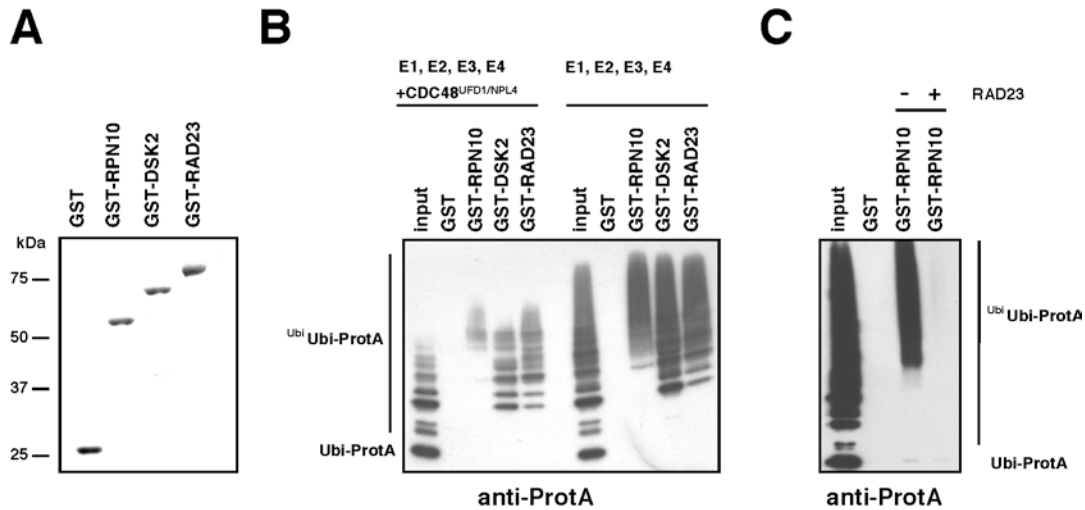


Die geringen Mengen an copräzipitiertem CDC48 deuten auf eine schwache, aber signifikante Assoziation mit RAD23 hin, im Gegensatz zu einer starken Interaktion von CDC48 mit UFD2 und UFD1/NPL4 (Koegele et al., 1999; Meyer et al., 2000). Die Interaktionen von CDC48 und RAD23 gegenüber UFD2 wurden schliesslich in *yeast-two-hybrid*-Experimenten näher analysiert (Abb. 2.8C). RAD23 scheint eine N-terminale Region von UFD2 binden zu können, CDC48 hingegen interagiert mit einem weiter C-terminal liegenden Bereich des UFD2-Proteins. Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass CDC48 über UFD2 mit RAD23 assoziiert bleibt (Abb. 2.8D), wodurch eine enge Verknüpfung von Multiubiquitylierung und Substratweitergabe möglich wird.

## 2.9 Substratübertragung von UFD2-katalysierten Ubiquitin-Konjugaten

Die Bindung von Ubiquitin-Konjugaten an die Rezeptoren RAD23, DSK2 und RPN10 ist detailliert beschrieben und wird über die UBA und UIM Domänen vermittelt (Saeki et al., 2000; Chen and Madura 2002; Hartmann-Petersen and Gordon, 2004). Allerdings gab es bisher keine Informationen bezüglich der Ubiquitin-Konjugate, die durch UFD2-katalysierte Multiubiquitylierung entstehen. Das enge Zusammenspiel von CDC48, UFD2 und RAD23 führte zu der Fragestellung, ob die Ubiquitinketten, deren Länge infolge der Einwirkung des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes limitiert ist, von den Substrat-Rezeptoren gebunden werden. Zu diesem Zweck wurden Ubiquitinketten durch eine UFD2-katalysierte *in vitro* Ubiquitylierungsreaktion hergestellt. Der Reaktion wurde zudem der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex zugesetzt, um eine Limitierung der Kettenlänge zu erhalten (vergl. Abb. 2.5A). Zur Präzipitation wurden GST und GST-Fusionen mit RAD23, DSK2 und RPN10 eingesetzt (Abb. 2.9A). Die Experimente wurden sowohl mit UFD2-katalysierten langen Ubiquitinketten als auch durch Einwirkung des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes verkürzten Ubiquitinketten durchgeführt (Abb. 2.9B). Es konnte beobachtet werden, dass RAD23 und DSK2 Substrate binden konnte, die mindestens

durch 3 oder mehr Ubiquitinreste modifiziert waren. Substrat mit nur einem oder zwei Ubiquitinresten, welches durch Reaktion der E1-, E2- und E3-Enzyme in Abwesenheit von UFD2 entsteht, konnte nicht detektiert werden.



**Abbildung 2.9: Substratübertragung von UFD2-katalysierten Ubiquitin-Konjugaten.**

(A) Aufreinigung der Substratrezeptoren RPN10, DSK2 und RAD23. GST-Fusionen von RPN10, DSK2 und RAD23 wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine und GST wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie Färbung visualisiert. (B) Multiubiquitylierung wurde wie in Abb.2.5 beschrieben in Gegenwart (links) oder Abwesenheit (rechts) des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes durchgeführt. Die jeweiligen Ubiquitin-Konjugate wurden für GST-Pulldown Experimente benutzt, wobei äquimolare Mengen von GST bzw. der entsprechenden GST Fusionsproteine eingesetzt wurden. Das Präzipitat wurde durch anti-ProteinA Immunoblots analysiert. Im Fall von GST-RPN10 wurde gegenüber GST-RAD23 bzw. GST-DSK2 die 1.8 fache Menge geladen, um gebundenes Material visualisieren zu können. Der Input zeigt 40% des eingesetzten Materials. (C) RAD23 kompetitiert mit RPN10 um ubiquityliertes Substrat. Präzipitationsexperimente wurden wie in (B) durchgeführt. RAD23 wurde gegenüber GST-RPN10 in dreifachem Überschuss während den Inkubationen zugegeben. Das Präzipitat wurde im anti-ProteinA Immunoblot analysiert.

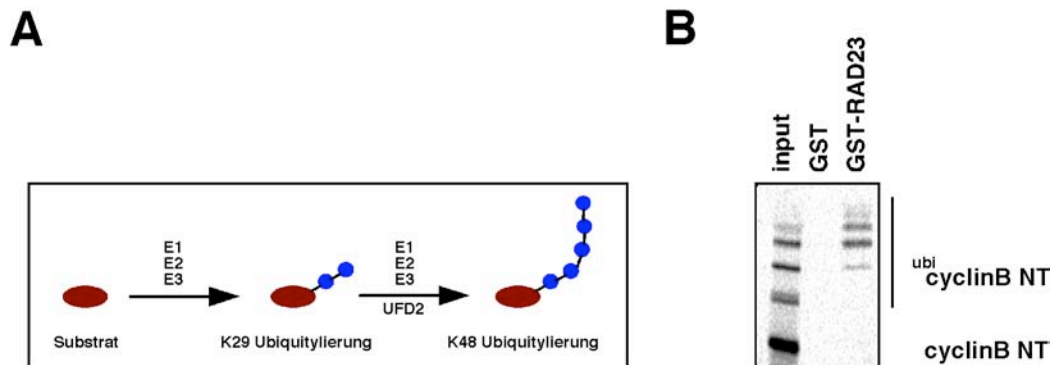
Diese Beobachtung wurde durch eine Studie bestätigt, welche die maximale Affinität von humanem RAD23 gegenüber Ubiquitin-Konjugaten bereits bei einer Anzahl von vier bis sechs Ubiquitinresten detektiert (Raasi et al., 2004). RAD23 und DSK2 besitzen im Gegensatz zu RPN10 die Eigenschaft, die durch den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex verkürzten Ubiquitinketten zu binden, was

im Einklang mit den beobachteten Interaktionen von RAD23 und DSK2 zu UFD2, bzw. der Entstehung eines ternären Komplexes aus RAD23, UFD2 und CDC48 ist. RPN10 bindet ausschliesslich lange Ubiquitinketten, RAD23 und DSK2 weisen hingegen ein breiteres Bindungsspektrum auf, welches sowohl kurze als auch lange Ubiquitinketten umfasst. Letzteres bestätigte sich auch in Konkurrenzexperimenten (Abb. 2.9C). Führt man vergleichbare Präzipitationen mit einer GST-RPN10 Fusion und UFD2-katalysierten Ubiquitin-Konjugaten in Gegenwart eines Überschusses an rekombinantem <sup>HIS</sup>RAD23 durch, so kann die Interaktion von RPN10 zu ubiquityliertem Protein kompetitiert werden.

## 2.10 Die Bindungseigenschaften von RAD23 sind unabhängig von der E4 Aktivität

Die Ubiquitylierung von UFD-Substraten durch E1-, E2- und E3-Enzyme führt zunächst zu einer Mono- oder Di-Ubiquitylierung, wobei die Ubiquitinreste über das Lysin-29 verbunden sind. Dieses Ubiquitin-Konjugat ist schliesslich Substrat für die UFD2-katalysierte Multiubiquitylierung, die allerdings über das Lysin-48 des Ubiquitins verläuft (Saeki et al., 2004; Koegl et al., 1999). Es findet also ein Umschalten der Ubiquitinverknüpfung statt, was Auswirkungen auf die Struktur der entstehenden Ubiquitinkette hat und folglich auch deren Affinität zu den Rezeptoren beeinflussen könnte (Abb. 2.10A). Um zu überprüfen, ob die Bindungsaffinität von RAD23 unabhängig von der E4 Aktivität und damit auch von den strukturellen Eigenschaften der Ubiquitinkette ist, wurde eine UFD2-unabhängige Ubiquitylierungsreaktion durchgeführt. Als Substrat wurde ein cyclin-B N-terminales Fragment benutzt, welches in Gegenwart von E1, UbcX (E2) und aus *Xenopus*-Extrakten immunpräzipitiertem APC/C (E3) inkubiert wurde. Die entstandenen Ubiquitinketten wurden in einem Präzipitations-Experiment mit GST-RAD23 Fusionsprotein eingesetzt. Mit RAD23 präzipitierten spezifisch nur solche Ubiquitin-Konjugate, die mindestens durch 3 oder mehrere Ubiquitinreste

modifiziert waren (Abb.2.10B), wie bereits durch das UFD-Substrat Ubiquitin-ProteinA veranschaulicht wurde (Abb. 2.9B).



**Abbildung 2.10: Bindungseigenschaften von RAD23.**

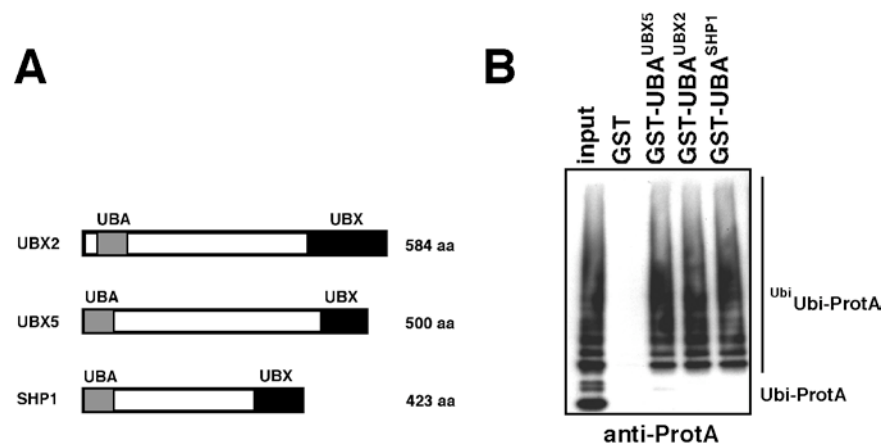
(A) Schematische Darstellung der UFD2-katalysierten Multiubiquitylierung. Ein UFD-Substrat wird durch die Enzyme E1, E2 und E3 ubiquityliert. Die Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle erfolgt dabei über das Lysin-29 (K29). In der anschließenden Reaktion katalysiert UFD2 in Gegenwart von E1, E2 und E3 eine Multiubiquitylierung. Dabei werden die Ubiquitin-Moleküle über das Lysin-48 (K48) verknüpft. (B) Die Bindung des Ubiquitin-Konjugats an RAD23 ist unabhängig von UFD2. Das radioaktiv markierte cyclinB N-terminale Fragment wurde in Gegenwart von E1, UbcX und APC/C ubiquityliert. Das ubiquitylierte Substrat wurde mit äquimolaren Mengen an GST und GST-RAD23 präzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Der Input zeigt 50% des eingesetzten Materials.

Für die Bindungseigenschaften von RAD23 ist demnach die Länge der Ubiquitinkette, nicht jedoch die Art der Verknüpfung entscheidend. RAD23 kann daher vermutlich mit UFD2-abhängigen und UFD2-unabhängigen Abbauwegen kommunizieren.

## 2.11 Bindungseigenschaften der UBA-Domäne

Die UBA-Domänen der Proteine RAD23 und DSK2 sind hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber Ubiquitin-Konjugaten beschrieben (Wilkinson et al., 2001). Wie aber aus den hier dargestellten Experimenten hervorgeht, scheinen die UBA-Domänen von RAD23 und DSK2 die Anzahl

der Ubiquitinreste, die mit einem Substrat verbunden sind, unterscheiden zu können. Es stellte sich die Frage, ob es sich dabei um einen konservierten Mechanismus handelt und ob auch andere UBA-Domänen Proteine ein gleiches Bindungsverhalten zeigen. Dazu sollten die Ubiquitin-bindenden Eigenschaften der UBX-Proteine SHP1, UBX5 und UBX2 aus *S. cerevisiae* untersucht werden. Dazu wurden Bindungsstudien mit den UBA-Domänen dieser UBX-Proteinen durchgeführt. Diese Proteine weisen eine N-terminale UBA-Domäne (*ubiquitin associated domain*) auf (Abb. 2.11A) und sind zudem durch eine C-terminale UBX-Domäne (*ubiquitin regulatory X*) gekennzeichnet (Schuberth et al, 2004). Es wurden Präzipitationsexperimente mit GST und GST Fusionen der UBA-Domänen von SHP1, UBX2 und UBX5 durchgeführt. In einer UFD2-abhängigen Reaktion wurde das Substrat Ubiquitin-ProteinA ubiquityliert und mit den jeweiligen Fusionsproteinen inkubiert und präzipitiert.



**Abbildung 2.11: Bindungseigenschaften der UBA-Domäne.**

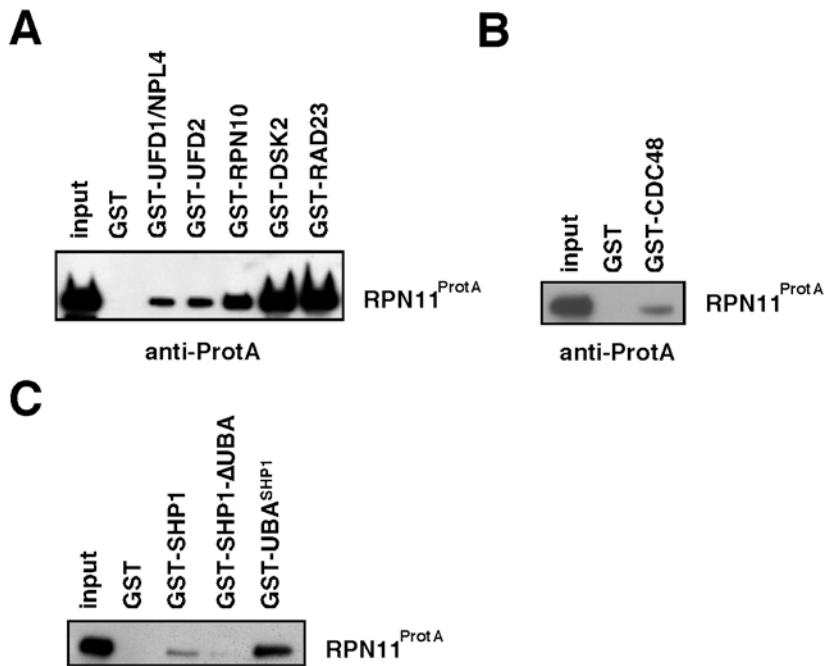
(A) Schematische Darstellung der Anordnung der UBA (*ubiquitin associated domain*) und UBX (*ubiquitin regulatory X*) Domänen in unterschiedlichen UBX-Proteinen. (B) Die UBA Domänen der UBX Proteine zeigen dieselben Bindungseigenschaften wie RAD23 und DSK2. Äquimolare Mengen von GST bzw. Fusionen von GST und UBA-Domänen von UBX2, UBX5 und SHP1 wurden an Gluthatione-Sepharose gebunden. Nach Inkubation mit UFD2-katalysierten Multiubiquitinketten wurde das präzipitierte Material im anti-ProteinA Immunoblot analysiert. Der Input zeigt 40% des eingesetzten Materials.

Es konnte eine spezifische Bindung von Ubiquitin-Konjugaten detektiert werden, die durch wenigstens 3 oder mehr Ubiquitinreste modifiziert waren, in

Übereinstimmung mit den Bindungseigenschaften von RAD23 und DSK2 (Abb 2.9B). Da die Proteine RAD23 und DSK2 ebenfalls über UBA-Domänen verfügen und dasselbe Bindungsverhalten zeigen (Abb. 2.7A), konnte man schlussfolgern, dass diese spezifische Bindungseigenschaft durch die UBA-Domäne hervorgerufen wird.

## 2.12 Assoziation von Ubiquitin-bindenden Faktoren mit dem 26S Proteasom

Die Übertragung des ubiquitylierten Substrats zum Proteasom erfolgt über Substrat-Rezeptoren und insofern stellte sich die Frage, in welchem Mass die unterschiedlichen Ubiquitin-bindenden Faktoren mit dem Proteasom assoziieren. Die Proteine RAD23, DSK2 und RPN10 waren bereits als Substrat-Rezeptoren beschrieben und hinsichtlich der Bindung von Multiubiquitinketten untersucht (Wilkinson et al., 2001; Funakoshi et al., 2002; Rao et al., 2002), sodass man eine starke Interaktion erwarten würde. Wie gezeigt, sind die Vorgänge der Substratbeladung, der Multiubiquitylierung und des Substrat-Transfers eng miteinander gekoppelt. Insofern war es von Interesse diejenigen Faktoren, die dem Transfer des Substrats zum Proteasom vorgeschaltet sind, hinsichtlich einer Assoziation mit dem Proteasom zu untersuchen. Abermals wurden Präzipitations-Experimente durchgeführt, wobei GST und GST-Fusionen aus UFD1 mit NPL4, UFD2, RPN10, RAD23 und DSK2 verwendet wurden. Es wurde eine Präzipitation mit Extrakt aus Zellen durchgeführt, die ProteinA-markiertes RPN11 (eine Komponente des 19S Partikels) exprimierten (Abb.2.12A). Man konnte eine starke Interaktion des Proteasoms mit den Rezeptoren DSK2 und RAD23 detektieren. Die Wechselwirkung von RPN10 mit dem Proteasom erschien weniger stark. Dies ist jedoch dadurch zu erklären, dass RPN10 ein Bestandteil des Proteasoms ist und der Grossteil des im Zell-Lysat vorhandenen Proteasom wohl bereits mit RPN10 abgesättigt war. Überraschenderweise wurde auch eine schwache Assoziation mit UFD2, UFD1/NPL4 und mit CDC48 (Abb. 2.12B) festgestellt.



**Abbildung 2.12: Assoziation des 26S Proteasoms mit Ubiquitin-bindenden Proteinen.**

(A) UFD1/NPL4 und UFD2 assoziieren mit dem Proteasom. GST bzw. GST-Fusionen von UFD1, im Komplex mit NPL4, UFD2, RPN10, DSK2 und RAD23 wurden in äquimolaren Mengen an Glutathione-Sepharose gebunden. Nach intensivem Waschen wurde mit einem Extrakt aus ProteinA-RPN11 exprimierenden Zellen inkubiert. Das präzipitierte Material wurde im anti-ProteinA Immunoblot analysiert. (B + C) CDC48 und SHP1 assoziieren mit dem Proteasom. Experimente wie in (A). Allerdings wurden GST und GST-Fusionen mit CDC48, SHP1, SHP1-ΔUBA und UBA<sup>SHP1</sup> verwendet und verfahren wie bereits beschrieben.

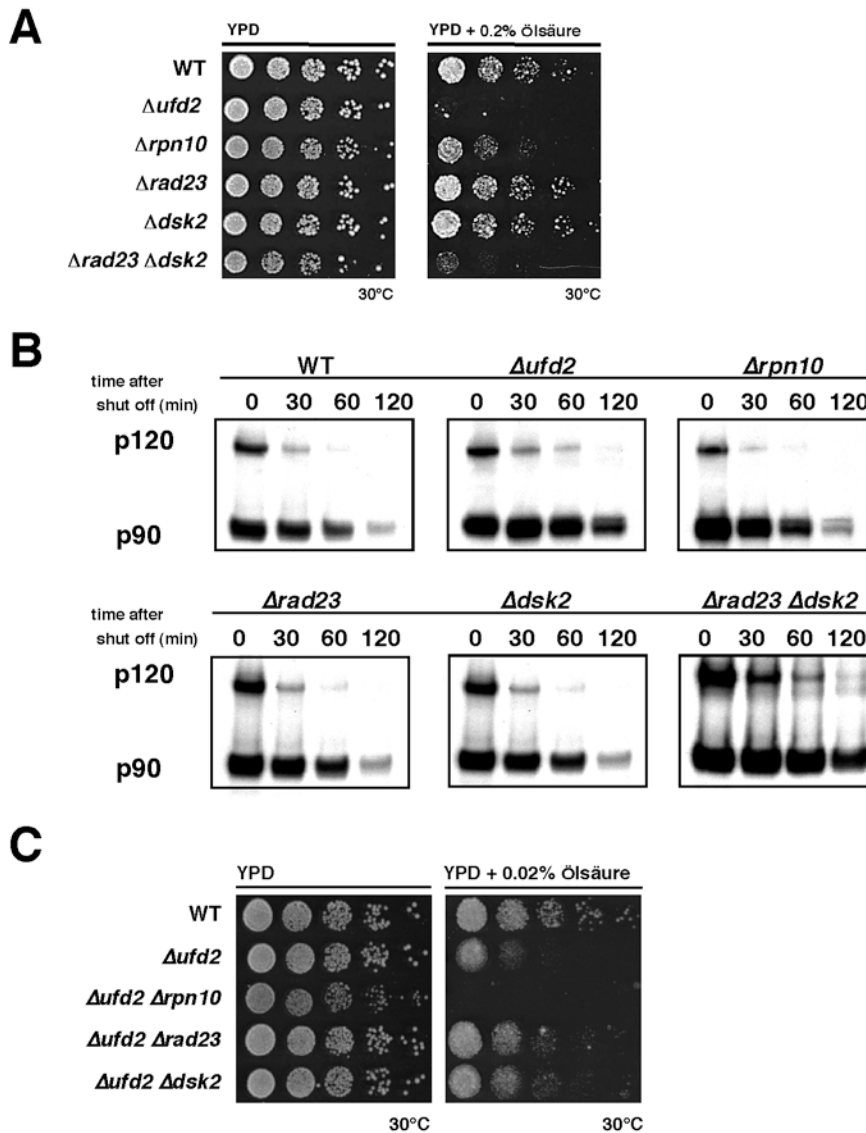
Die Ubiquitin-bindenden Proteine UFD1/NPL4, CDC48 und UFD2 binden vermutlich nicht direkt an das Proteasom, sondern indirekt über das Substrat. Zum Verständnis dieses Sachverhalts waren Experimente mit dem UBX-Protein SHP1 hilfreich (Abb. 2.12C). In Präzipitations-Experimenten wurden GST-Fusionen des Proteins SHP1, einer Deletionsmutante SHP1-ΔUBA und der isolierten UBA-Domäne eingesetzt. SHP1 zeigte eine schwache Assoziation mit dem Proteasom, die auf der Anwesenheit der UBA Domäne beruht. Die isolierte UBA-Domäne zeigt hingegen eine starke Wechselwirkung mit dem Proteasom, die nicht direkt sondern nur über ubiquitylierte Substrate erfolgen kann. Über eine ähnliche Substrat-vermittelte Wechselwirkung assoziieren wahrscheinlich auch die Proteine UFD2, CDC48 und der UFD1/NPL4 Komplex. Diese Befunde stehen in Einklang mit einer räumlich

und zeitlich engen Kopplung der Vorgänge von Substratbeladung, Multiubiquitylierung und Substrat-Transfer zum Proteasom. Substrat kann somit nach Bindung durch Rekrutierungsfaktoren wie UFD1/NPL4 sehr effizient und schnell ubiquityliert und vom Proteasom abgebaut werden.

### 2.13 Proteasomaler Abbau des Transkriptionsfaktors SPT23

Eine essentielle Funktion des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes ist die Regulation der Synthese ungesättigter Fettsäuren. Die Schlüsselkomponente der Regulation ist der Transkriptionsfaktor SPT23, welcher in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert ist. Da der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex eine essentielle Rolle in der Regulation bzw. dem Abbau von SPT23 spielt (Rape et al., 2001) und zudem die Substratbeladung von UFD2 zu bewirken scheint, wurde überprüft, ob UFD2 und die beschriebenen Faktoren des Substrat-Transfers auch einen Einfluss auf den Abbau von SPT23 haben. Aus diesem Grunde wurden Hypersensitivitäts-Analysen unter Bedingungen durchgeführt, unter denen die Zelle die Transkription von *OLE1* reprimieren muss. Dazu wurden verschiedene Hefestämme in serieller Verdünnung auf YPD-Platten aufgetragen, die mit Ölsäure supplementiert waren (Abb. 2.13A). Es zeigte sich, dass  $\Delta ufd2$  Mutanten einen sehr starken Wachstumsdefekt in Gegenwart von Ölsäure haben, was für eine Beteiligung von UFD2 bei der Degradation von SPT23 spricht. Interessanterweise zeigte nur die  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  Mutante einen Phänotyp, nicht jedoch die Einfachmutanten. Daraus konnte man schlussfolgern, dass RAD23 und DSK2 an der Degradation von SPT23 beteiligt sind, aber überlappende Funktionen haben (vergl. Abb. 2.7E). Für RPN10 konnte ein schwächerer Phänotyp beobachtet werden, was nahelegt, dass dieser Rezeptor nicht massgeblich am Abbau von SPT23 beteiligt ist. Zudem konnten die Interaktionen von SPT23 und UFD2 durch Immunopräzipitationsexperimente nachgewiesen werden (Richly et al., 2005). Der eindeutige Nachweis, dass der Transkriptionsfaktor SPT23 durch UFD2-abhängige Degradation abgebaut wird, erfolgte durch *promotor-shut-off*-Experimente.





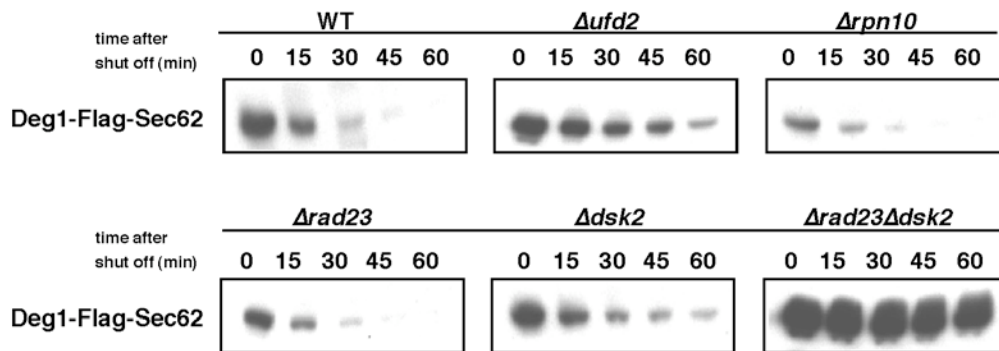
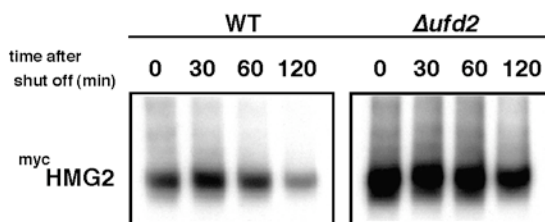
**Abbildung 2.13: Proteasomaler Abbau des Transkriptionsfaktors SPT23.**

(A)  $\Delta ufd2$ ,  $\Delta rpn10$  und  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  sind gegenüber Ölsäure hypersensitiv. Die entsprechenden Einzel- und Doppelmutanten wurden in serieller Verdünnung auf YPD Medium, welches mit 0.2% Ölsäure supplementiert war, getüpfelt und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. (B) Stabilisierung von myc-Epitop markiertem SPT23 p90 in  $\Delta ufd2$  und  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  Doppelmutanten. Die Stabilität von SPT23 wurde in *promotor-shut-off*-Experimenten in WT,  $\Delta ufd2$ ,  $\Delta rad23$ ,  $\Delta dsk2$ ,  $\Delta rpn10$  und  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  Mutanten bei 30°C durchgeführt. Die Reaktionsansätze der einzelnen Zeitpunkte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch anti-myc Immunoblots analysiert. (C) Epistasisanalyse mit UFD2 Einzel- und Doppelmutanten. Die UFD2 Einzel- und Doppelmutanten wurden in serieller Verdünnung auf YPD-Medium aufgetragen, welches mit 0.02% Ölsäure supplementiert war, und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

SPT23 wurde unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren *GAL1-10*-Promotors in den entsprechenden Hefestämmen exprimiert. Durch einen Wechsel von Galaktose- zu Glukosehaltigem Wachstumsmedium und gleichzeitiger Zugabe von Cycloheximid wurde die Neusynthese von SPT23 unterdrückt, womit der Abbau des Transkriptionsfaktors studiert werden konnte. In  $\Delta ufd2$  Mutanten konnte eine Stabilisierung von p90 beobachtet werden (Abb. 2.13B). Damit konnte verdeutlicht werden, dass SPT23 ein physiologisches UFD2 Substrat darstellt und über einen UFD2-abhängigen Abbauweg degradiert werden kann. Darüberhinaus konnte in Übereinstimmung mit dem Hypersensitivitäts-Assay (Abb. 2.13A) demonstriert werden, dass p90 in  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  Doppelmutanten stark stabilisiert wird, nicht jedoch in den  $\Delta rad23$  und  $\Delta dsk2$  Einzelmutanten. Damit war ein weiterer Beweis für die überlappenden Funktionen von RAD23 und DSK2 erbracht. Die  $\Delta rpn10$  Mutante zeigte keine wesentliche Stabilisierung der p90 Form, sodass dieses Protein für die Degradation von SPT23 eine untergeordnete Rolle spielt. Es konnte in nachfolgenden Experimenten mit Sigurd Braun belegt werden, dass die  $\Delta ufd2 \Delta rpn10$  Doppelmutante eine stärkere Stabilisierung von p90 zeigte als die  $\Delta ufd2$  Mutante, was den Schluss zulässt, dass RPN10 und UFD2 in parallelen Abbauwegen agieren (Richly et al., 2005). Dies konnte auch in weiteren Hypersensitivitätsanalysen demonstriert werden (Abb. 2.13C). Nach serieller Verdünnung wurden  $\Delta ufd2$  Deletionsmutanten und  $\Delta ufd2 \Delta rpn10$ ,  $\Delta ufd2 \Delta rad23$  und  $\Delta ufd2 \Delta dsk2$  Doppelmutanten auf YPD-Medium getüpfelt, welches mit einer Konzentration von 0.02% Ölsäure supplementiert war. Es zeigte sich, dass  $\Delta ufd2$  und die Doppelmutanten  $\Delta ufd2 \Delta rad23$  und  $\Delta ufd2 \Delta dsk2$  gleiche Phänotypen haben. Die entsprechenden Gene verhalten sich epistatisch, d.h. sie wirken im selben Abbauweg. Die Doppelmutante  $\Delta ufd2 \Delta rpn10$  zeigte indes einen stärkeren Effekt als die  $\Delta ufd2$  Einzelmutante. Daraus konnte man schliessen, dass SPT23 auch in einem parallelen Abbauweg ohne Beteiligung von UFD2 über RPN10 abgebaut werden kann.

## 2.14 Das ERAD-Substrat <sup>Deg1</sup>Sec62 wird in einem UFD2-abhängigen Abbauweg degradiert

Es ist bekannt, dass der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex eine essentielle Komponente des ERAD-Prozesses darstellt. Es wird angenommen, dass ERAD Substrate aus dem endoplasmatischen Retikulum durch einen spezifischen Kanal durch die Membran geschleust, an deren cytosolischen Seite ubiquityliert und schliesslich durch den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex in das Cytosol mobilisiert werden (Bays et al., 2001; Braun et al., 2002; Rabinovich et al., 2002; Ye et al., 2001). Die enge Kooperation zwischen UFD2 und dem CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex in Substrat-Rekrutierung und Multiubiquitylierung legen nahe, dass möglicherweise auch ERAD-Substrate über einen UFD2-abhängigen Abbauweg degradiert werden. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden Untersuchungen mit dem membranständigen Protein Sec62 durchgeführt, welches durch zwei Domänen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert ist (Mayer et al., 1998). Eine Konstruktion zur Galaktose-abhängigen Expression eines Deg1-FLAG-Sec62 Proteins wurde in die entsprechenden Hefestämme transformiert und *promotor-shut-off*-Experimente wurden durchgeführt. Interessanterweise wird das Deg1-Sec62 Protein in  $\Delta ufd2$  Mutanten stabilisiert (Abb. 2.14A). Der Einfluss eines E4-Enzyms bei ERAD Prozessen war bislang unbekannt und der Abbau von ERAD Substraten wurde nur im Zusammenhang mit E3-Ubiquitin-Ligasen diskutiert. Die mit UFD2 kooperierenden Substrat-Rezeptoren RAD23 und DSK2 verhielten sich wie vermutet. Eine nahezu komplette Stabilisierung erfolgte nur in den Doppelmutanten. In  $\Delta rad23$  und  $\Delta rpn10$  Mutanten fand keine, in  $\Delta dsk2$  Mutanten nur eine marginale Stabilisierung statt. Damit war erneut die funktionelle Überlappung von DSK2 und RAD23 gezeigt. In Übereinstimmung mit dem Transkriptionsfaktor SPT23 konnte der beschriebene Abbauweg über UFD2 und die nachgeschalteten Substrat-Rezeptoren auch für ERAD-Substrate beobachtet werden.

**A****B**

**Abbildung 2.14:**  $^{Deg1}$ Sec62 wird in einem UFD2-abhängigen Abbauweg degradiert.

(A) Stabilisierung von  $^{Deg1}$ Sec62 in  $\Delta ufd2$  und  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  Doppelmutanten. Die Stabilität von  $^{Deg1}$ Sec62 wurde in *promotor-shut-off*-Experimenten in WT,  $\Delta ufd2$ ,  $\Delta rad23$ ,  $\Delta dsk2$ ,  $\Delta rpn10$  und  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  Mutanten bei 30°C analysiert. Die Reaktionsansätze der einzelnen Zeitpunkte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in anti-FLAG Immunoblots analysiert. (B) HMG2 ist in  $\Delta ufd2$  Mutanten stabilisiert. *Promotor-shut-off*-Experimente wurden wie in (A) beschrieben in WT und  $\Delta ufd2$  Mutanten durchgeführt und die Reaktionsansätze in anti-myc Immunoblots analysiert.

In weiterführenden Experimenten mit Sigurd Braun konnten diese Resultate vertieft und auf andere ERAD-Substrate ausgeweitet werden. Für die Doppelmutante  $\Delta ufd2 \Delta rpn10$  konnte gegenüber der  $\Delta ufd2$  Mutante eine fast vollständige Stabilisierung des Abbaus von Deg1-FLAG-Sec62 beobachtet werden, was abermals darauf hindeutet, dass UFD2 und RPN10 in parallelen Abbauwegen agieren. Ähnliche Beobachtungen wurden zudem mit einem weiteren ERAD-Substrat erzielt, der HMG-CoA Reduktase HMG2 (Richly et al., 2005). Dieses Protein scheint ebenfalls in UFD2-abhängigen Abbauwegen degradiert zu werden (Abb. 2.14B).

### 3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein gerichteter Mechanismus zur Degradation von Proteinen dargestellt. Es wurde gezeigt, dass CDC48 in diesem Abbauweg eine zentrale Rolle spielt. Zusammen mit dem heterodimeren Kofaktor UFD1/NPL4 überträgt CDC48 oligo-ubiquitylierte Substrate auf den Multiubiquitylierungsfaktor UFD2. Die nachfolgende UFD2-abhängige Multiubiquitylierung in Gegenwart von CDC48 führt zur Herstellung von Substraten, die mit einer begrenzten Anzahl von Ubiquitinresten modifiziert sind (*size restriction*). Diese werden mittels der Substrat-Rezeptoren RAD23 und DSK2 zum Proteasom übertragen und somit dem Abbau zugeführt. Die Rekrutierung, Ubiquitylierung und der Transfer des Substrats scheinen somit zeitlich und räumlich eng gekoppelte Prozesse zu sein. Die Beteiligung der beschriebenen Ubiquitin-bindenden Faktoren konnte sowohl im Abbau des Transkriptionsfaktors SPT23 als auch für ERAD-Substrate gezeigt werden. Hiermit wird ein neues Konzept für das Zusammenwirken Ubiquitin-bindender Faktoren vorgeschlagen und ein UFD2-abhängiger Abbauweg vorgestellt.

#### 3.1 Ein Zusammenspiel von Ubiquitin-bindenden Faktoren ermöglicht einen gerichteten proteasomalen Abbau

Der Abbau zahlreicher zellulärer Proteine erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom System. Nachfolgend der Ubiquitylierung durch eine Enzymkaskade mit E1-, E2- und E3-Enzymen werden Protein-Substrate spezifisch durch das Proteasom degradiert. Bislang wurde angenommen, dass zum Abbau markierte Substrate entweder über freie Diffusion zum Proteasom gelangen oder aber gerichtet über bestimmte lösliche Rezeptoren zum Proteasom transportiert werden (Pickart, 2001; Hochstrasser, 1996). Multiubiquitylierung und Degradation als gekoppelte Prozesse zu betrachten wurde erstmalig als Möglichkeit betrachtet, nachdem die E3-Ligase UFD4 am

Proteasom lokalisiert wurde (Xie et al., 2002). Auf welchem Wege die Substrate rekrutiert und gezielt zum Proteasom geleitet werden können blieb eine offene Frage. Die Aktivität des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes wurde bislang für zahlreiche ERAD-Substrate und den Transkriptionsfaktor SPT23 mit Hinblick auf eine Mobilisierungsfunktion beschrieben, die eine Extraktion von membranständigen Proteinen ins Cytoplasma bewirkt (Bays et al., 2001; Braun et al., 2002; Rabinovich et al., 2002). Hinzu kommt die Segregase-Funktion von CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup>, die es erlaubt ubiquitylierte Substrate von nicht-ubiquitylierten Proteinen zu trennen (Rape et al., 2001). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass einer Rekrutierung von ubiquitiniertem Substrat durch CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> eine Multiubiquitylierung durch das E4-Enzym UFD2 nachgeschaltet ist. Die AAA-ATPase CDC48 interagiert mit UFD2 über eine C-terminale Region, während der Kofaktor UFD1/NPL4 über den N-Terminus des CDC48 Proteins gebunden wird (Bruderer et al., 2004). Die Existenz dieses ternären Komplexes macht eine Kopplung der Substrat-Rekrutierung und Multiubiquitylierung möglich, wobei CDC48 aufgrund der genannten Bindungseigenschaften die zentrale Komponente darstellt. Die Resultate dieser Arbeit verdeutlichen, dass Ubiquitin-Konjugate *in vivo* effizient nur in Abhängigkeit des UFD1/NPL4 Komplexes an CDC48 binden. Auch die Substratbeladung von UFD2 steht in strikter Abhängigkeit von der Funktion des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes, so dass ubiquityliertes Substrat in einem gerichteten Fluss vom Kofaktor UFD1/NPL4 über CDC48 zu UFD2 geleitet wird. Das Heterodimer UFD1/NPL4 scheint lediglich im Prozess der Substrat-Rekrutierung benötigt zu werden, während CDC48 eine zentrale Position einnimmt und sowohl die Substratbeladung koordiniert als auch eine essentielle Aufgabe in der Termination der Ubiquitylierungsreaktion übernimmt.

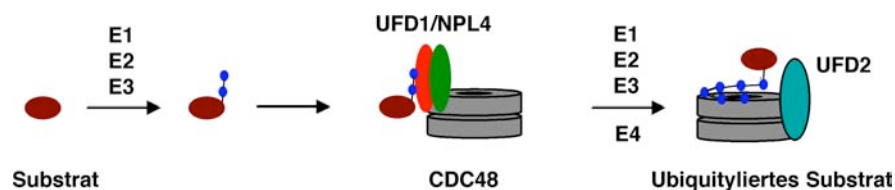
Eine entscheidende Erkenntnis war die Interaktion von UFD2 mit Ubiquitin-bindenden Proteinen RAD23 und DSK2. Diese waren zwar bereits als Substrat-Rezeptoren des Proteasoms beschrieben, aber die Verbindung zum Prozess der Multiubiquitylierung war unklar. Erst durch diese Interaktion wird

eine gezielte Steuerung des durch UFD2-Katalyse ubiquitylierten Substrats zum Proteasom verständlich. Die in Gegenwart von CDC48 synthetisierten verkürzten Ubiquitinketten werden von den Substrat-weiterleitenden Faktoren RAD23 und DSK2 gebunden und die Bildung von ternären Komplexen aus CDC48, UFD2 und RAD23 unterstreicht zusätzlich den postulierten Mechanismus. Das enge Zusammenspiel der beteiligten Ubiquitin-bindenden Faktoren verursacht vermutlich eine räumliche und zeitliche Kopplung der Prozesse der Ubiquitylierung und Substratweiterleitung und entspricht zusätzlich einer Schutzfunktion der Ubiquitin-Konjugate gegenüber Ubiquitin-Hydrolasen. Damit wird eine gezielte Steuerung des Substrats zum proteasomalen Abbau erreicht.

### 3.2 Funktion der AAA-ATPase CDC48 während der Multiubiquitylierung

Die Interaktion von UFD2 und CDC48 und die enge Verknüpfung der Substratbeladung mit der Multiubiquitylierung machten eine Untersuchung der Funktion des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes während des Ubiquitylierungsvorgangs notwendig (Koegl et al., 1999). Es wurde für mehrere UFD-Substrate gezeigt, dass der CDC48 Komplex spezifisch die Länge der entstehenden Ubiquitinketten limitiert und es wurde darüberhinaus demonstriert, dass die Limitierung von CDC48 abhängt und die Ubiquitin-bindenden Kofaktoren UFD1/NPL4 keinen Einfluss auf diesen Prozess haben. Dies deutet wiederum an, dass der Kofaktor UFD1/NPL4 lediglich zur Rekrutierung von Substrat dient und in den Prozessen der Multiubiquitylierung und Substrat-Weitergabe keine Funktion hat. Die Affinität von CDC48 gegenüber Ubiquitin scheint für Konjugate mit drei bis sechs Ubiquitinresten optimiert zu sein und wie diese Arbeit zeigt ist CDC48 zur Rekrutierung von Substraten mit nur einem oder zwei Ubiquitin-Molekülen (z.B. UFD-Substrate nach Ubiquitylierung durch E1-, E2- und E3-Enzyme) auf den Kofaktor UFD1/NPL4 angewiesen. CDC48 und UFD1/NPL4 besitzen also offensichtlich unterschiedliche Bindungsaffinitäten gegenüber Ubiquitin-Konjugaten. Die Bindungseigenschaften von CDC48

gegenüber Ubiquitinkonjugaten wurde vielfach beschrieben (Verma et al., 2000; Dai et al., 1998). Interessanterweise zeigt das Homologe p97 eine hohe Spezifität für Tetra-Ubiquitinketten bzw. Ubiquitinketten mit wenigstens vier Ubiquitinresten, was in Einklang mit den hier präsentierten Daten ist (Dai and Li, 2001). Die Ubiquitinketten könnten möglicherweise hochaffin durch die sechs Untereinheiten des Hexamers koordiniert werden, und die Vermutung liegt nahe, dass gerade dadurch die Limitierung auf maximal sechs Ubiquitinreste während der Multiubiquitylierung verursacht wird (Abb. 3.1). Eine Funktion als Inhibitor der Ubiquitylierungsreaktion wurde bereits für das Protein RAD23 vorgeschlagen und es wurde vermutet, dass dadurch die Degradation von Substraten verhindert wird (Ortolan et al., 2000). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass RAD23 für den proteasomalen Abbau benötigt wird. Insofern fungiert RAD23 nicht als Inhibitor, sondern übt wahrscheinlich ähnlich wie CDC48 eine Ubiquitinketten-limitierende Funktion aus.



**Abbildung 3.1: Substratbeladung und Multiubiquitylierung in Gegenwart von CDC48**

Substrate werden durch E1-, E2- und E3-Enzyme oligo-ubiquityliert. Der Rekrutierungsfaktor UFD1/NPL4 bindet das ubiquitylierte Substrat und der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex überträgt das Substrat auf UFD2, welches zusammen mit E1-, E2- und E3-Enzymen die Multiubiquitylierung durchführt. In Gegenwart von CDC48 werden Ubiquitinketten hergestellt, die über nur maximal sechs Ubiquitinreste verfügen. Wahrscheinlich werden diese über die Ubiquitin-Bindungs-Domänen von CDC48 koordiniert.

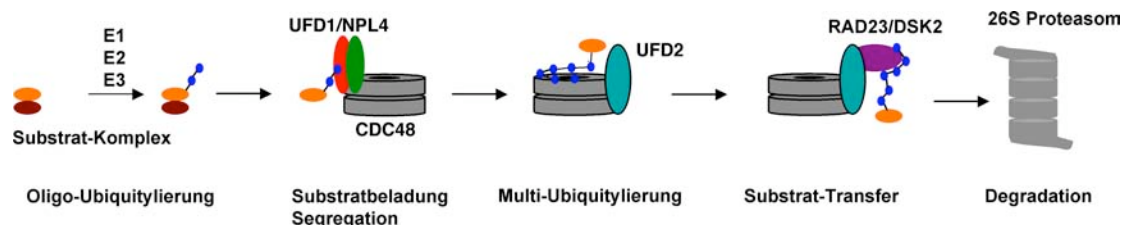
Die Limitierung der Kettenlänge scheint aus mehreren Gründen sehr plausibel. Bei der Multiubiquitylierung handelt es sich um eine Konjugationsreaktion, die durch eine spezifische Komponente terminiert wird. Die Konjugation von Ubiquitin-Molekülen wird durch UFD2 angeschaltet und nach Erreichen einer optimalen Kettenlänge durch CDC48 unterbunden. Man muss



sich vergegenwärtigen, dass Ubiquitylierung stets mit einem Verbrauch von Energie verbunden ist. Insofern kann über eine gezielte Termination der Konjugation ein unnötiger Energieverbrauch verhindert werden. Der Translokation des Substrats in den katalytischen Partikel des Proteasoms geht die Entfernung der Ubiquitinkette durch Deubiquitinierungsenzyme voraus, was durch sogenannte UBP-Proteine (*ubiquitin-specific processing protease*) bewerkstelligt wird. *S. cerevisiae* kodiert 16 UBP-Proteine, die eine Editierungsfunktion auf Ubiquitinketten ausüben. Die Disassemblierung der Ubiquitinkonjugate vor der Proteolyse scheint essentiell zu sein, da nicht abgebaute Ubiquitinketten das Proteasom blockieren würden (Hochstrasser, 1996). Eine Begrenzung der Anzahl von konjugierten Ubiquitinresten durch CDC48 könnte die Notwendigkeit der Deubiquitylierung einschränken und zudem einen positiven Einfluss auf die Geschwindigkeit des Abbauprozesses haben, da die Deubiquitylierung durch UBP-Enzyme die Degradationsgeschwindigkeit entscheidend moduliert (Hershko, 1996). Weiterhin führt eine nicht-limitierte Ubiquitylierung möglicherweise zur Ausbildung von verzweigten Kettenstrukturen. Dies scheint durchaus plausibel, da Ubiquitin-Moleküle *in vivo* über jedes der sieben Lysinreste des Ubiquitins verknüpft werden können (Peng et al., 2003). Es ist unwahrscheinlich, dass diese verzweigten Ubiquitinketten als geeignetes Substrat für proteasomalen Abbau dienen, da das Erkennungssignal für Degradation vermutlich in der Oberflächenstruktur Lysin-48-verknüpfter Ubiquitin-Moleküle enthalten ist. Vielmehr blockieren sie wahrscheinlich die proteasomalen Bindungsstellen und inhibieren damit den gesamten Abbauprozess der Zelle. Verzweigte Ubiquitin-Konjugate müssten demzufolge durch UBP-Enzyme abgebaut werden. Die Synthese dieser nicht-linearen Strukturen und damit verbundene Editierungsprozesse können durch eine limitierte Ubiquitylierung umgangen werden. Eine Multiubiquitylierung in Gegenwart von CDC48 optimiert das Ubiquitin-Proteasom System daher durch ein Verhindern zusätzlicher energieabhängiger und zeitaufwendiger Prozesse.

### 3.3 Modell für eine UFD2-abhängige Degradation

Die vorliegende Arbeit konnte einen detaillierten Einblick in den proteasomalen Abbau von membranständigen Substraten geben und das aktuelle Bild der Degradation von ERAD-Substraten und dem Transkriptionsfaktor SPT23 erweitern. Beide Substrat-Typen sind an der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und werden zunächst an der cytosolischen Seite der ER-Membran ubiquityliert. Das entworfene Modell schlägt vor, dass zunächst eine Oligo-Ubiquitylierung stattfindet, die durch E1-, E2- und E3-Enzyme durchgeführt wird (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2: Modell für einen UFD2-abhängigen Abbauweg.**

Substrat-Komplexe können nach Oligo-Ubiquitylierung durch den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex gebunden werden. Das ubiquitylierte Protein wird durch die Aktivität des Komplexes vom Partner-Protein getrennt und auf UFD2 übertragen. In Gegenwart von CDC48 werden durch UFD2-Katalyse Ubiquitinketten mit definierter Länge synthetisiert. Diese werden von den Rezeptoren RAD23 und DSK2 gebunden und zum Proteasom transportiert.

Oligo-Ubiquityliertes Substrat kann durch den Rekrutierungsfaktor UFD1/NPL4 erkannt werden und auf CDC48 übertragen werden. CDC48 vermittelt eine Komplexdisassemblierungsfunktion und vermag ein ubiquityliertes Protein von seinem Partner-Protein in einer ATP-abhängigen Reaktion zu segregieren (Rape et al., 2001). Eine weitere Funktion des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes ist die Übertragung des Substrates auf UFD2. Die Multiubiquitylierung in Gegenwart des CDC48 Komplexes führt zur Herstellung von spezifischen Ubiquitinketten, die nur im Durchschnitt über maximal sechs Ubiquitinreste verfügen (*size restriction*). Derart ubiquitylierte Substrate werden durch die Faktoren RAD23 bzw. DSK2, welche im Komplex

mit CDC48 und UFD2 vorliegen, aufgenommen und zum Proteasom geliefert. Schliesslich findet dort die Degradation des Substrates statt.

### 3.4 UFD2 ist ein wichtiger Schalter in Abbauprozessen

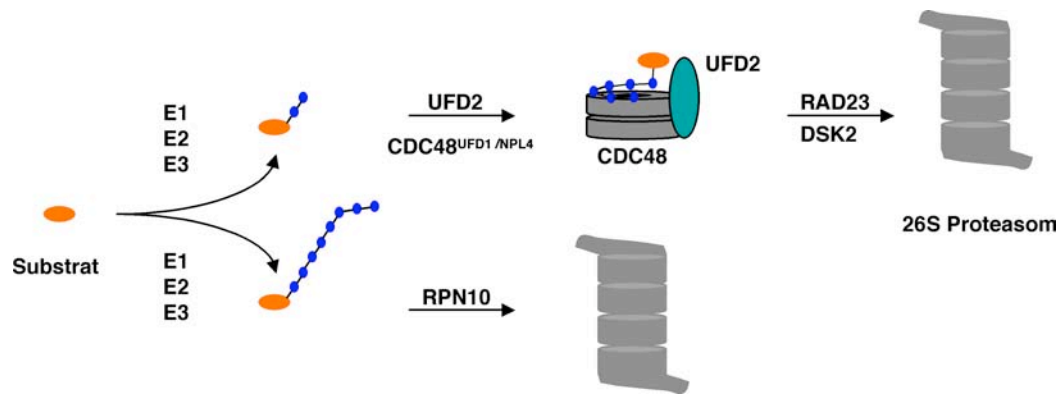
Eine Ubiquitylierung durch E1-, E2- und E3-Enzyme kann in vielen Fällen eine ausreichende Markierung von Substrat bewirken, welche vom Proteasom erkannt wird und den Abbau des Substrates veranlasst (Hochstrasser et al., 1996; Pickart, 2001). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte nachgewiesen werden, dass eine Ubiquitylierung von UFD-Substraten durch E1-, E2- und E3-Enzyme nur zur Übertragung zweier Lysin-29 verknüpfter Ubiquitinreste führt (Koegl et al., 1999; Johnson et al., 1995). Eine weitere Übertragung von Ubiquitin-Molekülen in Gegenwart von UFD2 ist notwendig, um eine Degradation des Substrates zu ermöglichen. UFD2 zeigt typische Merkmale eines spezialisierten E3-Enzyms, da die U-Box ähnlich wie die strukturell homologen RING-Finger bestimmter E3-Ligasen autoubiquityliert wird. Dennoch übernimmt UFD2 nicht vollständig die Aufgaben einer Ubiquitin-Ligase, da die UFD2-katalysierte Multiubiquitylierung zusätzlich auf E1-, E2- und E3-Enzyme angewiesen ist (Koegl et al., 1999). Die Funktion von E4-Enzymen besteht vermutlich darin, eine Verknüpfung über das Lysin-48 des Ubiquitins zu gewährleisten, die wahrscheinlich aus sterischen Gründen für die HECT-E3-Ligase UFD4 nicht möglich ist (Saeki et al., 2004). Wie allerdings E3- und E4-Enzyme kommunizieren ist noch unbekannt. UFD2 übernimmt in proteasomalen Abbauwegen die Aufgabe eines Schalters, der an der Schnittstelle von Oligo-Ubiquitylierung und Multiubiquitylierung wirkt. Ein Zwei-Schritt-Mechanismus aus einer Oligo-Ubiquitylierung und einer nachfolgenden UFD2-katalysierten Multiubiquitylierung bedeutet eine weitere Möglichkeit zur Regulation von proteasomalen Abbauprozessen. Eine Mono- oder Oligo-Ubiquitylierung entspricht einem Signal, durch welches bestimmte Funktionen aktiviert werden. Dazu zählen wichtige zelluläre Vorgänge wie Endocytose, DNA-Reparatur, Transaktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Mobilisierung von membranständigen Proteinen. Findet zunächst nur

eine Mono- oder Oligoubiquitylierung statt, so können die physiologischen Prozesse aktiviert werden, die in dem Ubiquitin-Signal kodiert sind. Die Inaktivierung des jeweiligen Prozesses erfolgt in einem nachfolgenden zweiten Schritt durch das E4-Enzym UFD2, welches spezifisch durch den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex mit oligo-ubiquitylierten Substrat beladen wird. Ohne die Aktivität des E4-Enzyms wären die konjugierten Ubiquitinketten zu kurz, um von den Substrat-Rezeptoren RAD23 oder DSK2 gebunden zu werden. Durch Anfügen von nur wenigen Lysin-48-verknüpften Ubiquitinresten wird das Protein schliesslich als Substrat für das 26S Proteasom gekennzeichnet (Saeki et al., 2004; Koegl et al., 1999).

### 3.5 Übertragung von Substrat zum Proteasom

Dass die Ubiquitin-bindenden Proteine RAD23 und DSK2 in einem Komplex mit UFD2 und CDC48 vorliegen und Substrat nach der Multiubiquitylierung durch UFD2 aufnehmen, war bislang nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte neben den Interaktionen dieser Proteine demonstriert werden, dass auch die durch UFD2-Katalyse ubiquitylierten Substrate spezifisch von RAD23 und DSK2 gebunden werden. Für Ubiquitinketten die in Gegenwart des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes synthetisiert wurden, ergab sich ein besonders interessanter Befund. Der Substrat-Rezeptor RPN10 vermag die CDC48 abhängig verkürzten Ketten nur sehr schlecht zu binden, wohingegen die Affinität von RAD23 und DSK2 für diese Ubiquitinketten optimiert zu sein scheint. Dies legt nahe, dass RPN10 vermutlich in einem parallelen, UFD2-unabhängigen Abbauweg benötigt wird (Abb. 3.3). Die Bindungseigenschaften spiegeln auch die Redundanz der Rezeptoren RAD23 und DSK2 wider, gezeigt durch die Hypersensitivität gegenüber Ölsäure als auch in der Temperatursensitivität der *Δrad23 Δdsk2* Doppelmutante. RPN10 bindet hingegen längere Ubiquitinketten und ist somit wahrscheinlich vorwiegend an der Degradation in CDC48-unabhängigen Abbauwegen beteiligt. Allerdings muss eine Limitierung der Länge der Multiubiquitinkette vermutlich nicht immer mit einer Segregation und Mobilisierung des Substrats

durch CDC48 einhergehen. Möglicherweise entstehen nach der Mobilisierung durch CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> auch Ubiquitin-Konjugate, die durch RPN10 gebunden werden können. In diesem Zusammenhang steht auch der Befund, dass RPN10 einen geringen Einfluss auf den Abbau von SPT23 zeigt.



**Abbildung 3.3: Die Substratrezeptoren RAD23, DSK2 und RPN10 gehören zu parallelen Abbauwegen.**

Substrate werden durch E1, E2 und E3 ubiquityliert. Eine ausreichende Ubiquitylierung kann zur Übertragung auf den Rezeptor RPN10 führen, welcher hauptsächlich lange Ubiquitin-Konjugate bindet. UFD2-abhängige Multiubiquitylierung führt über den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex. Die synthetisierten verkürzten Ketten können nur durch RAD23 oder DSK2 gebunden werden.

Damit bestehen für den Transkriptionsfaktor SPT23 wenigstens zwei parallele Abbauege, und man kann postulieren, dass die Wahl eines bestimmten Degradationsweges durch die Anzahl der konjugierten Ubiquitinreste determiniert ist. Die Bindungseigenschaften der Substrat-Rezeptoren scheinen über die Anzahl der Ubiquitinmoleküle bestimmt und nicht in der Topologie der Ubiquitinkette enthalten zu sein, wie für das Protein RAD23 gezeigt werden konnte (Abb.2.10B). Die spezifischen Bindungseigenschaften der Ubiquitin-bindenden Faktoren definieren somit vermutlich einen affinitätsgetriebenen Mechanismus, der den Substrat-Fluss zum Proteasom über die Anzahl der konjugierten Ubiquitin-Moleküle steuert. Das Heterodimer UFD1/NPL4 ist durch eine hohe Affinität gegenüber mono- oder di-ubiquitylierten Proteinen gekennzeichnet und dient der Rekrutierung von Substrat. CDC48 dagegen assoziiert mit Konjugaten, die über 3-6

Ubiquitinreste verfügen und benötigt zur Übertragung von mono- und di-ubiquitinierten Substraten den Kofaktor UFD1/NPL4, sodass der Substrat-Fluss zum Multiubiquitylierungsfaktor UFD2 gewährleistet ist. Die Substrat-Rezeptoren RAD23 und DSK2 sind durch ein breites Bindungs-Spektrum gekennzeichnet und binden spezifisch Ubiquitinketten ab einer Anzahl von drei Ubiquitinresten. Im Gegensatz dazu ist RPN10 Vertreter einer Gruppe von ubiquitin-bindenden Faktoren, die nur eine Affinität gegenüber längeren Ubiquitinketten haben. Durch die Existenz dieser speziellen Bindungs-domänen, die optimal an die Anforderungen von Rekrutierung, Multiubiquitinierung und Weiterleitung des Substrates angepasst sind, entsteht ein gerichteter, affinitätsgetriebener Fluss des Substrates.

### 3.6 Direkte und Substrat-vermittelte Interaktion mit dem Proteasom

Die Bindungseigenschaften verschiedener Ubiquitin-bindender Proteine gegenüber dem 26S Proteasom können durch eine direkte oder eine indirekte Interaktion begründet sein. Die stabile bzw. direkte Interaktion eines Proteins mit dem Proteasom muss von einer indirekten Interaktion unterschieden werden, die auf einer Substrat-vermittelten Wechselwirkung beruht. RAD23 und DSK2 binden direkt an das Proteasom und RPN10 ist ein Bestandteil desselben (Chen and Madura 2002; Wilkinson et al., 2001; Funakoshi et al., 2002; van Nocker et al., 1996). In dieser Arbeit konnte für diese Substrat-Rezeptoren in Übereinstimmung mit den publizierten Daten eine starke Interaktion mit dem Proteasom demonstriert werden. Von CDC48 war bereits ebenso bekannt, dass es mit dem 26S Proteasom copräzipitiert, und infolgedessen wurde angenommen, dass CDC48 als Überträger von ubiquityliertem Substrat wirken kann (Dai et al., 1998; Verma et al., 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben CDC48 auch der UFD1/NPL4 Komplex, UFD2 und SHP1 mit dem Proteasom assoziieren (Abb.2.12). Dabei handelt es sich vermutlich um Interaktionen, die aufgrund der Ubiquitin-bindenden Eigenschaften dieser Proteine zustande kommen und vermutlich nicht durch eine direkte Bindung an das Proteasom zu

erklären sind. Die Faktoren UFD1/NPL4, CDC48 und UFD2 wirken in den Prozessen der Substraterkennung und Multiubiquitylierung, nicht jedoch während der Substratübertragung zum Proteasom. Wahrscheinlich bleiben diese Faktoren aber noch mit dem Substrat assoziiert, wenn dieses über Transport-Proteine (RAD23/DSK2) zum Proteasom geleitet wird. Die Wechselwirkung von UFD1/NPL4, CDC48 und UFD2 mit dem Proteasom (Abb.2.12A) erscheint vermutlich daher deutlich schwächer als für die direkt interagierenden Faktoren RAD23, DSK2 und RPN10. Für den Multiubiquitylierungsfaktor UFD2 kommt vermutlich auch deshalb nur eine indirekte, Substrat-vermittelte Interaktion in Frage, weil RAD23 sowohl mit UFD2 als auch mit der Proteasom-Komponente RPN1 über seine UBL-Domäne interagiert (Kim et al., 2004). Eine gleichzeitige Bindung von RAD23 an UFD2 und an das Proteasom ist somit ausgeschlossen. SHP1 assoziiert nur aufgrund der Ubiquitin-bindenden UBA-Domäne mit dem Proteasom und eine Deletion der UBA-Domäne führt zu einer fast vollständigen Aufhebung dieser schwachen Wechselwirkung. Die isolierte UBA-Domäne zeigt hingegen eine intensive Wechselwirkung mit dem Proteasom, die nur indirekt über ubiquityliertes Substrat erfolgen kann (Abb. 2.12C).

Somit sollte man bei den während der Substrat-Rekrutierung und Ubiquitylierung wirkenden Faktoren (UFD1/NPL4, CDC48 und UFD2) von einer Substrat-vermittelten (indirekten) Interaktion mit dem Proteasom sprechen und diese von einer direkten Wechselwirkung (RAD23/DSK2) unterscheiden. Proteine der Ubiquitylierungsmaschinerie und der Substrat-Rekrutierung können vermutlich über eine verbleibende, indirekte Interaktion zum Substrat mit dem Proteasom assoziieren. Die gemeinsame Lokalisierung aller beteiligten Faktoren am Substrat unterstützt schliesslich, dass die Reaktionen von Substratbeladung, Ubiquitylierung, Substratweiterleitung und Degradation konzertiert ablaufen können.

### 3.7 Der Transkriptionsfaktor SPT23 und ERAD-Substrate werden in UFD2-abhängigen Degradationswegen abgebaut

Die enge Kooperation zwischen den Substratbeladungsfaktoren UFD1/NPL4, der ATPase CDC48, dem Multiubiquitylierungsenzym UFD2 und den Substrat-weiterleitenden Faktoren konnte erfolgreich für ERAD-Substrate und den Transkriptionsfaktor SPT23 nachgewiesen werden. Im ERAD-Prozess sowie bei der Mobilisierung von SPT23 p90 spielt der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex eine entscheidende Rolle. Es war bislang nicht bekannt, ob UFD2 in die anschließenden Abbauprozesse involviert ist. Sowohl für ERAD-Substrate als auch für SPT23 p90 konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass der proteasomale Abbau partiell in Abhängigkeit von UFD2 erfolgt, über die Substrat-Rezeptoren RAD23 oder DSK2 verläuft und in geringerem Masse über RPN10. Als Rezeptoren scheinen dabei RAD23 und DSK2 redundant zu wirken. In UFD2 Deletionsmutanten ist die Halbwertszeit des Substrats ungefähr um den Faktor 2 verlängert. Damit scheint UFD2 zwar den Abbau zu fördern, ist aber nicht essentiell. Dies erscheint plausibel, da eine Deletion von UFD2 für *S. cerevisiae* nicht lethal ist und deutet auf parallel verlaufende Abbauege hin. Es wäre denkbar, dass SPT23 auch über einen UFD2-unabhängigen Abbauweg über die E3-Ligase RSP5 degradiert wird. Die Bindungseigenschaften gegenüber Ubiquitin-Konjugaten unterstreichen die unterschiedlichen Funktionen von RAD23 und DSK2 gegenüber RPN10. ERAD-Substrate ebenso wie SPT23 benötigen den CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex zur Mobilisierung aus der Membran des ER. Findet die Multiubiquitylierung ebenfalls in Gegenwart des Komplexes statt, so werden Ubiquitinketten mit limitierter Länge gebildet, welche nur durch RAD23 oder DSK2 gebunden werden können. Die UIM-Domäne von RPN10 besitzt diese Bindungseigenschaft nicht und demzufolge zeigen RPN10 Mutanten nur einen geringen Einfluss auf den Abbau von SPT23 und ERAD Substraten. Im Fall von SPT23 zeigt sich dieser Sachverhalt ausserdem in der Hypersensitivität gegenüber Ölsäure. RPN10 Mutanten zeigen in Gegenwart von Ölsäure einen geringen Wachstumsdefekt, aber im Gegensatz dazu ist eine



Doppelmutante der redundanten Faktoren RAD23 und DSK2 nicht lebensfähig. Die Bindungseigenschaften gegenüber den in Gegenwart des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex gebildeten verkürzten Ketten wird somit überzeugend widerspiegelt. RPN10 steuert nur geringfügig zur Degradation von SPT23 bzw. von ERAD-Substraten bei. Der Beitrag von RPN10 zum Abbau von SPT23 konnte in einer Epistasisanalyse veranschaulicht werden, die UFD2 und RPN10 parallelen Abbauwegen zuordnet. Eine weiterführende Analyse zeigte später, dass die entsprechenden Doppelmutanten den Abbau von SPT23 und einigen ERAD-Substraten nahezu vollständig stabilisierten (Richly et al., 2005).

Die Koordination des proteasomalen Abbaus von SPT23 scheint ein komplizierter Vorgang zu sein. SPT23 p90 muss zunächst als Transaktivator im Zellkern wirken, um die Transkription von OLE1 zu veranlassen. Im Anschluss daran muss der Transkriptionsfaktor abgebaut werden, sodass die Transkription wieder abgeschaltet wird. Sowohl p97 als auch dessen Hefehomologes CDC48 zeigen eine partielle Lokalisierung im Zellkern (Abb. 2.1E; Madeo et al., 1998). Interessanterweise hängt die nukleäre Lokalisierung von der Funktion des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes ab, wie in Studien von Michael Rape gezeigt werden konnte. Man kann spekulieren, dass CDC48 und UFD2 zusammen mit dem oligo-ubiquitylierten Substrat in den Zellkern gelangen. Ob der Abbau von p90 verhindert werden kann bevor die Transkription von OLE1 angeschaltet wird, konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Allerdings könnte CDC48 das gebundene oligo-ubiquitylierte Substrat vor einem frühzeitigen Abbau schützen. Möglicherweise bindet CDC48 mit dem ubiquityliertem Transkriptionsfaktor an den Promotorregionen zu transkribierender Gene und überträgt erst nach erfolgter Transkription das Substrat auf UFD2. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Mono- oder Oligo-Ubiquitylierung bei der Transaktivierung von Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Muratani and Tansey, 2003; Salghetti et al., 2001). In ähnlicher Weise könnte eine Oligo-Ubiquitylierung von SPT23 nicht nur Signal für die Prozessierung und

Segregation sein, sondern auch die Transaktivierung verursachen und die notwendige Voraussetzung für die nachfolgende Multiubiquitylierung darstellen. Durch die Effektivität des hier beschriebenen UFD2-abhängigen Abbauwegs kann die nukleäre Konzentration von p90 schnell und zuverlässig dem Bedarf der Zelle angepasst und somit die Fluidität des Membransystems reguliert werden.

Der beschriebene UFD2-abhängige Degradationsweg konnte in dieser Arbeit für das ERAD Model Substrat Deg1-Sec62 beschrieben werden, wie auch für andere ERAD-Substrate (Richly et al., 2005). Damit kommt UFD2 im Abbau von ERAD-Substraten eine wesentliche Bedeutung zu, zudem wird aber deutlich, dass auch weitere UFD2-unabhängige Abbauege bestehen. Die fast vollständige Stabilisierung von ERAD-Substraten in  $\Delta rad23 \Delta dsk2$  Doppelmutanten legt nahe, dass die Rezeptoren eventuell auch ohne UFD2 agieren. ERAD Substrate könnten auch nach Ubiquitylierung durch membranständige E3-Ligasen durch die Substrat-Rezeptoren gebunden und zum Proteasom transportiert werden. Die UFD2-abhängige Degradation stellt in Analogie zum Transkriptionsfaktor SPT23 nur einen möglichen Abbauweg für ERAD-Substrate dar. Legt man das postulierte Model für den ERAD-Prozess zugrunde, so können in einem UFD2-abhängigen Abbauweg verschiedene Prozesse unterschieden werden: Ubiquitylierung, Lösung des Substrates ins Cytoplasma, UFD2-katalysierte Multiubiquitylierung, Substrat-Weiterleitung und Degradation. UFD2 wirkt dabei als zentraler Schalter, der über das Schicksal des oligo-ubiquitylierten Substrats entscheidet. Bei Bedarf kann UFD2 durch die Übertragung weiterer Ubiquitinreste den Abbau des Substrats ermöglichen. Die enge Kopplung der Multiubiquitylierung und der Substrat-Übertragung zum Proteasom bewirkt anschliessend den Abbau des Substrats. Damit entsteht durch UFD2-abhängigen Abbau die Möglichkeit die Qualitätskontrolle auszuweiten und gleichzeitig den schnellen Abbau des Substrates zu gewährleisten.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Fluka, Kodak, Merck, Roth, Riedel de Haen, Serva und Sigma verwendet. Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von den Firmen Roche, MBI, Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia und Promega bezogen. In nahezu allen der unten beschriebenen molekularbiologischen Methoden wurden sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt.

#### 4.1.2 Computer-Hardware und Software

Datenbankrecherchen wurden mit Hilfe folgender Internetdienste durchgeführt. BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), SMART (<http://www.smart.embl-heidelberg.de>), SwissProt (<http://www.expacy.ch>) und PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>). Für Sequenzanalysen wurde das Programm DNA-Star (DNA-Star Inc.) verwendet. Chemilumineszenzfilme (Amersham Biosciences) und getrocknete Polyacrylamidgele wurden mit einem AGFA-Scanner (Duoscan T1200) und mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) digitalisiert. Graphiken und Abbildungen wurden mit den Programmen Canvas 6.0 (Daneba Software) oder Microsoft Powerpoint 2000 erstellt. Die Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft Word2000 auf einem Apple Macintosh G3 Computer.

#### 4.1.3 Antikörper

Es wurden polyklonale sekundäre Antikörper aus Hase (Dianova) und monoklonale sekundäre Antikörper aus der Maus (Sigma) benutzt. Ausserdem wurden folgende primäre Antikörper verwendet: polyklonaler anti-myc (Santa Cruz Biotechnology), monoklonaler anti-Flag (Sigma),

monoklonaler anti-βGal (Promega). Zusätzlich wurde ein ein polyklonaler, bereits mit Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Protein A (Dako) eingesetzt. Weiterhin wurde ein anti-CDC48 Antikörper verwendet, der aus der Immunisierung eines Hasen mit aufgereinigtem CDC48 gewonnen wurde.

#### 4.1.4 *Escherichia coli* Stämme

Für die meisten Arbeiten wurden die *E. coli* Stämme *TG1* oder *XL1-Blue* verwendet. Expression von Proteinen erfolgte stets in *BL21 (DE3) pRIL*-Bakterien.

Stamm	Genotyp
<i>XL1-Blue</i>	Sup E44, hsd R17, rec A1, gyr A46, thi, rel A1, lac -, F' (pro AB +, lac I q, Lac Z M15, Tn10 (tet r))
<i>TG1</i>	D(lac, pro), supE, thi, hsd D5, F' (Tra D36, pro <sup>+</sup> , lac Iq, lacZ DM15)
BL21 (DE3) pRIL	F- ompT hsdS(r <sub>b</sub> -m <sub>b</sub> -) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal I (DE3) endA Hte (argU ileY leuW Cam <sup>r</sup> )

#### 4.1.5 *Escherichia coli* Medien

Den angegebenen Medien wurden Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugegeben: Ampicilin, 200 µg/ml; Kanamycin, 30 µg/ml; Chloramphenicol, 34µg/ml.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1% Bacto Tryptone (Difco) 0.5% Bacto Yeast Extract (Difco) 1% NaCl
LB-Agar	1.5% Agar in LB-Medium

#### 4.1.6 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Alle Experimente wurden mit Stämmen durchgeführt, welche zum Stamm DF5 isogen waren (Finley et al., 1987).

Stamm	Genotyp
WT	<i>MAT a, his3-D200, leu2-3, 2-112, lys2-801, trp1-1 (am), ura3-52</i> (Finley et al., 1987)
<i>ufd1-2</i>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>ufd1-2</i> (Hoppe et al, 2000)
<i>npl4-1</i>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>npl4-1</i> (Hoppe et al., 2000)
$\Delta$ <i>ufd2</i>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>ufd2::LEU</i> (Koegl et al., 1999)
$\Delta$ <i>ufd2 ufd1-2</i>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>ufd1-2, ufd2::LEU</i> (Rape et al, 2001)
$\Delta$ <i>rpn10</i>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>rpn10::HIS</i>
$\Delta$ <i>rad23</i>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>rad23::kanMX4</i>
$\Delta$ <i>dsk2</i>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>dsk23::kanMX4</i>
$\Delta$ <i>rad23</i> $\Delta$ <i>dsk2</i>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>rad23::kanMX4, dsk2::kanMX4</i>
$\Delta$ <i>ufd2</i> $\Delta$ <i>rpn10</i>	<i>ufd2::LEU, rpn10::HIS</i>
$\Delta$ <i>ufd2</i> $\Delta$ <i>rad23</i>	<i>ufd2::LEU, rad23::kanMX4</i>
$\Delta$ <i>ufd2</i> $\Delta$ <i>dsk2</i>	<i>ufd2::LEU, dsk2::kanMX4</i>
<i>RPN11</i> <sup>ProA</sup>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>rpn11::TEV-ProA::kanMX4</i>
<i>RAD23</i> <sup>ProA</sup>	<i>MAT a</i> , isogen zu WT, <i>rad23::ProA::kanMX4</i>

#### 4.1.7 *Saccharomyces cerevisiae* Medien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden Flüssigkulturen bei 30°C in den angegebenen Medien bei 120 rpm geschüttelt. Agarplatten wurden ebenfalls bei 30°C inkubiert.

Medium	Zusammensetzung
YPD/YPGal-Medium	1% Bacto Yeast Extract (Difco) 2% Bacto Peptone (Difco) 2% Glukose (YPD) oder 2% Galaktose (YPGal)
SC-Medium	3.5% Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids 20 g Zucker (Glukose, Galaktose oder Raffinose) 2 g Aminosäure-Mix ohne Selektionsamino säuren pro 1 l Wasser
YPD-G418	200 mg G418 (Sigma: G-9516) pro l Medium

#### 4.1.8 Verwendete *E. coli* Konstrukte

Die folgenden Konstrukte wurden zur Überexpression von Proteinen in *BL21 (DE3) pRIL* Zellen benutzt.

Konstrukt	Protein
pGEX4-T1	Glutathione-S-Transferase (GST)
pGEX4-T1-UFD1	GST-UFD1
pGEX4-T1-DSK2	GST-DSK2
pGEX4-T1-RAD23	GST-RAD23
pGEX4-T1-RPN10	GST-RPN10
pGEX4-T1-UFD2	GST-UFD2
pGEX4-T1-CDC48	GST-CDC48
pGEX-4T1-U-box	GST-U-box
pET21-Ubi-ProßGal	Ubi-ProßGal
pREP4	Repressor-Plasmid für pQE Vektoren (Qiagen)
pQE32-CDC48	His-CDC48
pET28A-NPL4	His-NPL4
pET28A-RAD23	His-RAD23
pET28A-UFD2	His-UFD2
pET3A-Ubi-lacI-ProteinA	Ubi-LacI-ProteinA

#### 4.1.9 *S. cerevisiae* Konstrukte

Folgende Konstrukte wurden für Experimente in *S. cerevisiae* Stämmen verwendet.

Konstrukt	Exprimiertes Protein
YIplac211-Gal <sup>myc</sup> SPT23 <sup>HA</sup>	Galaktose induzierte Expression von SPT23 (Hoppe et al., 2000)
YCplac22-Deg1-Flag-Sec62	Galaktose induzierte Expression von Deg1-Flag-Sec62
pRH244	Expression von <sup>6myc</sup> HMG2
pGBT9-UFD2	2 Hybrid-Konstrukt zur Expression von UFD2
pGBT9-UFD2-N808	2 Hybrid-Konstrukt zur Expression eines N-terminalen UFD2-Fragments (1-808aa)
pGBT9-UFD2-N856	2 Hybrid-Konstrukt zur Expression eines N-terminalen UFD2-Fragments (1-856aa)

pGAD-CDC48	2 Hybrid-Konstrukt zur Expression von CDC48
pGAD-RAD23	2 Hybrid-Konstrukt zur Expression von RAD23

#### 4.1.10 Konstrukte zur Herstellung von Baculoviren

Zur Herstellung von Baculoviren in SF9-Zellen wurden die nachfolgend aufgeführten Konstrukte eingesetzt.

Konstrukt	Exprimiertes Protein
pVL1392-UBA1	UBA1 (Koegl et al., 1999)
pVL1393-UBC4	UBC4 (Koegl et al., 1999)
pVL 1393-UFD4	UFD4 (Koegl et al., 1999)

#### 4.2. Methoden mit *Escherichia coli*

##### 4.2.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Flüssigkulturen in LB-Medium wurden bei 37°C geschüttelt (180 rpm) und Agarplatten ebenfalls bei 37°C inkubiert. Die Dichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Ausstriche auf Agarplatten wurden bis zu einem Monat bei 4°C gelagert. Eine langfristige Lagerung erfolgte, indem man stationäre Kulturen mit Glycerol versetzte (Endkonzentration 20%) und bei -80°C einfror.

##### 4.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Es wurden chemisch kompetente wie auch elektrokompente Zellen hergestellt. Aus einer Einzelkolonie des jeweiligen *E. coli* Stammes wurde bei 37°C eine Übernachtskultur hergestellt, die am folgenden Tag in LB-Medium auf eine optische Dichte von 0.1 verdünnt wurde. Es erfolgte eine weitere Inkubation bis zu einer optischen Dichte von 0.5-0.6 bei 37°C. Nach 30 minütiger Abkühlung der Zellen in Eiswasser wurden die Zellen durch Zentrifugation (5min, 5000g, 4°C) sedimentiert. Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum unter Verwendung vorgekühlter Materialien und Lösungen durchgeführt. Zur Herstellung elektrokompenter Bakterien wurde das Zellsediment in 1 Liter sterilem Wasser resuspendiert und erneut

zentrifugiert. Nach einem weiteren Resuspendieren in 500ml sterilem Wasser und nachfolgender Zentrifugation wurden die Zellen in 20ml 10%igem sterilen Glycerin resuspendiert und abermals durch Zentrifugation sedimentiert. Schliesslich wurden das Zellsediment in 3ml 10%igem sterilen Glycerin resuspendiert und in 50  $\mu$ l Volumina aliquotiert. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde das Zellsediment in 200ml kalter  $\text{MgCl}_2$  Lösung (100mM) resuspendiert. Nach einer Zentrifugation erfolgte ein Resuspendieren des Sediments in 400ml  $\text{CaCl}_2$  Lösung (100mM). Nach 30minütiger Abkühlung in Eiswasser wurde erneut zentrifugiert und das Sediment in 20ml einer sterilen Lösung aus 15% Glycerin und 100mM  $\text{CaCl}_2$  aufgenommen und in 50  $\mu$ l Volumina bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **4.2.3 Transformation von DNA in Bakterienzellen**

Plasmide wurden in  $\text{CaCl}_2$ -kompetente Bakterienzellen mittels Hitzeschock übertragen. Dazu wurden 50  $\mu$ l Bakteriensuspension und 1  $\mu$ l Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz zusammengegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzepuls von 90 Sekunden bei  $42^{\circ}\text{C}$  wurde 700  $\mu$ l LB-Medium zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt, kurz abzentrifugiert und nach Resuspension in 300  $\mu$ l LB-Medium auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Für Transformation von DNA mittels Elektroporation wurde der Ligationsansatz zunächst durch Mikrodialyse gegen  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf Millipore-Filtern entsalzt, zu 50  $\mu$ l kompetenten Bakterien gegeben und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite überführt. Die Elektroporation erfolgte durch einen Puls von 1.8 kV/ 25  $\mu$ F/ 200 W im Biorad Gene Pulser II. Die Dauer des Pulses betrug in der Regel 4-5 ms. Die Zellen wurden anschließend mit 700  $\mu$ l LB-Medium versetzt, 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt und schliesslich auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.



### 4.3. Methoden mit *Saccharomyces cerevisiae*

#### 4.3.1 Kultivierung von Hefen

Flüssigkulturen wurden mit Hefen aus frischen Plattenausstrichen angeimpft. Zur Herstellung grösserer Volumina (ab 250ml) wurden Vorkulturen angezogen. Das Wachstum erfolgte bei 30°C, wenn nicht anders vermerkt. Die Zelldichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600nm bestimmt. Für kurze Zeit wurden Hefen auf Platten bei 4°C gelagert, eine langfristige Lagerung erfolgte durch Zugabe von Glycerin (20% finale Konzentration) zu der Kultur und anschliessender Aufbewahrung bei –80°C.

#### 4.3.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

1 ml einer Übernachtskultur im Selektionsmedium wurde zu 20 ml frischen Mediums gegeben und bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0.8 inkubiert. Pro Transformation wurden 2 ml Aliquots dieser Kultur verwendet und bei 3000 rpm, 20 °C, für 3 min abzentrifugiert. Das Hefepellet wurde in 1 ml TE/LiOAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Zum Pellet wurden 5 µl einzelsträngige DNA (denaturierte Lachsspermien-DNA) gegeben und zur Transformation benutzt.

#### 4.3.3 Transformation kompetenter Hefezellen

Für eine Transformation wurden gereinigte Plasmid-DNA oder das Produkt einer PCR-Reaktion zu kompetenten Zellen gegeben (4.3.2) und mit 500 µl TE-PEG versetzt. Die Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Thermoschüttler inkubiert und schliesslich 50 µl DMSO zugegeben. Nach einem 15 minütigen Hitzeimpuls bei 42°C wurden die Hefen zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment in Wasser resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Bei Kanamycin-Resistenz wurden die Hefezellen in 2ml YPD resuspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 300 µl Wasser aufgenommen und auf YPD-G418 Platten ausgestrichen.

#### **4.3.4 Integrative Transformation über homologe Rekombination**

Integrative Plasmide (YIp) enthalten nur einen Selektionsmarker, aber keine autonomen Replikationselemente. Sie können nur nach Integration in das Hefegenom über homologe Rekombination stabil vererbt werden. Das integrative Plasmid wurde zunächst durch eine spezifische Restriktionsendonuklease im Markergen linearisiert und wie bereits beschrieben zur Transformation (4.3.3) eingesetzt. Zudem wurden auch PCR-Produkte über homologe Rekombination transformiert, um Hefegene *in vivo* mit Epitopen am C-Terminus zu markieren (Knop et al., 1999). Die PCR-Reaktionen wurden mit Markierungskassetten und Oligonukleotidsequenzen durchgeführt, welche eine Homologie mit dem C-Terminus des betreffenden Gens besitzen. Der Nachweis der entstandenen Fusionsproteine erfolgte im Westernblot.

#### **4.3.5 Serielle Verdünnungsreihen von Hefezellen**

Für eine phänotypische Analyse von Hefestämmen wurden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf Platten des entsprechenden Selektionsmediums getüpfelt. Dazu wurden Hefekulturen in YPD oder Selektivmedium aus der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0.5-1.0$ ) eingesetzt. Die Kulturen wurden mit sterilem Wasser auf eine OD von 0,2 verdünnt und 4 weitere Verdünnungen (1:5) pipettiert. Es wurden 5  $\mu$ l der Verdünnungen nebeneinander auf die Platten getüpfelt und unter den angegebenen Bedingungen inkubiert. Ölsäurehaltige Platten wurden mit einer finalen Konzentration von 0.2% bzw. 0.02% Ölsäure supplementiert.

#### **4.3.6 Analyse der Proteinstabilität im Promotor Shutoff-Experiment**

Die Stabilität eines Proteins in *S. cerevisiae* kann nach reguliertem Abschalten seiner Expression untersucht werden. Hierfür wurde das entsprechende Gen unter die Kontrolle des Galaktose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren *GAL1,10*-Promotors gebracht. Hefekulturen wurden in YPGal-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von 1 bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden bei 3500 rpm, 20 °C für 3 min abzentrifugiert und schnell in

vorgewärmtem YPD-Medium, dem 0.5 mg/ml Cycloheximid zugesetzt wurde, resuspendiert. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 1 ml der Hefesuspension entnommen und die Proteine durch Zugabe von TCA gefällt. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 rpm, 4°C für 15 min abzentrifugiert, in 50 µl HU-Puffer (8M Harnstoff, 5% SDS, 200 mM Tris pH 6.8, 1% Bromphenolblau, 1,5% DTT) für 15 min bei 65°C inkubiert und nach denaturierender Gelelektrophorese im entsprechenden Immunoblot analysiert. Bei Expression eines Gens unter dem *ADH1*-Promotor wurden die Hefekulturen in YPD bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 bei 30°C angezogen und wie oben beschrieben weiter prozessiert.

#### **4.3.7 Herstellung von Proteinextrakten**

Eine Hefesuspension (maximale OD<sub>600</sub> von 2) wurde bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3500 rpm, 2 min) und in eiskaltem Lysepuffer (PBS, 2mM PMSF) aufgenommen. Zu der Mischung wurden bis ca. 2 mm unter den Meniskus Glasperlen (Glass beads, acid-washed, R 425-600µm, Sigma) zugegeben. Der Ansatz wurde daraufhin je eine Minute auf dem Vortex-Schüttler geschüttelt und ebenso lange auf Eis abgekühlt. Der Vorgang wurde drei- bis viermal wiederholt, bevor die Zelldebris durch eine 10-minütige Zentrifugation (10.000g, 4°C) entfernt wurde. Der Überstand wurde entweder mit Probenpuffer versetzt oder für weitere Experimente eingesetzt. Um grössere Mengen an Extrakt herzustellen, wurden entsprechend grössere Volumina der Hefekultur bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3500rpm, 5min) und in eiskaltem Lysepuffer aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte in einer vorgekühlten French<sup>®</sup> pressure cell press (Sim-Aminco). Nach dreimaliger Anwendung wurden die Extrakte wie bereits erwähnt prozessiert.

#### **4.3.8 Nachweis von Interaktionen im *Two-Hybrid-System***

Die DNA-Sequenz eines zu untersuchenden Gens wurde im Leseraster hinter die aktivierende Domäne des GAL-Transkriptionsfaktors (pGAD-Vektor) kloniert. Die DNA-Sequenz eines anderen Proteins wurde entsprechend hinter die DNA-bindende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (pGBT9-

Vektor) kloniert. Der Hefestamm PJ69-4a wurde mit beiden Vektoren sowie mit den jeweiligen Leervektoren als Kontrolle transformiert. Die transformierten Hefezellen wurden auf SC-Leu-Trp-Platten angezogen und anschliessend auf SC-Leu-Trp-His Platten analysiert.

#### 4.4. Molekularbiologische Techniken

##### 4.4.1 Reinigung und Präzipitation von DNA

Zur Aufreinigung von DNA wurden DNA-haltige Lösungen 1 bis 3 mal mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform Gemisches (Roth) extrahiert. Zur Beseitigung von Phenol-Resten wurde abermals mit Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Na-Acetat (3M, pH 5.2) und 2,5 Volumen Ethanol zur DNA-Lösung wurde der Ansatz gemischt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000g,  $20^{\circ}\text{C}$ ) wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

##### 4.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei einer Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  für doppelsträngige DNA.

##### 4.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mittels Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Die unter physiologischen Bedingungen negativ geladene DNA wurde nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen an einen Anionenaustauscher gebunden und nach intensivem Waschen schliesslich eluiert. Dies erfolgte je nach Massstab mit dem Qiagen MiniPrep Kit oder MaxiPrep Kit nach Angaben des Herstellers.

#### 4.4.4 Restriktionsverdau von DNA

Verdaureaktionen mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Für Reaktionen im präparativen Massstab wurden 5  $\mu\text{g}$  und für analytische Reaktionen 1  $\mu\text{g}$  der Plasmid-DNA zum Verdau eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde für 90 Minuten bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Die erforderlichen Pufferbedingungen wurden über 5-fach konzentrierte Puffer des Herstellers eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde schliesslich einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

#### 4.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in Agarose-Gelen wurde zur präparativen Reinigung sowie zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Zur Analyse von Fragmenten von bis zu 500 bp Länge wurde eine Agarosekonzentration von 1.8 % (w/v) in 1 x TBE-Puffer (5 x TBE: 54 g Tris, 27.5 g Borsäure, 20 ml EDTA (10 mM), pH 8.35) verwendet. Längere Fragmente wurden mit Agarosekonzentrationen von 0.8 % (w/v) in 1 x TBE-Puffer (5 x TBE: 54 g Tris, 27.5 g Borsäure, 20 ml EDTA (10 mM), pH 8.35) untersucht. Zu 100 ml der geschmolzenen Agaroselösung wurden vor Gießen des Gels 5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid (10 mg/ml) gegeben. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben mit 20 % (v/v) Probenpuffer (6 ml ddH<sub>2</sub>O, 250  $\mu\text{l}$  10 % SDS, 2.5 ml Glycerin, 500  $\mu\text{l}$  EDTA (0.5 M), Orange G) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100V in 1 x TBE-Puffer durchgeführt. Die Analyse der Gele erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm. Als Größenstandard wurden BstEII fragmentierte Lambda-DNA (New England Biolabs), HaeIII fragmentierte PX174-DNA (New England Biolabs) oder die „1kb-Leiter“ (Gibco-BRL) verwendet.

#### 4.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierende Bande wurde unter langwelligem UV-Licht (324 nm) detektiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschliessend wurde die DNA mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die isolierte DNA wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

#### 4.4.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um Religationen des Vektors bei Klonierungen zu vermeiden, wurden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Die Reaktion erfolgte mit etwa 0,1 U der Calf Intestine Phosphatase (NEB) pro 20 pmol DNA bei 37°C für 30 Minuten.

#### 4.4.8 Ligation

Bei der Ligation wurde das Insert in dreifachem molaren Überschuss eingesetzt. Ligationsreaktionen fanden in einfach konzentriertem Ligasepuffer, 0.5 mM ATP, 4 U T4-Ligase (NEB) statt und wurden bei Raumtemperatur für 3 Stunden oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Produkte wurden gegen ddH<sub>2</sub>O mikrodialysiert. 1 µl des Ansatzes wurden zur Transformation elektrokompenter *E. coli* XL1 Blue-Zellen verwendet.

#### 4.4.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 100 µl mit etwa 100 ng Plasmid-DNA bzw. 0.5 µg genomischer DNA in ThermoPol-Puffer (NEB) durchgeführt. Es wurden je 0.5 mM deoxy-Nukleotide, 0.5 µM der entsprechenden Oligonukleotide (*primer*) und 2-5 U Vent-Polymerase eingesetzt. Die PCR-Reaktion fand in einem „Mastercycler“-Gerät (Eppendorf) statt. Standard-PCR-Reaktionen wurden 5 min bei 94 °C denaturiert, anschließend wurden 25-30 Zyklen (94°C, 30s; 45-55°C, 30s; 72°C, 1min/kb Plasmid) durchlaufen. Die Reaktionen wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

#### **4.4.10 Diskontinuierliche PCR-Reaktion**

Zur Amplifikation der Epitop-Kassetten zur chromosomalen Epitop-Markierung wurde ein diskontinuierliches PCR-Protokoll verwendet. Nukleotide, Plasmid-DNA und Oligonukleotide wurden wie unter 4.4.9 beschrieben zusammengegeben. Die Reaktion wurde durch 2  $\mu$ l Polymerase-Mix (2  $\mu$ l Taq-Polymerase, 5 U/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l Vent-Polymerase, 2 U/ $\mu$ l) während einer zweiminütigen Denaturierungsphase (94°C) gestartet. Zunächst wurden 9 Zyklen bei niedrigerer Schmelztemperatur (94°C, 20s; 45-50°C, 30s; 68°C, 2-5min), anschließend 20 Zyklen unter stringenteren Bedingungen (94°C, 30s; 50-60°C, 30s; 3min, 68°C) durchlaufen. Die Verlängerungszeit nahm in den letzten 20 Zyklen pro Zyklus um 20 Sekunden zu. Die Produkte wurden in der Agarosegel-Elektrophorese analysiert.

#### **4.4.11 Sequenzierung von DNA**

Zur Sequenzierung wurde 1  $\mu$ g der Plasmid-DNA mit 4  $\mu$ l DYEnamic ET terminator cycle sequencing premix (Amersham) und 10 pmol des Oligonukleotids in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l angesetzt. Es wurden 25 Zyklen (95°C, 20s; 45°C, 15s; 60°C, 1min) durchlaufen. Die Proben wurden durch Ethanol gefällt und in Gelladepuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte schliesslich in einem Abi Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).

#### **4.4.12 Autoradiographie**

Nach Auftrennung radioaktiv markierter Proteine im SDS-PAGE wurden die Polyacrylamidgele im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde zur Exposition in einer Kassette mit einem Spezialfilm (Kodak) belichtet.

### **4.5. Proteinbiochemische Techniken**

#### **4.5.1 Polyacrylamid-Elektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in vertikalen Kammern. In einer Gelgießkammer wurden jeweils fünf Gele gegossen, die je

nach Auflösungsanforderung zwischen 6 und 12 % Polyacrylamid enthielten. Zunächst wurden die Trenngele ( Ansatz für 5 Gele (10% Polyacrylamid): 9.1 ml Protogel, 13.8 ml 1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 275  $\mu$ l 10 % SDS, 4.1 ml ddH<sub>2</sub>O, 275  $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfatlösung, 5.5  $\mu$ l N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) gegossen und vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach gründlichem Spülen mit Wasser wurden die Sammelgele (Ansatz für 5 Gele: 1.5 ml Protogel, 1.5 ml 1 M Tris/HCl pH 6.8, 120  $\mu$ l 10 % SDS, 8.7 ml ddH<sub>2</sub>O, 120  $\mu$ l 10 % Ammoniumpersulfatlösung, 12  $\mu$ l N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) gegossen und die Kämmen eingesetzt. Für einige Anwendungen war eine Auftrennung in Gradientengele erforderlich. Dazu wurden gekaufte Gradientengele und die entsprechenden Puffer (Invitrogen) benutzt. Die Proteinproben wurden mit einem 5 fachen Protein-Probepuffer (2% SDS, 100 mM DTT, 60 mM Tris pH 6.8, 1% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt und bei 95°C für 5 Minuten erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Vertikal-Elektrophoresekammer (Hofer) mittels eines Elektrophorese-Puffers (50 mM Tris pH 8.0, 384 mM Glycin, 0,1% SDS) bei 25mA durchgeführt.

#### **4.5.2 Nachweis von Proteinen im Immunoblot**

Die zu analysierenden Proteinproben wurden durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und im Tank in einfach konzentriertem Transferpuffer (50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0.01 % SDS, 20 % Methanol) auf PVDF-Membranen (Millipore) transferiert. Der Transfer fand bei einer konstanten Spannung von 70 V für 120 bis 180 Minuten im Kühlraum statt. Die Membran wurde zunächst für 30 Minuten in 5% Magermilchpulver in TBST (137 mM NaCl, 25 mM Tris pH 8.0, 2.6 mM KCl, 0,1% Tween 20) inkubiert. Die Bindung des ersten Antikörpers erfolgte in einer frischen TBST-Milch Lösung über Nacht bei 4°C. Nach Waschen der Membran in TBST wurde in TBST-Milch Lösung mit dem zweiten Antikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen, mit ECL-Lösung (Amersham) inkubiert und mit einem ECL-Hyperfilm (Amersham) in einer Kassette exponiert.



### 4.5.3 Bestimmung der Protein-Konzentration

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

### 4.5.4 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Zur Visualisierung von Proteinbanden wurden Polyacrylamidgele für eine Stunde in einer Coomassie-Lösung (Coomassie R-250 in 10% Essigsäure, 20% Methanol) gefärbt. Anschliessend wurde mit einer Entfärbelösung (10% Essigsäure, 20% Methanol) gewaschen bis der Hintergrund des Geles klar wurde.

### 4.5.5 Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Für die Reinigung von Proteinen aus Bakterien wurde grundsätzlich der Stamm *BL21 (DE3) pRIL* verwendet. Übernacht-Kulturen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0.05 verdünnt. Bei einer  $OD_{600}$  von 0.6 wurde 0.1-1 mM IPTG zugegeben und die Bakteriensuspension weitere vier Stunden bei 30°C geschüttelt. In den meisten Fällen fand die Expression der Bakterien jedoch nach IPTG-Zugabe über Nacht bei Raumtemperatur statt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, 10 min) sedimentiert und wurden in eiskaltem PBS-Puffer mit einfach konzentriertem Protease-Inhibitor-Mix (Roche), 2mM PMSF (Roche) und 0.2 mg/ml Lysozym resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Ultraschall im Bandelin Sonoplus HD2200. Die Zelldebris wurde durch Zentrifugation (15.000 rpm, 4°C, 30 min) entfernt und der Überstand mit der entsprechenden Affinitätsmatrix (Glutathion-Sepharose bei GST-Fusionsproteinen, Ni-NTA-Agarose bei His<sub>6</sub>-markierten Proteinen, IgG-Sepharose bei ProteinA-Fusionsproteinen und p-Aminobenzyl 1-Thio-β-D-Galactopyraniside-Agarose bei βGal-Fusionsproteinen) 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Dabei richtete sich die Menge der eingesetzten Matrix nach dem Expressionsniveau des jeweiligen Proteins. Die Lösung wurde in eine Säule (10 ml) gegossen und entweder mit wenigstens 50 Säulenvolumina PBS (0.1

% Triton X-100) oder nach Angaben des Herstellers gewaschen. Die Proteine wurden anschließend von der Säule eluiert (10 mM Tris/HCl pH7.5, 10 mM Glutathion bei GST-Fusionsproteinen; 10 mM Tris/HCl, 200 mM Imidazol bei His<sub>6</sub>-markierten Proteinen und 100 mM Glycin/HCl pH 3.0 bei ProteinA-Fusionsproteinen und 0.1% Natriumborat pH 10.0 bei  $\beta$ Gal-Fusionsproteinen), mit Glycerin (10% Endkonzentration) versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **4.5.6 Native Reinigung von Proteinen aus Insektenzellen**

Sf9-Zellen wurden bei  $27^{\circ}\text{C}$  in Sf-900 II SFM Medium mit 10 % FCS (Sigma) kultiviert. Adhärenz wachsende Zellen wurden bei etwa 90 % Konfluenz durch Auf- und Abziehen in der Pipette von der Kulturflasche abgelöst und in frisches Medium in einem Verhältnis von 1:3 verdünnt. Die Zellen wurden nach dem Verdünnen mit dem entsprechenden Virus infiziert, der zuvor aus einer Transfektion mit dem Expressionsplasmid (vergl. 4.1.10) und anschließender Ampifizierung gewonnen wurde. Nach einer Inkubation für vier Tage bei  $27^{\circ}\text{C}$  wurden die SF9-Zellen von der Kulturflasche gelöst, vorsichtig (1000 rpm,  $20^{\circ}\text{C}$ , 5 min) sedimentiert und einmal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 x Complete Protease Inhibitor Mix) resuspendiert und im Wheaton Gewebedisruptor lysiert. Zellbruchstücke wurde durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand durch eine weitere Zentrifugation (14.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min) geklärt und nach Zugabe von Glycerin (10% Endkonzentration) in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### **4.5.7 Dialyse von Proteinen**

Nach der Aufreinigung wurden Proteine gegen bestimmte Puffer, meist Assay-Puffer, dialysiert. Für grosse Proteinmengen wurden Dialyseschläuche (Spectrum Laboratories Inc.) benutzt. Nach Einfüllen der Proteinlösung wurde der Dialyseschlauch mit Klammern verschlossen und in 4 bis 5 Litern der gewünschten vorgekühlten Pufferlösung über Nacht im Kühlraum unter Rühren inkubiert. Kleinere Proteinmengen wurden in Vivaspin-Konzen-

tratoren (Vivascience) in einer Zentrifuge (3000rpm, 4°C, 30 min) gegen den gewünschten Puffer dialysiert.

#### **4.5.8 Gelfiltration**

Zur weiteren Aufreinigung wurden die Proteine einer Gelfiltration mit dem Äkta Explorer (Amersham) unterzogen. Konzentrierte Proteinlösungen wurden injiziert und, je nach Molekulargewicht des Proteins oder Proteinkomplexes, mit einer Superose 6 oder Superose 12 Säule (Amersham) fraktioniert. Der für die Gelfiltration verwendete Puffer richtete sich dabei nach der weiteren Verwendung des Proteins. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mittels Polyacrylamid-Elektrophorese oder anhand der UV-Absorption analysiert und die aufgereinigten Fraktionen schliesslich vereinigt.

#### **4.5.9 Herstellung des UFD1/NPL4 Komplexes**

Zur Herstellung des <sup>GST</sup>UFD1/<sup>HIS</sup>NPL4 Komplexes wurden die beiden Proteine in *BL21 (DE3) pRIL* Zellen koexprimiert. Die Bakterien wurden bei einer optischen Dichte von 0.2 bis 0.3 über Nacht mit 1 mM IPTG bei Raumtemperatur induziert. Die Aufreinigung erfolgte wie bereits beschrieben (4.5.5), wobei zunächst eine Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose und anschliessend mit Glutathion-Sepharose durchgeführt wurde. Auf diese Weise wurden ausschliesslich heterodimere Proteinkomplexe aufgereinigt. Für einige Anwendungen wurde der GST-Teil des UFD1-Fusionsproteins durch Thrombin abgeschnitten.

#### **4.5.10 Abspaltung von GST durch Thrombin**

Die Abtrennung des GST-Teiles eines Fusionsproteins wurde durch eine Inkubation mit Thrombin (Novagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Thrombin durch PMSF inhibiert, der GST-Teil und verbleibendes ungeschnittenes Material an Gluthation-Sepharose gebunden. Für einige Anwendungen wurde eine Gelfiltration zur weiteren Aufreinigung des Proteinkomplexes durchgeführt.

#### 4.5.11 Herstellung des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes

Der CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplex wurde durch Inkubation von rekombinantem CDC48 und UFD1/NPL4 Proteinkomplex hergestellt. Dazu wurden CDC48 und der heterodimere Komplex bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Der Ansatz wurde schliesslich durch eine Gelfiltration mit einer Superose 6 Säule aufgereinigt und die entsprechenden Fraktionen vereinigt.

#### 4.5.12 GST-Pulldown Experimente

Für Bindungsstudien wurden GST-Fusionsproteine in äquimolaren Mengen für 60 Minuten bei 4°C in PBS (0.1% Triton X-100) mittels eines Drehrades an Gluthathion-Sepharose gebunden. Nach erfolgter Bindung wurden der Ansatz zentrifugiert (1000rpm, 4°C, 2 min) und der Überstand abgenommen. Nach einmaligem Waschen (500 µl) mit dem Bindepuffer wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Der Ansatz wurde nun mit rekombinanten Proteinen, Zellextrakten oder ubiquitylierten Proteinen im gleichen Puffer für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach intensivem Waschen mit dem Bindepuffer wurde die sedimentierte Sepharose-Matrix in SDS-Probepuffer erhitzt und schliesslich der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Die Analyse des Experimentes erfolgte durch Immunoblotting oder Coomassie Färbung.

#### 4.5.13 *In vitro* Ubiquitylierung

Als Substrate der *in vitro*-Ubiquitylierungsreaktionen wurden GST, GST-U-BOX, Ubi-ProβGal oder Ubi-lacI-ProteinA eingesetzt. Das Substrat wurde mit E1, E2 und E3 aus Insektenzellysat, und aufgereinigtem E4 (<sup>HIS</sup>UFD2), in Gegenwart von 10 mM ATP, einem ATP regenerierenden System, 0.2 mg/ml Ubiquitin (Affiniti) in einfach konzentriertem Ubiquitylierungs-Puffer (25 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) versetzt und für 60 bis 90 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Kochen in 1x SDS-Probepuffer abgestoppt und nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf Membranen geblottet. Die Analyse wurde entsprechend durch anti-GST-, anti-βGal- bzw. anti-ProteinA-Antikörper durchgeführt. Für die *in vitro*-Ubiquitylierung des cyclin-B N terminalen Fragments wurde Hefe E1 (Boston

Biochem Inc.), das in *E. coli* überexprimierte und aufgereinigte E2-Enzym UbcX und APC/C, welcher aus „high $\Delta$ 90“ Extrakt (Stemmann et al., 2001) durch Immunopräzipitation mit anti-CDC27 Antikörper (Sigma-Aldrich) erhalten wurde, benutzt Die Ubiquitylierungsreaktion wurde wie beschrieben durchgeführt (Kramer et al., 1998).

#### **4.5.14 *In vitro* Ubiquitylierung in Gegenwart von CDC48**

Die *in-vitro* Ubiquitylierung wurde auch in Gegenwart des CDC48<sup>UFD1/NPL4</sup> Komplexes durchgeführt. Dazu wurden sowohl CDC48, UFD1/NPL4 als auch BSA gegen den Ubiquitylierungspuffer dialysiert. Die Reaktionsansätze gemäß 4.5.13 wurden mit den jeweils angegebenen molaren Mengen der Proteine versetzt und mit Ubiquitylierungspuffer auf gleiche Volumina aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für 60 bis 90 Minuten bei 30°C wie beschrieben. Die Analyse erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblotting.

#### **4.5.15 Immunpräzipitation**

Zur Durchführung von Immunpräzipitationen wurden Hefestämme in einem Volumen von 100ml bei 30°C inkubiert. Thermosensitive Stämme wurden im Anschluss daran für 3 Stunden bei der restriktiven Temperatur geschüttelt. Nach Zentrifugation der Hefezellen (3500 rpm, 20°C) wurden diese in einen geeigneten Puffer überführt und nach Zugabe von Glasperlen durch starkes Schütteln auf dem Vortex-Schüttler lysiert. Die Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation (700g, 4°C) abgetrennt. Das Lysat wurde teilweise durch zusätzliche Zentrifugationsschritte (20.000g, 4°C) geklärt. Zu den gewonnenen Überständen wurden etwa 2 $\mu$ g Antikörper zugegeben und die Lösung für 120 Minuten auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurden die Antikörper/Antigen-Komplexe nach Zugabe von ProteinG-Agarose gefällt. Die Reaktionen wurden in einem geeigneten Puffer gewaschen und in SDS-Probepuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte nach SDS-PAGE im Immunoblot.

## 4.6. Zellbiologische Techniken

### 4.6.1 Stabile Transformation von HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden in DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kultiviert, welches mit 10% Fötalem Kälber Serum supplementiert war. Die Transformation der Zellen mit den jeweiligen Plasmide erfolgte durch Effectene (Qiagen). Zur Herstellung stabil p97 exprimierender Zellen wurde das Konstrukt pCMV2B-p97 zur Transformation eingesetzt und dem Medium G418 zur Selektion beigefügt. Die heranwachsenden Kolonien wurden vereinzelt und im Selektionsmedium weiter kultiviert. Die erhaltenen Zelllinien wurden anschliessend mittels Immunoblotting auf eine Integration des Genes überprüft.

### 4.6.2 Immunfluoreszenz Mikroskopie

Transformierte HeLa Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden diese für 10 Minuten mit Methanol fixiert. Anschliessend wurden die Zellen durch eine Lösung aus PBS (0.5% Triton X-100) für 15 Minuten permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Zellen auf dem Deckglas wurden nun in eine Lösung aus PBS (0.05% Triton X-100) überführt und für 5 Minuten in einer DAPI Lösung (2.5 $\mu$ g/ml DAPI in 50% Glycerin) inkubiert. Nach Waschen in PBS (0.05% Triton X-100) wurde der primäre Antikörper zugegeben. Die Zellen wurden in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert und anschliessend dreimal mit PBS gewaschen. Nach Überführung in PBS (0.05% Triton X-100) wurde der mit Farbstoff markierte sekundäre Antikörper zugegeben und für 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach intensivem Waschen mit PBS wurden die Deckgläser mit einer Mowiol Lösung (Calbiochem) benetzt und im Dekonvolutionsmikroskop untersucht.

## 5. Literaturverzeichnis

Amos, L. A., and Cross, R. A. (1997). Structure and dynamics of molecular motors. *Curr Opin Struct Biol* 7, 239-246.

Aravind, L., and Koonin, E. V. (2000). The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* 10, R132-134.

Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., and Emr, S. D. (2002a). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* 3, 271-282.

Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., and Emr, S. D. (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell* 3, 283-289.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.

Bays, N. W., Wilhovsky, S. K., Goradia, A., Hodgkiss-Harlow, K., and Hampton, R. Y. (2001). HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell* 12, 4114-4128.

Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., and Jentsch, S. (2002). Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4 )chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *Embo J* 21, 615-621.

Bruderer, R. M., Brasseur, C., and Meyer, H. H. (2004). The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *J Biol Chem*.

Busch, H., and Goldknopf, I. L. (1981). Ubiquitin - protein conjugates. *Mol Cell Biochem* 40, 173-187.

Cao, K., Nakajima, R., Meyer, H. H., and Zheng, Y. (2003). The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell* 115, 355-367.

Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., and Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.

Chen, L., and Madura, K. (2002). Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol* 22, 4902-4913.

Dai, R. M., Chen, E., Longo, D. L., Gorbea, C. M., and Li, C. C. (1998). Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with I $\kappa$ B $\alpha$  and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Biol Chem* *273*, 3562-3573.

Dai, R. M., and Li, C. C. (2001). Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol* *3*, 740-744.

Decottignies, A., Evain, A., and Ghislain, M. (2004). Binding of Cdc48p to a ubiquitin-related UBX domain from novel yeast proteins involved in intracellular proteolysis and sporulation. *Yeast* *21*, 127-139.

DeMartino, G. N., Moomaw, C. R., Zagnitko, O. P., Proske, R. J., Chu-Ping, M., Afendis, S. J., Swaffield, J. C., and Slaughter, C. A. (1994). PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* *269*, 20878-20884.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. (2000). Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique multiubiquitin chain. *Cell* *103*, 351-361.

Dreveny, I., Kondo, H., Uchiyama, K., Shaw, A., Zhang, X., and Freemont, P. S. (2004). Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *Embo J* *23*, 1030-1039.

Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., and Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem* *279*, 26817-26822.

Fan, C. M., and Maniatis, T. (1991). Generation of p50 subunit of NF- $\kappa$ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* *354*, 395-398.

Finley, D., Ozkaynak, E., and Varshavsky, A. (1987). The yeast multiubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* *48*, 1035-1046.

Fu, H., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D., and Vierstra, R. D. (1998). Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit M $\beta$ 1. *J Biol Chem* *273*, 1970-1981.

Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T., and Kobayashi, H. (2002). Budding yeast Dsk2p is a multiubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 745-750.



Ghislain, M., Dohmen, R. J., Levy, F., and Varshavsky, A. (1996). Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* *15*, 4884-4899.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* *94*, 615-623.

Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* *349*, 132-138.

Gottesman, S., Maurizi, M. R., and Wickner, S. (1997). Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell* *91*, 435-438.

Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* *7*, 1062-1067.

Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* *386*, 463-471.

Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., and Heuser, J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* *90*, 523-535.

Hartmann-Petersen, R., and Gordon, C. (2004). Proteins interacting with the 26S proteasome. *Cell Mol Life Sci* *61*, 1589-1595.

Hartmann-Petersen, R., Tanaka, K., and Hendil, K. B. (2001). Quaternary structure of the ATPase complex of human 26S proteasomes determined by chemical cross-linking. *Arch Biochem Biophys* *386*, 89-94.

Hershko, A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* *21*, 445-449.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* *61*, 761-807.

Hershko, A., Leshinsky, E., Ganoh, D., and Heller, H. (1984). ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 1619-1623.

Hetzer, M., Meyer, H. H., Walther, T. C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G., and Mattaj, I. W. (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* *3*, 1086-1091.

Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 195-201.

Hicke, L., and Riezman, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* *84*, 277-287.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* *30*, 405-439.

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

Hofmann, K., and Bucher, P. (1996). The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci* *21*, 172-173.

Hofmann, R. M., and Pickart, C. M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel multiubiquitin chains for DNA repair. *Cell* *96*, 645-653.

Hoppe, T., Cassata, G., Barral, J. M., Springer, W., Hutagalung, A. H., Epstein, H. F., and Baumeister, R. (2004). Regulation of the myosin-directed chaperone UNC-45 by a novel E3/E4-multiubiquitylation complex in *C. elegans*. *Cell* *118*, 337-349.

Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* *102*, 577-586.

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5249.

Huyton, T., Pye, V. E., Briggs, L. C., Flynn, T. C., Beuron, F., Kondo, H., Ma, J., Zhang, X., and Freemont, P. S. (2003). The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å. *J Struct Biol* *144*, 337-348.

Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K. I., and Takahashi, R. (2002). CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* *10*, 55-67.

Jentsch, S. (1992). The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* *26*, 179-207.

Jentsch, S., McGrath, J. P., and Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* *329*, 131-134.

Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M., and Varshavsky, A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* *270*, 17442-17456.

Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* *106*, 145-155.

Kim, I., Mi, K., and Rao, H. (2004). Multiple interactions of RAD23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis. *Mol Biol Cell* *15*, 3357-3365.

Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Castillo, V., and Goldberg, A. L. (1999). Proteasome active sites allosterically regulate each other, suggesting a cyclical bite-chew mechanism for protein breakdown. *Mol Cell* *4*, 395-402.

Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* *15*, 963-972.

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

Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T. P., Pappin, D., Freemont, P., and Warren, G. (1997). p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* *388*, 75-78.

Kramer, E. R., Gieffers, C., Holzl, G., Hengstschlager, M., and Peters, J. M. (1998). Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr Biol* *8*, 1207-1210.

Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L., and Pickart, C. M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the multiubiquitin degradation signal. *Nature* *416*, 763-767.

Lambertson, D., Chen, L., and Madura, K. (1999). Pleiotropic defects caused by loss of the proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *153*, 69-79.

Latterich, M., Frohlich, K. U., and Schekman, R. (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* *82*, 885-893.

- Lin, L., and Ghosh, S. (1996). A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol* 16, 2248-2254.
- Lin, L., and Kobayashi, M. (2003). Stability of the Rel homology domain is critical for generation of NF-kappa B p50 subunit. *J Biol Chem* 278, 31479-31485.
- Lucero, P., Penalver, E., Vela, L., and Lagunas, R. (2000). Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 182, 241-243.
- Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D., and Fröhlich, K. U. (1998). Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol Biol Cell* 9, 131-141.
- Mayer, T. U., Braun, T., and Jentsch, S. (1998). Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *Embo J* 17, 3251-3257.
- McGrath, J. P., Jentsch, S., and Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J* 10, 227-236.
- Meyer, H. H., Kondo, H., and Warren, G. (1998). The p47 co-factor regulates the ATPase activity of the membrane fusion protein, p97. *FEBS Lett* 437, 255-257.
- Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D., and Warren, G. (2000). A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *Embo J* 19, 2181-2192.
- Muratani, M., and Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.
- Nussbaum, A. K., Dick, T. P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanovic, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D. H., Huber, R., *et al.* (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12504-12509.
- Ohi, M. D., Vander Kooi, C. W., Rosenberg, J. A., Chazin, W. J., and Gould, K. L. (2003). Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* 10, 250-255.
- Ortolan, T. G., Tongaonkar, P., Lambertson, D., Chen, L., Schaubert, C., and Madura, K. (2000). The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nat Cell Biol* 2, 601-608.

Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., and 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.

Patel, S. K., Indig, F. E., Olivieri, N., Levine, N. D., and Latterich, M. (1998). Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion. *Cell* *92*, 611-620.

Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* *21*, 921-926.

Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* *9*, 931-943.

Pfleger, C. M., and Kirschner, M. W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* *14*, 655-665.

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* *70*, 503-533.

Pilon, M., Schekman, R., and Romisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *Embo J* *16*, 4540-4548.

Raasi, S., Orlov, I., Fleming, K. G., and Pickart, C. M. (2004). Binding of multiubiquitin chains to ubiquitin-associated (UBA) domains of HHR23A. *J Mol Biol* *341*, 1367-1379.

Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K. U., Diamant, N., and Bar-Nun, S. (2002). AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* *22*, 626-634.

Rabouille, C., Kondo, H., Newman, R., Hui, N., Freemont, P., and Warren, G. (1998). Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro. *Cell* *92*, 603-610.

Rao, H., and Sastry, A. (2002). Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J Biol Chem* *277*, 11691-11695.

Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., and Jentsch, S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* *107*, 667-677.

Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegel, C., and Jentsch, S. (2005). A Series of Ubiquitin Binding Factors Connects CDC48/p97 to Substrate Multiubiquitylation and Proteasomal Targeting. *Cell* 120, 73-84.

Robzyk, K., Recht, J., and Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 287, 501-504.

Rockel, B., Walz, J., Hegerl, R., Peters, J., Typke, D., and Baumeister, W. (1999). Structure of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* as studied by electron tomography. *FEBS Lett* 451, 27-32.

Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.

Rotin, D., Staub, O., and Haguenauer-Tsapis, R. (2000). Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 176, 1-17.

Rouiller, I., Butel, V. M., Latterich, M., Milligan, R. A., and Wilson-Kubalek, E. M. (2000). A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding. *Mol Cell* 6, 1485-1490.

Rouiller, I., DeLaBarre, B., May, A. P., Weis, W. I., Brunger, A. T., Milligan, R. A., and Wilson-Kubalek, E. M. (2002). Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle. *Nat Struct Biol* 9, 950-957.

Russell, N. S., and Wilkinson, K. D. (2004). Identification of a novel 29-linked multiubiquitin binding protein, Ufd3, using multiubiquitin chain analogues. *Biochemistry* 43, 4844-4854.

Saeki, Y., Tayama, Y., Toh-E, A., and Yokosawa, H. (2004). Definitive evidence for Ufd2-catalyzed elongation of the ubiquitin chain through Lys48 linkage. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 840-845.

Saeki, Y., Toh-E, A., and Yokosawa, H. (2000). Rapid isolation and characterization of the yeast proteasome regulatory complex. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 509-515.

Salghetti, S. E., Caudy, A. A., Chenoweth, J. G., and Tansey, W. P. (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 293, 1651-1653.

Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W., and Madura, K. (1998). Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* 391, 715-718.

Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3-Enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* *373*, 81-83.

Schlesinger, D. H., Goldstein, G., and Niall, H. D. (1975). The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* *14*, 2214-2218.

Schuberth, C., Richly, H., Rumpf, S., and Buchberger, A. (2004). Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. *EMBO Rep* *5*, 818-824.

Shcherbik, N., Kee, Y., Lyon, N., Huibregtse, J. M., and Haines, D. S. (2004). A single PXY motif located within the carboxy-terminus of Spt23p and Mga2p mediates a physical and functional interaction with ubiquitin ligase Rsp5p. *J Biol Chem*.

Shcherbik, N., Zoladek, T., Nickels, J. T., and Haines, D. S. (2003). Rsp5p is required for ER bound Mga2p120 multiubiquitination and release of the processed/tethered transactivator Mga2p90. *Curr Biol* *13*, 1227-1233.

Sloper-Mould, K. E., Jemc, J. C., Pickart, C. M., and Hicke, L. (2001). Distinct functional surface regions on ubiquitin. *J Biol Chem* *276*, 30483-30489.

Soetens, O., De Craene, J. O., and Andre, B. (2001). Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J Biol Chem* *276*, 43949-43957.

Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* *362*, 318-324.

Sommer, T., and Wolf, D. H. (1997). Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *Faseb J* *11*, 1227-1233.

Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L., and Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* *15*, 1265-1273.

Spencer, V. A., and Davie, J. R. (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* *240*, 1-12.

Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P., and Kirschner, M. W. (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* *107*, 715-726.

Strickland, E., Hakala, K., Thomas, P. J., and DeMartino, G. N. (2000). Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* *275*, 5565-5572.

Stukey, J. E., McDonough, V. M., and Martin, C. E. (1989). Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *264*, 16537-16544.

Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., and Lehman, D. (1995). Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J Biol Chem* *270*, 14733-14741.

Tang, Z., Li, B., Bharadwaj, R., Zhu, H., Ozkan, E., Hakala, K., Deisenhofer, J., and Yu, H. (2001). APC2 Cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell* *12*, 3839-3851.

Tsai, B., and Rapoport, T. A. (2002). Unfolded cholera toxin is transferred to the ER membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by Ero1. *J Cell Biol* *159*, 207-216.

Ulrich, H. D., and Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J* *19*, 3388-3397.

van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D., and Vierstra, R. D. (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* *16*, 6020-6028.

Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., and Deshaies, R. J. (2000). Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell* *11*, 3425-3439.

Verma, R., Oania, R., Graumann, J., and Deshaies, R. J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* *118*, 99-110.

Vodermaier, H. C. (2004). APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr Biol* *14*, R787-796.

Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* *1*, 945-951.



Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.

Wilkinson, B. M., Tyson, J. R., Reid, P. J., and Stirling, C. J. (2000). Distinct domains within yeast Sec61p involved in post-translational translocation and protein dislocation. *J Biol Chem* 275, 521-529.

Wilkinson, C. R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., and Gordon, C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 3, 939-943.

Xie, Y., and Varshavsky, A. (2002). UFD4 lacking the proteasome-binding region catalyses ubiquitination but is impaired in proteolysis. *Nat Cell Biol* 4, 1003-1007.

Ye, Y., Meyer, H. H., and Rapoport, T. A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.

Ye, Y., Meyer, H. H., and Rapoport, T. A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and multiubiquitin chains. *J Cell Biol* 162, 71-84.

Zhang, S., Skalsky, Y., and Garfinkel, D. J. (1999). MGA2 or SPT23 is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151, 473-483.

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

Zhou, M., and Schekman, R. (1999). The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol Cell* 4, 925-934.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>aminoacid</i> (Aminosäure)
AMP	Ampicilin
ATP	Adenosintriphosphat
βGal	β-Galaktosidase
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4´6´-Diamino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-Aktivierungsenzym
E2	Ubiquitin-Konjugationsenzym
E3	Ubiquitin-Ligase
E4	Multiubiquitylierungsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
Input	eingesetzte Proteinmenge
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid
Kan	Kanamycin
KDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
min	Minute
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600nm

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RING	<i>really interesting new gene</i>
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TCA	Trichloressigsäure
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoemthan
U	Unit
UBC	Ubiquitin-Konjugationsenzym
UFD	<i>ubiquitin fusion degradation</i>
Ubi	Ubiquitin
Ubi-ProtA	Ubiquitin-lacI-ProteinA
Ubi-ProßGal	Ubiquitin-Prolin-lacI-β-Galaktosidase
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	Kulturmedium für <i>S. cerevisiae</i>



## **Lebenslauf**

Name: Holger Richly  
Geburtsdatum: 23. Mai 1974  
Geburtsort: Willich, NRW

### **Schulbildung**

1980 bis 1983 Grundschule Im Mühlenfeld in Willich  
1983 bis 1984 Grundschule Bismarckstrasse in Krefeld  
1984 bis 1993 Ricarda-Huch-Gymnasium in Krefeld  
Juni 1993 Abitur am Ricarda-Huch-Gymnasium

### **Zivildienst**

1993 bis 1995 Zivildienst beim Deutschen Paritätischen Wohlfahrtsverband in Krefeld

### **Universität**

1995 bis 2000 Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität-Bochum  
Oktober 1998 Vordiplomsprüfung im Fach Biochemie  
1999 bis 2000 Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum am Lehrstuhl für Biochemie bei Herrn Prof. Bernd-Joachim Benecke  
Februar 2000 Abschluss der Diplomarbeit und Ernennung zum Diplom-Biochemiker

### **Doktorarbeit**

2000 bis 2004 Durchführung der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Zellbiologie, bei Prof. Dr. Jentsch