

**Regulation des Abbaus von Cdc48-Substraten  
durch die antagonistischen Aktivitäten von  
Ufd2 und Ufd3**

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

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Sebastian Rumpf  
aus Göttingen

2006

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

München, den 20.03.2006

Promotionsgesuch eingereicht: 20.03.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2006

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jensch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen März 2001 und Februar 2006 unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

Schuberth, C., Richly, H., Rumpf, S., 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., Jentsch, S. (2005). A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 120, 73-84

Rumpf, S., Jentsch, S. (2006) Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol. Cell* 21, 261-269

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Übersicht über das Ubiquitin-Proteasom-System	3
1.2 Mechanismus der Ubiquitinmodifikation	4
1.2.1 Konjugation durch eine Thioesterkaskade	4
1.2.2 Ubiquitinketten	6
1.2.3 Dekonjugation durch Deubiquitinierungsenzyme	7
1.3 Proteinabbau durch das Proteasom	9
1.3.1 Das 26S Proteasom	9
1.3.2 Der Transport zum Proteasom – Rpn10, Rad23 und Cdc48	10
1.4 Der Ubiquitin-Fusion-Degradation-Weg und die Regulation des <i>OLE1</i> -Gens	13
1.5 Ufd2	15
1.6 Ufd3	16
1.7 Aufgabenstellung	17
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>19</b>
2.1 Identifizierung neuer Ufd2- und Ufd3-Bindeproteine	19
2.2 Cdc48 besitzt mehrere Bindestellen für Kofaktoren	21
2.3 Die Funktion von Ufd1/Npl4 und Shp1 als Substratadaptoren	22
2.4 Die Ufd2-Interaktoren Rad23 und Dsk2 sind in einer epistatischen Weise am Abbau eines Ufd2-Substrates beteiligt	24
2.5 Ubiquitin wird in <i>ufd3</i> -Mutanten Ufd2- und proteasomabhängig abgebaut	27
2.6 Ufd3 stabilisiert Cdc48-Substrate, indem es mit Ufd2 um eine Cdc48-Bindestelle kompetiert	29
2.7 <i>OTU1</i> , ein <i>High Copy</i> -Suppressor der $\Delta$ <i>ufd3</i> -Mutante	32
2.8 Domänenanalyse von Otu1	35
2.9 Spt23 als Substrat von Ufd3 und Otu1	37
2.10 Ist die Substratweitergabe von Cdc48 auf Ufd2/3 ATP-abhängig?	40
<b>3 Diskussion</b>	<b>43</b>
3.1 Ufd2 interagiert mit Proteasomrezeptoren – ein Fall von <i>Substrate</i>	43

<i>channeling</i>	
3.2 Ufd3 ist ein Ufd2-Antagonist	44
3.3 Das Deubiquitinierungsenzym Otu1 ist ein <i>High Copy</i> -Suppressor der $\Delta$ <i>ufd3</i> -Mutante und könnte mit Ufd3 kooperieren	46
3.4 Die Stabilität von Spt23 ist modulierbar	47
3.5 Es gibt verschiedene Typen von Cdc48-Interaktoren	48
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>51</b>
4.1 Materialien	51
4.2 Molekularbiologische Methoden	56
4.3 Mikrobiologische Methoden	57
4.4 Proteinbiochemische Methoden	61
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>Danksagung</b>	<b>80</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>81</b>

## Zusammenfassung

Das Ubiquitin-Proteasomsystem vermittelt den Grossteil des intrazellulären Proteinabbaus in Eukaryonten. Dabei werden proteolytische Substrate erst kovalent mit Ubiquitin verknüpft, und die so verknüpften Proteine werden dann vom Proteasom erkannt und abgebaut. Chaperone sind ein wichtiger Bestandteil des Ubiquitin-Proteasomsystems. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* spielt die konservierte AAA-ATPase Cdc48, die über Adaptorproteine an ubiquitinierte Proteine binden kann, eine essentielle Rolle im Ubiquitinsystem. Es vermittelt u. a. den Abbau von artifiziellen Ubiquitin-Fusionsproteinen und die Aktivierung und den Abbau des Transkriptionsfaktors Spt23, einem Regulator des *OLE1*-Gens. Die Funktion von Cdc48 wird von vielen Bindepartnern reguliert. Dazu gehören Ufd2, ein Protein, das Cdc48-Substrate ubiquitinieren kann, und Ufd3, einem Protein unbekannter Funktion. *ufd3*-Mutanten weisen manche Ähnlichkeiten zu Mutanten von Deubiquitinierungsenzymen auf.

In dieser Arbeit sollten diese beiden Cdc48-Bindefaktoren weiter funktionell charakterisiert werden. Dabei stellte sich heraus, dass Ufd2 und Ufd3 über dieselbe Bindestelle an Cdc48 binden und distinkte Komplexe mit ihm ausbilden. Bindung von Ufd2 an Cdc48 führt zur Degradation von Cdc48-Substraten. Dazu interagiert Ufd2 mit den proteasomalen Substratrezeptoren Rad23 und Dsk2. Diese Interaktion scheinen der effizienten Weiterleitung der von Ufd2 multiubiquitinierten Cdc48-Substrate zum Proteasom zu dienen.

In *ufd3*-Mutanten scheint Ufd2 hyperaktiv zu sein, und Ufd3-Bindung an Cdc48 verhindert den Abbau von Cdc48-Substraten. Also ist Ufd3 ein Ufd2-Antagonist. Diese Funktion beinhaltet zum einen die Konkurrenz mit Ufd2, zum anderen interagiert Ufd3 auch mit dem Deubiquitinierungsenzym Otu1, einem neu identifizierten Cdc48-Interaktor. Ufd3 und Otu1 können also zusammen Cdc48-Substrate vor dem Abbau schützen.

Die Stabilität von Cdc48-Substraten wird also wesentlich vom Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Aktivitäten von Ufd2, Ufd3 und Otu1 bestimmt.



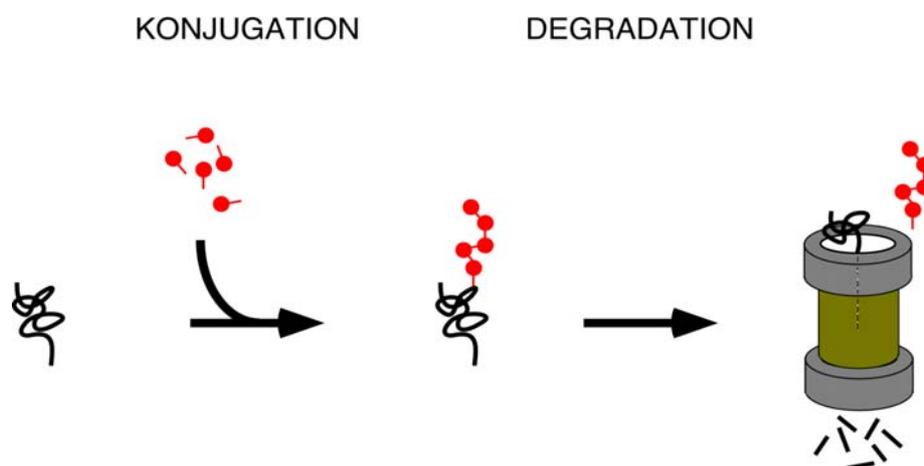
# 1 Einleitung

## 1.1 Übersicht über das Ubiquitin-Proteasom-System

Alle bekannten Organismen besitzen Systeme zum Abbau von Proteinen. Diese Systeme dienen sowohl der Zell-Homöostase und dem Umsatz alter und nicht funktioneller Spezies als auch der Regulation der Aktivität vieler Proteine. In Eukaryonten werden intrazelluläre Proteine größtenteils vom Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Dabei werden zunächst enzymatisch mehrere Moleküle des 76 Aminosäuren langen Proteins Ubiquitin in Form einer Kette kovalent mit Substratproteinen verknüpft („konjugiert“), und die derart markierten Proteine dann vom Proteasom, der abundantesten intrazellulären Protease, erkannt und verdaut. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist demnach in eine Substraterkennungs- und eine proteolytische Komponente unterteilt (Abbildung 1).

Die Konjugation von Substratproteinen wird durch eine Reihe von Enzymen katalysiert, die Ubiquitin erst aktivieren, um es dann aufs Substrat zu übertragen. Die effiziente Substraterkennung durch das Proteasom wird durch Transport- und Erkennungsfaktoren sichergestellt. Ausserdem sind häufig Chaperone für den Abbau solcher Substratproteine notwendig, die aus Proteinkomplexen oder Membranen herausgelöst werden müssen.

Es sind auch Proteolyse-unabhängige Funktionen der Ubiquitin-konjugation beschrieben worden. So ist Ubiquitin ein Signal zur Endozytose von Membranproteinen und in der Reparatur von DNA-Schäden.



**Abbildung 1:** Das Ubiquitin-Proteasom-System. Ketten aus Ubiquitin (rot) werden an ein Substrat (schwarz) angeheftet, dieses wird dann im Proteasom zu Peptiden abgebaut.

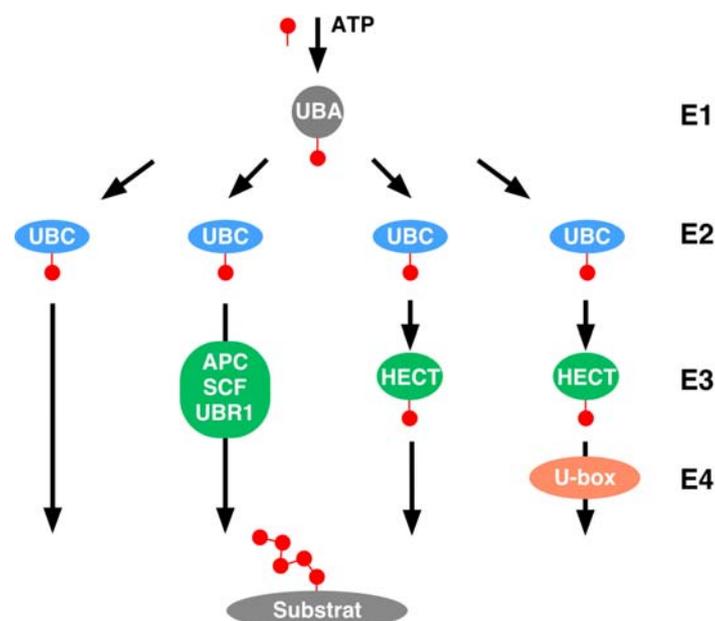
### 1.2 Mechanismus der Ubiquitinmodifikation

#### 1.2.1 Konjugation durch eine Thioesterkaskade

Ubiquitin wird mit seinen Substraten über eine Isopeptidbindung zwischen seinem Carboxyterminus und (meist) der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internen Lysinrestes des Substratproteins verknüpft. Da eine solche Bindung sehr energiereich ist, muss Ubiquitin durch ATP-Hydrolyse für die Konjugation aktiviert werden. Dies und der Transfer auf das Substrat geschieht in einer Enzymkaskade (Pickart, 2001). Im ersten Schritt, der durch das sogenannte Ubiquitinaktivierungsenzym E1 katalysiert wird, bildet Ubiquitin über seinen C-Terminus eine Phosphoesterbindung mit ATP unter Freisetzung von Pyrophosphat. Das so entstandene Ubiquitin-Adenylat wird dann unter Ausbildung einer Thioesterbindung auf einen Cysteinrest des E1 übertragen. Dieser Zustand wird als „aktiviert“ bezeichnet. Im nächsten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin auf ein Ubiquitinkonjugationsenzym (E2) übertragen, mit dem es ebenfalls eine Thioesterbindung über einen Cysteinrest des E2 ausbildet. Die Verknüpfung mit Substratproteinen wird anschließend von so genannten Ubiquitinligasen (E3s) katalysiert. Diese repräsentieren die Substraterkennungskomponenten des Ubiquitinsystems und vermitteln die Spezifität der Ubiquitinierung. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und anderen Organismen gibt es nur ein E1 (McGrath *et al.*, 1991) und relativ wenige E2s (elf in Hefe), die meist eine relativ breite Substratspezifität aufweisen und mit verschiedenen E3s kooperieren. So kooperiert das E2 Rad6/Ubc2 im Abbau des Cohesins Scc1 im *N-end-rule*-Abbauweg mit dem E3 Ubr1 (Bartel *et al.*, 1990; Dohmen *et al.*, 1991; Jentsch *et al.*, 1987; Rao *et al.*, 2001) in der postreplikativen DNA-Reparatur mit Rad18 durch die Ubiquitinierung von PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (Hoegge *et al.*, 2002) und in der Ubiquitinierung von Histon H2B mit Bre1 (Hwang *et al.*, 2003; Robzyk *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu der relativ kleinen Anzahl von E2-Enzymen gibt es sehr viele E3s, deren genaue Anzahl im Hefegenom bisher jedoch noch nicht bekannt ist. Die hohe Anzahl reflektiert die substratspezifische Rolle der E3s und die Vielzahl der Substrate und zellulären Prozesse, die durch Ubiquitin und/oder Proteolyse reguliert werden. Während der Mechanismus der E1-

und E2-Enzyme wahrscheinlich immer gleich ist, gibt es mindestens zwei verschiedene Klassen von E3-Enzymen. Die erste Klasse sind die sogenannten RING-Finger-Proteine (Joazeiro and Weissman, 2000). Diese besitzen in ihrer Aminosäure-Sequenz eine Substratbindestelle und ein Zinkbindendes Motiv, den sogenannten RING-Finger, das an E2-Enzyme bindet. RING-Finger-Proteine sind demnach Adaptoren zwischen einem Substrat und einem E2, wobei Ubiquitin direkt vom E2 auf das Substrat transferiert wird. Zu den RING-E3s gehören die schon erwähnten Ubr1, Rad18 und Bre1 sowie der *Anaphase Promoting Complex* (APC), ein E3 mit mehreren Untereinheiten, das den Abbau wichtiger Zellzyklusregulatoren wie Zyklin B und Securin mit Hilfe einer RING-Finger-Untereinheit vermittelt und so die Mitose kontrolliert (Zachariae and Nasmyth, 1999). SCF-Komplexe, eine zweite Art von Multiprotein-E3s (*SKP1/Cullin/E-Box*) enthalten ebenfalls RING-Untereinheiten und vermitteln den Abbau von Zellzyklusregulatoren in der G1- und S-Phase sowie einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (Petroski and Deshaies, 2005). Die zweite Klasse von E3s sind die HECT-E3s (*Homologous to E6AP C-Terminus*). Diese E3s übernehmen Ubiquitin von den entsprechenden E2-Enzymen und bilden über ein konserviertes Cystein im C-Terminus selbst eine Thioesterbindung mit ihm aus (Scheffner *et al.*,



**Abbildung 2: Das Ubiquitinkonjugationssystem.** Gezeigt sind die verschiedenen Schritte der Konjugationskaskade.

1995). HECT-E3s übertragen demnach Ubiquitin direkt auf Substratproteine. Beispiele sind Rsp5 aus *S. cerevisiae*, das unter anderem eine Rolle in der Endozytose spielt (Hicke and Dunn, 2003), sowie das humane E6-assoziierte Protein (E6AP), das von bestimmten Viren rekrutiert werden kann, um den Tumorsuppressor p53 abzubauen (Scheffner *et al.*, 1993). U-Box-Proteine könnten möglicherweise eine dritte Klasse von E3s darstellen. Sie sind strukturell und mechanistisch den RING-Finger-Proteinen verwandt, jedoch scheinen sie oligoubiquitinierte Substrate zu bevorzugen oder bevorzugt in Kooperation mit anderen E3s zu wirken. Deshalb wurde für sie auch der Terminus *E4* geprägt (Koegl *et al.*, 1999). Der Prototyp für diese Klasse ist Ufd2 aus *S. cerevisiae*.

Für die gemeinsame Aufgabe aller E3-Enzyme, die Substraterkennung, gibt es kein einheitliches Prinzip. Im Zellzyklus involvierte E3s (wie die schon erwähnten APC und SCF) erkennen ihre Substrate oft erst nach deren Phosphorylierung durch Zyklin-abhängige Kinasen (Cdks), und enthalten Untereinheiten, die über sogenannte WD40-Domänen mit phosphorylierten Proteinen interagieren können (Skowyra *et al.*, 1997; Zachariae and Nasmyth, 1999). Das E3 Rsp5 aus *S. cerevisiae* enthält mehrere sogenannte WW-Domänen, die phosphorylierte oder Prolin-reiche Sequenzen erkennen können (Sudol and Hunter, 2000). Ubr1 erkennt bestimmte N-terminale Aminosäurereste (Bartel *et al.*, 1990).

### 1.2.2 Ubiquitinketten

Ubiquitinsubstrate werden meistens nicht nur mit einem Ubiquitinrest, sondern mit einer Ubiquitinkette modifiziert, in der mehrere Ubiquitinreste über Isopeptidbindungen zwischen dem Ubiquitin-C-Terminus und internen Lysinresten des vorherigen Ubiquitins verknüpft sind (Chau *et al.*, 1989; Hershko *et al.*, 1980; Pickart, 2001). Prinzipiell können alle sieben Lysinreste des Ubiquitins zur Kettenbildung verwendet werden, spezifische Funktionen sind aber erst für zwei Typen von Ubiquitinketten beschrieben worden. Dabei haben Ketten mit unterschiedlicher Verknüpfungsweise unterschiedliche Funktionen. Über Lysin (Lys-) 48 verknüpfte Ubiquitinketten dienen als Abbausignal für das Proteasom (Chau *et al.*, 1989). Dies ist offensichtlich die wichtigste Funktion des Ubiquitins, denn nur die Mutation von Lys-48 in

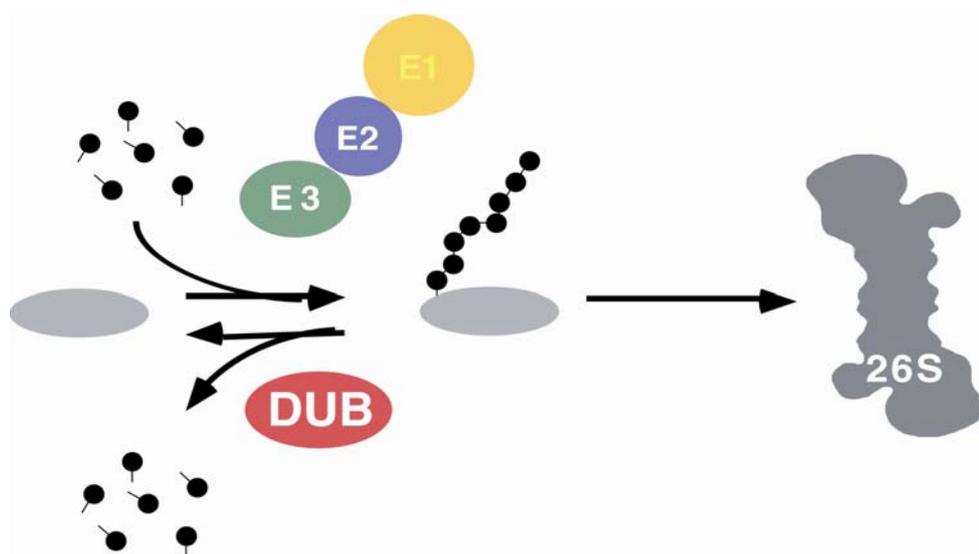
Ubiquitin führt zum Verlust der Lebensfähigkeit in *S. cerevisiae* (Spence *et al.*, 1995). Lys-48-verknüpfte Ubiquitinketten werden erst ab einer gewissen Länge vom Proteasom als Substrat erkannt (Thrower *et al.*, 2000). Substrate mit kürzeren Ketten scheinen vom Abbau verschont zu bleiben (Flick *et al.*, 2004; Kaiser *et al.*, 2000). Solche kürzeren Ubiquitinketten könnten also auch andere Funktionen haben. Ausserdem ist für einige Transkriptionsfaktoren gezeigt worden, dass ihre Modifikation mit Ubiquitin zwar zu ihrem Abbau führt, sie aber auch gleichzeitig aktiviert (Salghetti *et al.*, 2001; Salghetti *et al.*, 2000). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt.

Über Lys-63 verknüpfte Ubiquitinketten sind ebenfalls beschrieben worden (Hofmann and Pickart, 1999). Diese dienen verschiedenen nichtproteolytischen Zwecken. So wird das Replikationsprotein PCNA nach Beschädigung der DNA mit Lys-63-verknüpften Ketten modifiziert (Hoegel *et al.*, 2002), und Mutation dieses Aminosäurerestes führt in *S. cerevisiae* zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber DNA-schädigenden Agentien (Spence *et al.*, 1995). Möglicherweise spielt die Modifikation von Plasmamembranproteinen mit Lys-63-verknüpften Ubiquitinketten eine Rolle in deren Endozytose (Galan and Haguenaer-Tsapis, 1997), und es gibt Hinweise auf eine Rolle von Lys-63 in der Translationskontrolle (Spence *et al.*, 2000). Für artifizielle Ubiquitin-Fusionsproteine (UFD-Substrate, s. u.) ist ebenfalls eine Verknüpfung über Lys-29 des Ubiquitins beschrieben worden, meist in Ubiquitinketten, die ebenfalls Lysin-48-Verbindungen enthielten (Johnson *et al.*, 1995; Koegl *et al.*, 1999). Bisher sind aber noch keine endogenen Substrate für diese Verknüpfungsweise bekannt. Monoubiquitinierung scheint eine modulatorische Funktion zu haben. So sind Histone oft monoubiquitiniert, in *S. cerevisiae* hat die Monoubiquitinierung des Histons H2B zum Beispiel eine Funktion im *silencing* von Genen (Robzyk *et al.*, 2000; Sun and Allis, 2002). Monoubiquitinierung scheint auch das minimal benötigte Signal zur Endozytose zu sein (Hicke and Riezman, 1996).

### 1.2.3 Dekonjugation durch Deubiquitinierungsenzyme

Die Modifikation mit Ubiquitin ist reversibel und dadurch regulierbar, denn die energiereiche Isopeptidbindung kann hydrolytisch gespalten werden (Abbildung 3). Diese Reaktion wird durch spezifische Isopeptidasen, so

genannte Deubiquitinierungsenzyme (DUBs), katalysiert, deren Mechanismus dem von Cysteinproteasen ähnelt (Amerik and Hochstrasser, 2004). Die einzige bisher bekannte Ausnahme ist die proteasomale Untereinheit Rpn11, die während des Abbaus Ubiquitin von Substraten entfernt. Dieses Enzym ähnelt Metalloproteasen und benötigt Zink-Ionen für seine Aktivität (Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002). In *S. cerevisiae* ist *RPN11* essentiell, was die Bedeutung der Ubiquitindekongjugation für den proteasomalen Abbau unterstreicht - die substratgebundene Ubiquitinkette könnte sonst den Abbau sterisch behindern, falls sie mit abgebaut würde, würde den Zellen permanent Ubiquitin entzogen werden. Die mindestens sechzehn anderen Deubiquitinierungsenzyme in *S. cerevisiae* sind nicht lebensnotwendig, was die Analyse ihrer Funktionen bisher erschwert hat. Dennoch sind für einige Vertreter schon Funktionen bekannt. So deubiquitiniert Doa4 Plasmamembranproteine nach der Endozytose, bevor sie in der Vakuole verdaut werden (Amerik et al., 2000; Katzmann et al., 2001). Ubp3 scheint Substrate vor dem proteasomalen Abbau zu schützen (Brew and Huffaker, 2002; Cohen et al., 2003; Moazed and Johnson, 1996), und Ubp8 und Ubp10 deubiquitinieren Histon H2B und spielen so eine Rolle in der Genregulation (Daniel et al., 2004; Emre et al., 2005). In Säugerzellen scheint das Tumorsuppressorprotein p53 von HAUSP stabilisiert zu werden (Li et al., 2002).



**Abbildung 3: Regulation des Abbaus durch Deubiquitinierungsenzyme.** E1-E3: Ubiquitin-Konjugationskaskade, DUB: Deubiquitinierungsenzym, 26S: Proteasom.

Die Cystein-abhängigen Deubiquitinierungsenzyme können anhand ihrer Sequenz in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Amerik and Hochstrasser, 2004). Die am besten charakterisierten sind die Ubiquitin-C-terminalen Hydrolasen (UCHs) und die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (USPs), zu denen die oben genannten Beispiele gehören. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch Proteine mit der sogenannten Ovarian Tumour (OTU)-Domäne Deubiquitinierungsenzyme sind (Borodovsky et al., 2002; Evans et al., 2003). Das OTU-Protein A20 aus Säugern scheint ein negativer Regulator der NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu sein. Es entfernt eine – aktivierende – Ubiquitinierung vom positiven Regulator Receptor Interacting Protein (RIP) (Wertz et al., 2004). Ataxin-3, ein Protein, das an der Pathogenese der neurodegenerativen Polyglutaminexpansions-Krankheit *Spinocerebellar ataxia type 3* beteiligt ist, scheint ebenfalls ein Deubiquitinierungsenzym zu sein, und die Aktivität ist in seiner neuartigen *Josephin*-Domäne enthalten, die bisher für kein anderes Protein beschrieben wurde (Amerik and Hochstrasser, 2004; Burnett et al., 2003). Es sind jedoch noch keine Substrate für Ataxin-3 vermittelte Deubiquitinierung bekannt.

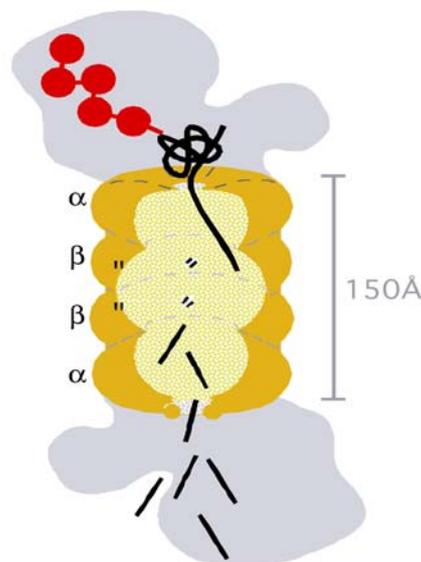
### 1.3 Proteinabbau durch das Proteasom

#### 1.3.1 Das 26S Proteasom

Multiubiquitinierte Proteine werden vom Proteasom als Substrate erkannt und abgebaut (Baumeister et al., 1998; Bochtler et al., 1999; Driscoll and Goldberg, 1990; Heinemeyer et al., 1991; Seufert and Jentsch, 1992). Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex mit Proteaseaktivität und einem Molekulargewicht von etwa zwei MegaDalton. Nach seinem Sedimentationskoeffizient wird das Holoenzym auch 26S Proteasom genannt. Das Proteasom besteht aus zwei Subkomplexen (Abbildung 4). Der proteolytisch aktive Teil ist das so genannte 20S Proteasom. Es besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten und hat die Form einer Tonne, die aus vier übereinanderliegenden Ringen ( $\alpha\beta\beta\alpha$ ) besteht. Die Ringe bestehen aus je sieben Proteinen, und die aktiven Zentren (zweimal drei in Eukaryonten) befinden sich in den  $\beta$ -Ringern auf der Innenseite der Tonne. Das Proteasom

ist eine Threonin-Protease, bei der die Hydroxylgruppe des N-terminalen Threonins der aktiven Untereinheiten die Peptidbindung nukleophil angreift.

Die zweite Untereinheit des Proteasoms ist das so genannte regulatorische Partikel (RP) oder 19S *cap*, das an beiden äußeren Enden des 20S-Partikels bindet (Glickman *et al.*, 1998). Es besteht aus über zwanzig verschiedenen Proteinen und vermittelt die Erkennung von ubiquitinierten Substraten und ihre Deubiquitinierung vor dem Abbau (durch Rpn11 (s. o.) und das nicht essentielle Ubp6). Sechs RP-Untereinheiten sind so genannte AAA-ATPasen (ATPases Associated with various Activities), die Chaperon-Aktivität besitzen (Braun *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 1998). Sie entfalten proteolytische Substrate, um sie dann in den 20S-Komplex einzuschleusen.



**Abbildung 4: Das Proteasom.** Dargestellt sind die regulatorischen 19S-Kappen oberhalb und unterhalb des katalytischen 20S Partikels, der aus je zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringen besteht. Ein Substratprotein mit einer Ubiquitinkette ist ebenfalls dargestellt.

### 1.3.2 Der Transport zum Proteasom: Rpn10, Rad23 und Cdc48

Der Proteinbestand einer Zelle muss regelmäßig umgesetzt und erneuert werden, und manche regulatorischen Proteine müssen – je nach Situation – sehr schnell durch Proteolyse inaktiviert werden. Zudem müssen manche

Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems aus zellulären Membranen oder aus Multiproteinkomplexen extrahiert werden, wie z. B. missgefaltete Proteine des endoplasmatischen Retikulums (ER) oder die regulatorischen Zykline, die Aktivatoren Zellzyklus-regulierender Kinasen. Dies erklärt, warum Chaperone und Substratrezeptoren eine wichtige Rolle im Ubiquitin-Proteasom-System spielen. Kandidaten für den postulierten Ubiquitinrezeptor im Proteasom sind die Proteasomuntereinheit Rpn10 (Deveraux et al., 1994; Elsasser et al., 2002; van Nocker et al., 1996), das über ein sogenanntes Ubiquitin-Interaktions-Motiv (UIM) mit Ubiquitinketten interagieren kann (Hofmann and Falquet, 2001), sowie die beiden löslichen, Proteasom-assoziierten Proteine Rad23 und Dsk2, die jeweils über eine sogenannte UBiquitin-Associated (UBA)-Domäne mit ubiquitinierten Proteinen interagieren können (Elsasser et al., 2002; Hofmann and Bucher, 1996; Schaubert et al., 1998; Verma et al., 2004; Wilkinson et al., 2001). In *S. cerevisiae* hängt der Abbau einer Reihe von Substraten von diesen Faktoren ab (Medicherla et al., 2004; Rao and Sastry, 2002; Verma et al., 2004). Allerdings sind weder Rpn10 noch Rad23 oder Dsk2 in *S. cerevisiae* essentiell (im Gegensatz zum Proteasom), was suggeriert, dass sie überlappende oder redundante Funktionen haben (Lambertson et al., 1999; Verma et al., 2004). Zudem ist die regulatorische ATPase-Untereinheit Rpt5 auch als potentieller Substratrezeptor beschrieben worden (Lam et al., 2002).

Eine weitere Chaperon-Komponente des Ubiquitinsystems ist *S. cerevisiae* Cdc48 (und sein Vertebraten-Homologes p97), eine homoexamere AAA-ATPase. Cdc48 ist essentiell und hat eine dem Proteasom vorgeschaltete Rolle in vielen wichtigen Abbauwegen. Wahrscheinlich am besten verstanden ist seine Rolle im Abbau von missgefalteten Proteinen des endoplasmatischen Retikulums im sogenannten ERAD-Weg (ER-Associated Degradation). Proteine, die der Faltungskontrolle des ER nicht standhalten, werden über die ER-Membran zurück ins Zytosol überführt und dort vom Proteasom abgebaut (Hirsch et al., 2004). Die Rolle von Cdc48 scheint dabei zu sein, Substratproteine aus der ER-Membran zu extrahieren (Braun et al., 2002; Jarosch et al., 2002; Ye et al., 2001). Die Funktion von Cdc48 wird durch eine Reihe von Cdc48-Bindeproteinen reguliert (Tabelle 1). Im ERAD-Weg und anderen proteolytischen Wegen

interagiert Cdc48 mit einem Adaptorkomplex, Ufd1/Npl4, der bei der Erkennung von ubiquitinierten Substraten hilft (Meyer et al., 2000; Meyer et al., 2002; Rape et al., 2001). Anschließend werden die Substrate über Rad23 oder Dsk2 zum Proteasom geleitet (Medicherla et al., 2004). Cdc48/p97 ist an vielen Prozessen beteiligt, wie dem Abbau von artifiziellen Ubiquitin-Fusionsproteinen über den Ubiquitin-Fusion-Degradation (UFD)-Weg (Ghislain et al., 1996), der Regulation des *OLE1*-Gens (Hoppe et al., 2000; Rape et al., 2001), an der Fusion der Kernmembran nach der Mitose (Hetzer et al., 2001) und anderen Membranfusionsprozessen im ER oder im Golgi-Apparat (Kondo et al., 1997; Latterich et al., 1995; Rabouille et al., 1995). Die Rolle von Cdc48/p97 in der Membranfusion scheint Proteasom-unabhängig und der Funktion des NEM-Sensitive Factor (NSF) ähnlich zu sein und ist am besten in Säugetierzellen charakterisiert. In dieser Funktion scheint p97 nicht mit dem Ufd1/Npl4-Adaptor zu interagieren, sondern mit dem alternativen Adaptorprotein, p47 (Kondo et al., 1997). Das p47-Homolog in *S. cerevisiae* ist Shp1, für das allerdings noch keine Funktion in der Membranfusion beschrieben worden ist (Braun et al., 2002; Zhang et al., 1995). p47/Shp1 enthält die einzige bisher gut charakterisierte p97/Cdc48-Bindedomäne, die Ubiquitin Regulatory X- (UBX)-Domäne, ein ~80 Aminosäuren langes Motiv, das dasselbe Faltungsmuster wie Ubiquitin aufweist (Buchberger et al., 2001; Dreveny et al., 2004; Kondo et al., 1997; Yuan et al., 2001). Alle bisher charakterisierten UBX-Proteine binden an p97/Cdc48 (Decottignies et al., 2004; Hartmann-Petersen et al., 2004; Schuberth et al., 2004; Song et al., 2005). Npl4, eine Untereinheit des Ufd1/Npl4-Adaptorkomplexes, scheint eine Variante der UBX-Domäne zu besitzen, die Ubiquitin-Fold-Domäne (UBD) (Bruderer et al., 2004). Bisher sind noch nicht viele Funktionen von UBX-Proteinen im Zusammenhang mit Cdc48 charakterisiert worden. So ist das Hefe-UBX-Protein Ubx2 eine Komponente des Ubiquitinsystems und rekrutiert Cdc48 an die ER-Membran um seine Interaktion mit ERAD-Substraten zu erleichtern (Schuberth and Buchberger, 2005).

Weitere Bindepartner von Cdc48 sind das E4 Ufd2 (Koepl et al., 1999) und Ufd3, ein WD40-Domänen-Protein mit unklarer Funktion (Ghislain et al., 1996), das ebenfalls eine Rolle im Ubiquitinsystem zu spielen scheint (siehe unten).

**Tabelle 1: Cdc48-Interaktoren in Hefe.** (Referenzen s. Text)

Name	Funktion	Domäne
Ufd1/Npl4	Adaptorprotein für Ubiquitinkonjugate	UBD (Npl4)
Shp1	Adaptor für SNAREs? Vertebraten-Homologes p47	UBX, UBA
Ufd2	E4 im UFD-Weg	U Box
Ufd3	Unbekannt, Mutantenphänotyp deutet auf Deubiquitinierung	WD40 Repeat
Ubx2	ERAD	UBX, UBA
Ubx3	Unbekannt	UBX
Ubx4	Unbekannt	UBX
Ubx5	Unbekannt	UBX, UBA
Ubx6	Unbekannt	UBX
Ubx7	Unbekannt	UBX

#### 1.4 Der Ubiquitin Fusion Degradation (UFD)-Weg und die Regulation des OLE1-Gens

Eine Rolle von Cdc48 im Ubiquitinsystem wurde erstmals im Zusammenhang mit dem UFD-Weg beschrieben (Ghislain *et al.*, 1996). Dieser ist nach seinen Substraten benannt, N-terminalen, nicht spaltbaren Fusionen von Ubiquitin mit Reporterproteinen wie etwa dem bakteriellen Enzym  $\beta$ -Galaktosidase. Diese Fusionsproteine sind in *S. cerevisiae* kurzlebig und werden vom Proteasom abgebaut (Bachmair *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1992). In der Folge konnte gezeigt werden, dass die UFD-Faktoren Ufd1-5, Cdc48, Npl4, Rad23, Dsk2 und Rpn10 sowie die E2-Enzyme Ubc4 und Ubc5 für diesen Abbauweg erforderlich sind, dabei interagieren Ufd1/Npl4, Ufd2 und Ufd3 mit Cdc48 (Ghislain *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1995; Lambertson *et al.*, 1999; Rao and Sastry, 2002; Rape *et al.*, 2001; van Nocker *et al.*, 1996). Ufd2 ist das prototypische E4 mit einer RING-ähnlichen U-Box-Domäne (Koepl *et al.*, 1999; Richly *et al.*, 2005) und ist an der Substrat-Ubiquitinierung beteiligt. Die Rolle von Cdc48 und die Epistase der Faktoren im UFD-Weg untereinander sind noch unklar.

Interessanterweise sind einige der oben genannten Faktoren auch an der Regulation des OLE1-Gens in *S. cerevisiae* beteiligt (Tabelle 2). OLE1

kodiert für die  $\Delta 9$ -Fettsäuredesaturase, ein Enzym, das durch die Einführung von Doppelbindungen zwischen die Kohlenstoffatome C9 und C10 von Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) Palmitoleinsäure (16:1) bzw. Ölsäure (18:1) herstellt. Ole1 ist die einzige Fettsäuredesaturase in Hefe, und das *OLE1*-Gen ist essentiell (Stukey *et al.*, 1989). Es wird durch die beiden homologen Transkriptionsfaktoren Spt23 und Mga2 aktiviert (Zhang *et al.*, 1999). Diese Transkriptionsfaktoren werden als inaktive, homodimere membranständige Vorläufer (p120) im ER synthetisiert, und durch einen komplizierten Rückkopplungs-Mechanismus aktiviert (Abbildung 5): wenn die Konzentration an ungesättigten Fettsäuren (oder vielleicht ungesättigten Acylresten von Phospholipiden) im ER rückläufig ist, wird ein Partnermolekül vom E3 Rsp5 ubiquitiniert und daraufhin vom Proteasom partiell verdaut, wobei ein Fragment (p90) ohne Transmembrandomäne entsteht. Dieses p90-Fragment wird nun von Cdc48 und dem Ufd1/Npl4-Komplex von seinem unprozessierten p120-Partner getrennt (Hoppe *et al.*, 2000; Rape *et al.*, 2001). Das aktive p90 ist somit von der Membran losgelöst und kann in den Zellkern gelangen, um das *OLE1*-Gen zu aktivieren und neue Fettsäuredesaturase herzustellen (Rape *et al.*, 2001). Die Prozessierung und Aktivierung von Spt23 unterliegt einer *Feedback*-Regulation, sie wird durch hohe Konzentrationen an ungesättigten Fettsäuren - vor allem Palmitoleinsäure (16:1) oder Linolsäure (18:2) - gehemmt (Hoppe *et al.*, 2000), und der *OLE1*-Promotor wird durch alle getesteten ungesättigten Fettsäuren stark reprimiert (Choi *et al.*, 1996). Interessanterweise ist auch das Enzym Ole1 selbst reguliert, denn es ist kurzlebig und wird über den ERAD-Weg abgebaut (Braun *et al.*, 2002).

Das aktive p90-Fragment ist ebenfalls kurzlebig und wird in Abhängigkeit von Ufd2 und Rpn10 abgebaut (Doktorarbeit M. Rape, Universität Bayreuth, Abbildung 5). Ufd2 ist ein Cdc48-Bindepartner, und die Interaktion der beiden Partner scheint für die Interaktion von Ufd2 mit seinen Substraten wichtig zu sein. Möglicherweise „übergibt“ Cdc48 also Substrate direkt an Ufd2 (Richly *et al.*, 2005). Cdc48, Ufd1 und Npl4 sind also für die Aktivierung von Spt23 sowie des *OLE1*-Gens erforderlich, aber auch gleichzeitig für den Abbau des

aktiven Spt23 p90. Dabei sind sie epistatisch zu Ufd2, welches nur für die Inaktivierung von Spt23 wichtig ist.

Das Verhältnis der anderen UFD-Faktoren zu den oben beschriebenen und eine potentielle Rolle in der Regulation von *OLE1* waren noch nicht untersucht.

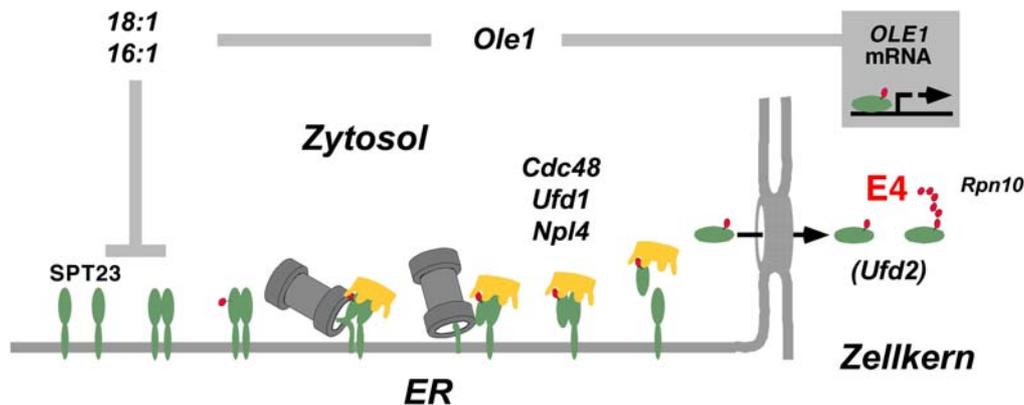


Abbildung 5: Die Aktivierung des *OLE1*-Gens in *S. cerevisiae*. (Erläuterungen s. Text)

Tabelle 2: UFD-/OLE1-Aktivierungsfaktoren und ihre Funktionen. (Referenzen s. Text)

UFD-/OLE1-Aktivierungs-Faktor	Funktion
Cdc48	Solubilisierung von p90
Ufd1/Npl4	Adaptor für Cdc48
Ufd2	E4, ubiquitiniert p90, UFD-Substrate
Ufd3	Unklar
Ufd4	E3 im UFD-Weg
Ufd5	Transkriptionsfaktor für Proteasom-Gene
Rad23	Proteasomaler Substratrezeptor (UFD)
Dsk2	Proteasomaler Substratrezeptor (UFD)
Rpn10	Proteasomaler Substratrezeptor (UFD, <i>OLE1</i> )
Rsp5	E3, <i>OLE1</i> -Aktivierung
Ubc4/5	E2-Enzyme

### 1.5 Ufd2

Die Funktion von Ufd2 im Ubiquitinsystem scheint seine U Box-vermittelte E4-Aktivität gegen Substrate wie Ub-Pro-β-Galaktosidase und Spt23 p90 zu sein. Dabei ist die Modifikation mit Ubiquitin ein wichtiges Erkennungssignal für Ufd2 (Koeogl *et al.*, 1999). Seine Substrate werden

wahrscheinlich von Cdc48 für die Multiubiquitinierung aktiviert, mit dem Ufd2 auch physikalisch interagiert. Letzteres suggeriert eine direkte Substratweiterleitung zwischen den beiden Faktoren (*Substrate channeling*). Das Verhältnis zu anderen UFD-Faktoren ist aber unklar. In *UFD2*-Deletionsmutanten ist Spt23 p90 stabilisiert und deshalb hyperaktiv, deshalb sind diese Zellen hypersensitiv gegen die ungesättigte Fettsäure Ölsäure im Wachstumsmedium (Doktorarbeit M. Rape, Universität Bayreuth). Weiterhin scheint es leichte synthetische Defekte in Kombination mit *RPN10*-Deletionsmutanten zu geben, deren genaue Grundlage noch nicht klar ist (Koege *et al.*, 1999). Strukturell ist weniger über Ufd2 bekannt, es ist ein 961 Aminosäuren langes Protein, und die U-Box befindet sich am C-Terminus.

### 1.6 Ufd3

Die Funktion von Ufd3 ist im Gegensatz zu der von Ufd2 noch weitgehend unklar. Ufd3 ist ein 715 Aminosäuren großes Protein, das am N-Terminus sieben Kopien der WD40-Domäne enthält, die wahrscheinlich eine propellerförmige Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen bilden. Die Cdc48-Bindestelle oder andere Sequenzbesonderheiten sind nicht bekannt. *UFD3*-Deletionsmutanten zeigen eine sehr charakteristische, starke Verminderung in der Menge des zellulären (freien und konjugierten) Ubiquitins. Änderungen in der zellulären Ubiquitinmenge sind charakteristisch für Mutanten von Deubiquitinierungsenzymen (Leggett *et al.*, 2002; Swaminathan *et al.*, 1999). Allerdings wurde noch keine solche Aktivität für Ufd3 nachgewiesen und ist auch angesichts fehlender Sequenzcharakteristika - wie etwa konservierter Cysteinreste - unwahrscheinlich. Bisher ist auch kein anderer Zusammenhang zwischen Ufd3 und Deubiquitinierungsreaktionen beschrieben worden.

Ferner sind eine Reihe weiterer Phänotypen für  $\Delta ufd3$ -Mutanten beschrieben worden, wie zum Beispiel eine hohe Sensitivität gegen DNA-schädigende Agentien, die interessanterweise epistatisch dem ubiquitin-abhängigen RAD6-Weg zugeordnet werden konnte (Hanway *et al.*, 2002). Sie ist also wahrscheinlich auch eine Folge des Ubiquitinmangels.

### 1.7 Aufgabenstellung

Ufd2 und Ufd3 zeigen einige ähnliche Eigenschaften als nichtessentielle Cdc48-Interaktoren im UFD-Weg. In dieser Arbeit sollten diese Faktoren, ihre Rolle im Abbau und ihr Verhältnis zu Cdc48 weiter charakterisiert werden. Um diese Fragen zu beantworten, sollten neue Interaktoren von Ufd2 und Ufd3 identifiziert werden. Ausserdem sollte untersucht werden, warum  $\Delta ufd3$ -Mutanten eine Verminderung der zellulären Ubiquitinmenge zeigen, und ob dies auf Deubiquitinierungsdefekte zurückzuführen ist. Dazu sollte Ufd3 auch gezielt auf Interaktionen mit Deubiquitinierungsenzymen untersucht werden.



## 2 Ergebnisse

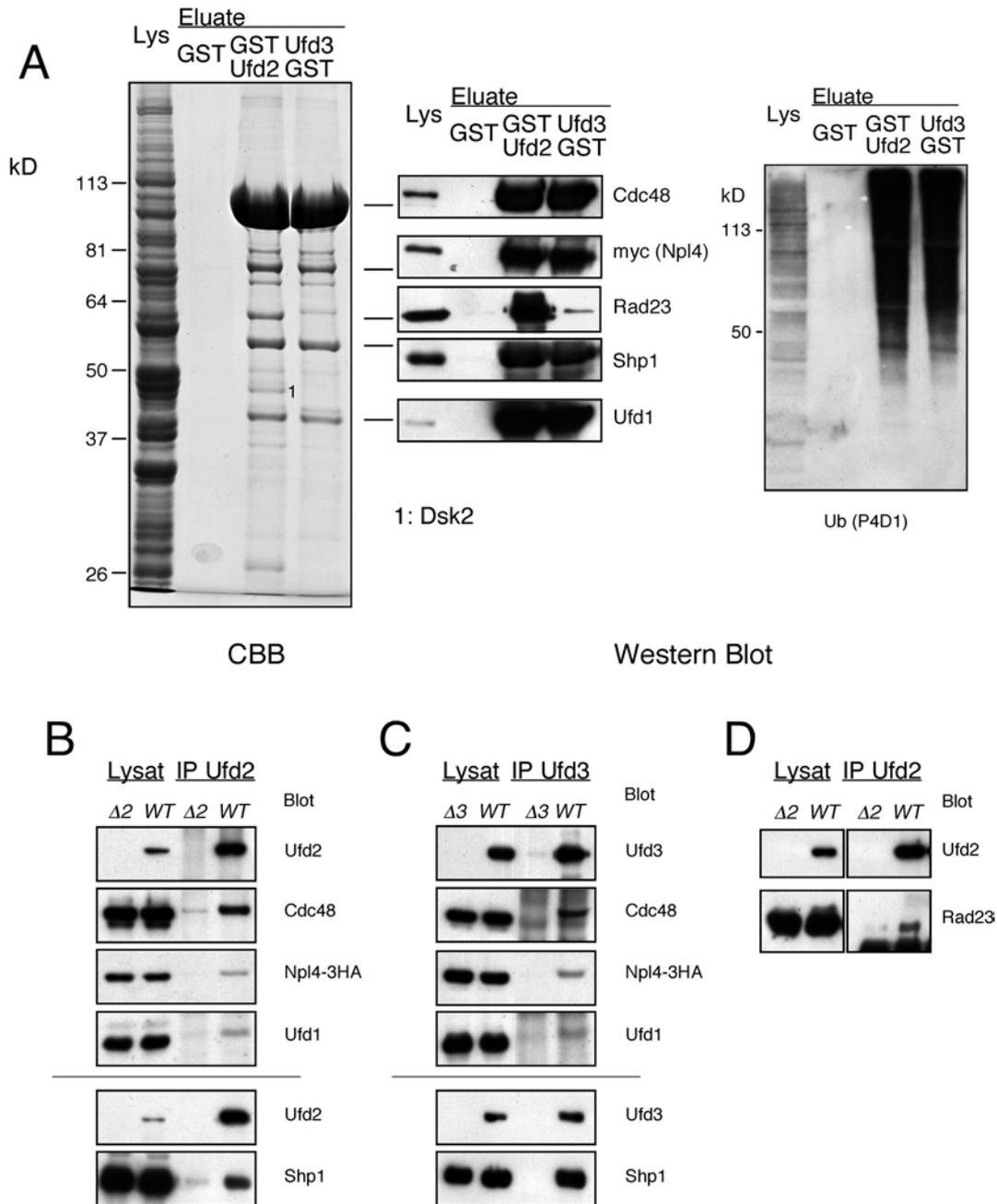
### 2.1 Identifizierung neuer Ufd2- und Ufd3-Bindeproteine

Um die Funktion der beiden Cdc48-Bindepoteine Ufd2 und Ufd3 im Ubiquitin-System besser zu verstehen, sollten zunächst neue Interaktoren der beiden Proteine mittels Affinitätschromatographie isoliert werden. Als Affinitätsmatrix dienten Glutathion-*Beads*, die mit bakteriell exprimierten und gereinigten Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen von Ufd2 und Ufd3 (oder GST als Negativkontrolle) beladen wurden. Diese wurden mit einem Hefelysat inkubiert und nach mehreren Waschschritten mit 1 M NaCl eluiert. Die Eluate mit spezifisch gebundenen Faktoren wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung analysiert (Abbildung 6A). Eine Reihe von Proteinen band spezifisch an beide Affinitätssäulen. Die stärksten Interaktoren sowohl von Ufd2 als auch Ufd3 hatten offensichtliche Molekulargewichte von 110, 70, 55 und 40 kDa. Sie konnten durch tryptischen Verdau und massenspektroskopische Analyse als Cdc48, Npl4, Shp1 und Ufd1 identifiziert werden (nicht gezeigt). Außerdem wurde die Identität dieser Proteine im Western Blot mit spezifischen Antikörpern bestätigt (Abbildung 6A).

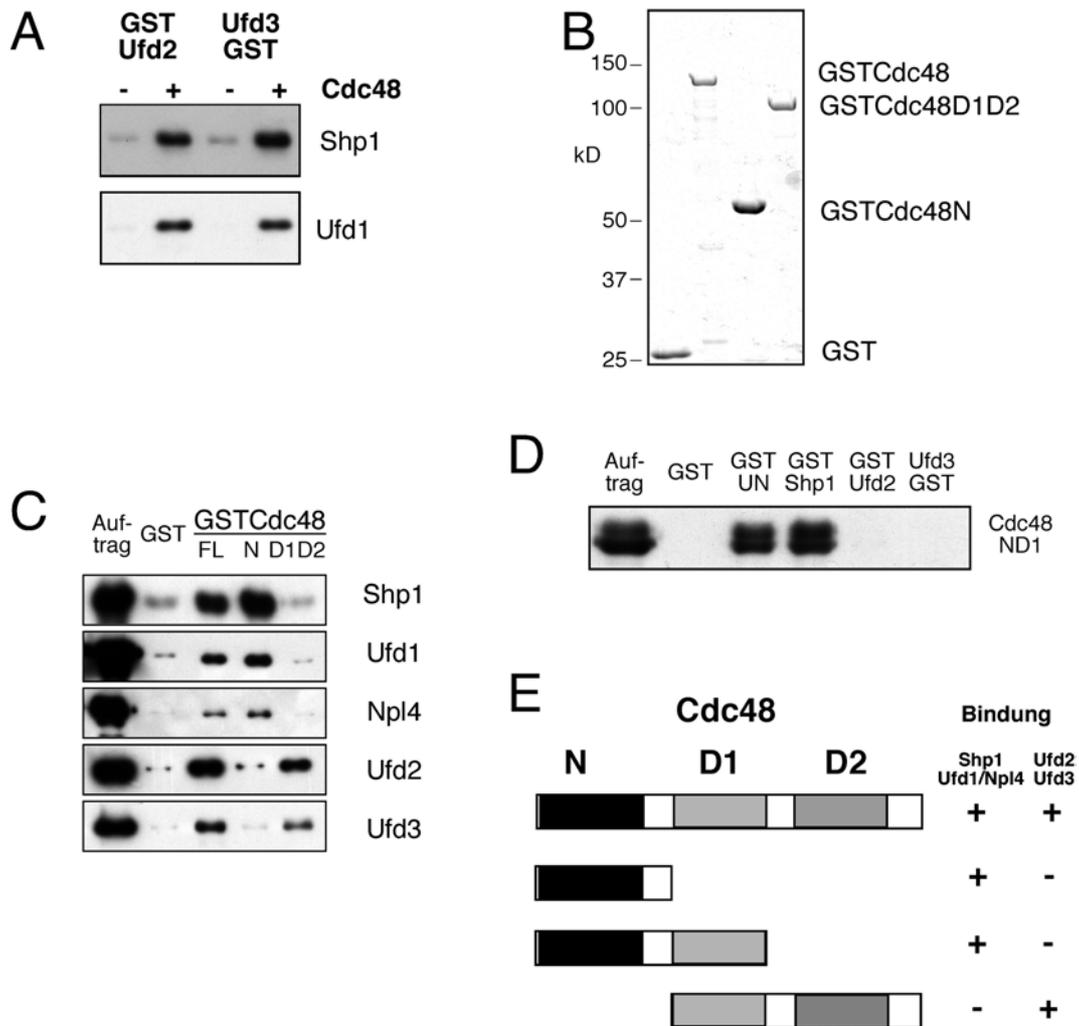
Zusätzlich zu diesen Interaktoren banden mehrere Proteine spezifisch nur an die Ufd2-Matrix. Zwei Proteine mit offensichtlichen Molekulargewichten von 60 und 45 kDa konnten massenspektroskopisch und teils auch im Western Blot als Rad23 und Dsk2 identifiziert werden (nicht gezeigt und Abbildung 6A).

Die neuen Interaktionen wurden durch Koimmunpräzipitation mit Ufd2- und Ufd3-spezifischen Antikörpern bestätigt. In Ufd2- und Ufd3-Präzipitaten aus Zelllysaten konnten Cdc48, der Ufd1/Npl4-Komplex und Shp1 im Western Blot spezifisch nachgewiesen werden (Abbildungen 6B und 6C). Rad23 konnte ebenfalls in Ufd2-Präzipitaten nachgewiesen werden (Abbildung 6D).

Zusammenfassend interagieren Ufd2 und Ufd3 also nicht nur mit Cdc48, sondern auch mit dessen Substratadaptoren Ufd1/Npl4 und Shp1. Zusätzlich interagiert Ufd2 mit den proteasomalen Substratrezeptoren Rad23 und Dsk2.



**Abbildung 6: Identifikation neuer Ufd2- und Ufd3-Interaktoren.** A GST-Affinitätsreinigung. GST-, GST-Ufd2- oder Ufd3-GST-Beads wurden mit Hefelysate (aus Npl4-3myc-Zellen) inkubiert und danach intensiv gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit 1 M NaCl eluiert und durch SDS-PAGE, Coomassiefärbung (CBB) und MALDI-TOF Massenspektroskopie (links) oder im Western Blot mit den jeweils angegebenen Antikörpern analysiert (rechts). B, C, D Bestätigung der neuen Interaktionen durch Koimmunopräzipitation. Ufd2 (B, D) oder Ufd3 (C) wurden mit spezifischen Antikörpern aus Hefelysate (Npl4-3HA-Hintergrund) präzipitiert und gebundene Proteine wurden im Western Blot nachgewiesen. Lysate aus  $\Delta ufd2$ - bzw.  $\Delta ufd3$ -Zellen dienten als Negativkontrolle. In IPs, in denen Shp1 nachgewiesen wurde, wurden die entsprechenden Antikörper kovalent an ProteinA-Beads gekoppelt.



**Abbildung 7: Identifikation von Protein-Interaktionsdomänen auf Cdc48.** A GST-Ufd2- und Ufd3-GST-Beads wurden mit rekombinatem Shp1 bzw. Ufd1/Npl4 in der An- oder Abwesenheit von Cdc48 inkubiert und gewaschen. Gebundenes Material wurde im Western Blot untersucht. B GSTCdc48 und Deletionsmutanten. SDS-Gel von je 2 µg der angegebenen Proteine. C GST-markiertes Cdc48 bzw. Cdc48-Deletionsmutanten wurden mit den angegebenen rekombinanten Kofaktoren inkubiert, mit Glutathion-Beads präzipitiert und gewaschen. Gebundene Proteine wurden im Western Blot nachgewiesen. D Die angegebenen GST-markierten Kofaktoren wurden an Beads gekoppelt und mit his<sub>6</sub>Cdc48ND1 inkubiert. Das gebundene Cdc48-Fragment wurde im Cdc48-Blot nachgewiesen. E Schematische Darstellung der Cdc48-Interaktionsdomänen.

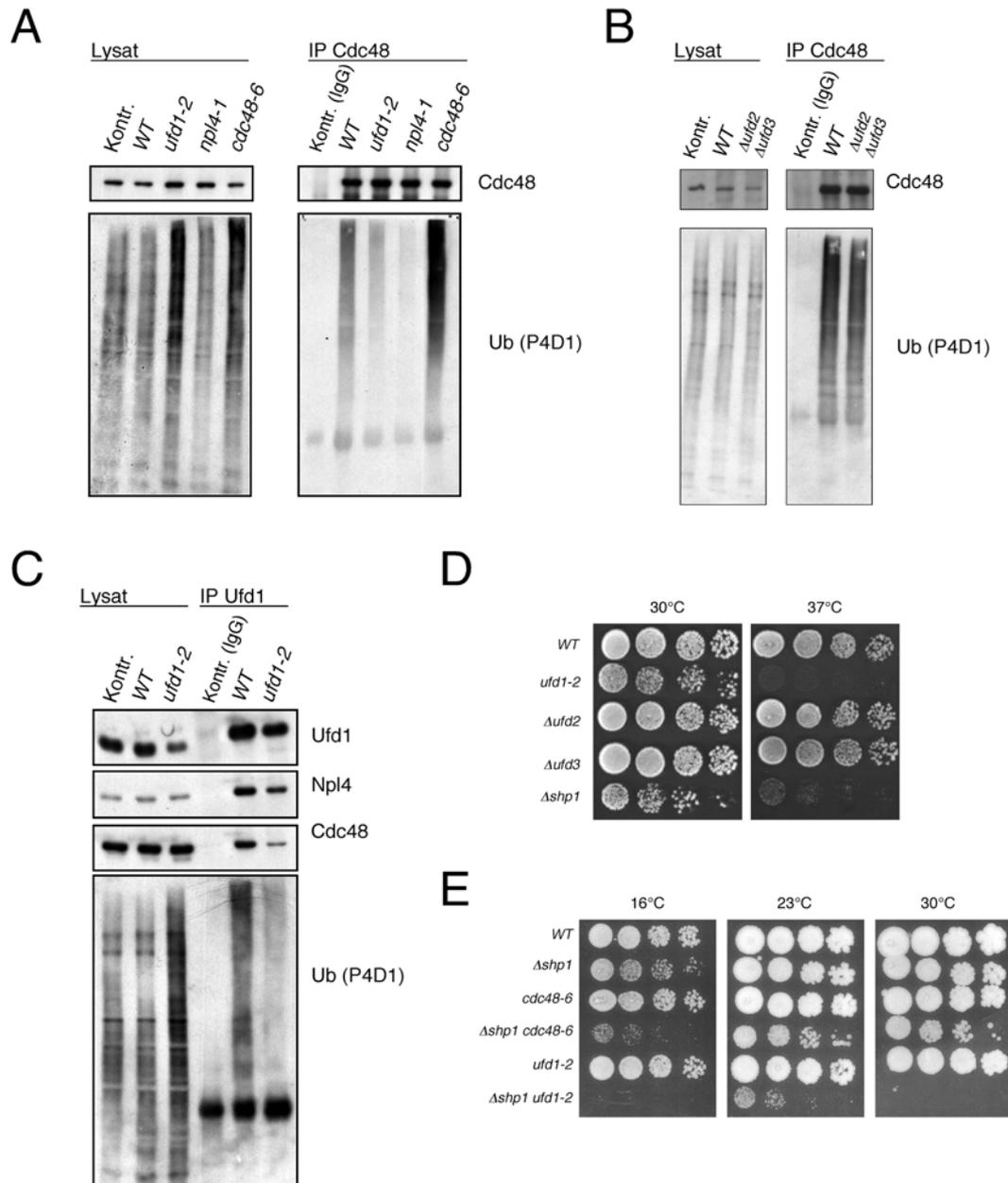
## 2.2 Cdc48 besitzt mehrere Bindestellen für Kofaktoren

Die Identifikation von Ufd1/Npl4 und Shp1 als Interaktoren von Ufd2 und Ufd3 warf die Frage nach der Natur dieser Interaktionen auf. Da alle genannten Faktoren mit Cdc48 interagieren, kam neben einer direkten Interaktion auch eine indirekte Bindung über Cdc48 in Betracht. Tatsächlich

konnten die beobachteten Interaktionen mit gereinigten Komponenten nur in der Gegenwart von Cdc48 reproduziert werden (Abbildung 7A). Also werden die beobachteten Interaktionen von Cdc48 vermittelt. Dieses Ergebnis legte nahe, dass Cdc48 mehrere Bindestellen für Interaktionspartner besitzt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Deletionsmutanten von Cdc48 als GST- oder his<sub>6</sub>-Fusionsproteine hergestellt (Abbildung 7B und nicht gezeigt). In Bindestudien mit gereinigten Proteinen wurde getestet, welche dieser Cdc48-Deletionskonstrukte mit den jeweiligen Kofaktoren interagieren konnte. Interessanterweise konnten Ufd1/Npl4 und Shp1 nur mit Fragmenten interagieren, die die N-Domäne von Cdc48 enthielten. Ufd2 und Ufd3 hingegen interagierten nur mit solchen Cdc48-Fragmenten, die die D2-Domäne enthielten (Abbildungen 7C, 7D). Somit konnten die Bindestellen für Ufd1/Npl4 und Shp1 auf der einen Seite und Ufd2 oder Ufd3 auf der anderen Seite klar voneinander unterschieden werden. Die unterschiedlichen Bindestellen auf Cdc48 bilden offensichtlich die Basis für die beobachteten Interaktionen. Weiterhin kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass Ufd1/Npl4 und Shp1 ein anderer Typ von Cdc48-Bindefaktor sind als Ufd2 und Ufd3.

### **2.3 Die Funktion von Ufd1/Npl4 und Shp1 als Substratadaptoren**

Der Ufd1/Npl4-Komplex bindet ubiquitinierte Substrate (Meyer *et al.*, 2002), und die Interaktion zwischen Ubiquitinkonjugaten und Cdc48 scheint in *ufd1*-Mutanten vermindert zu sein (Doktorarbeit M. Rape, Universität Bayreuth). Es wurde daher postuliert, dass Ufd1/Npl4 ein funktioneller Substratadaptor für Cdc48 ist. In Übereinstimmung damit fanden sich weniger Ubiquitinkonjugate in Cdc48-Präzipitaten aus *ufd1-2*- und *npl4-1*-Zellen als in Präzipitaten aus Wildtypzellen (Abbildung 8A). Dieser Effekt war spezifisch für Mutanten des Ufd1/Npl4-Komplexes, da Cdc48-Präzipitate aus *cdc48-6*-Zellen sogar mehr Ubiquitinkonjugate enthielten (Abbildung 8A). Auch in *Δufd2 Δufd3*-Doppelmutanten war die Interaktion zwischen Ubiquitin und Cdc48 nicht gestört (Abbildung 8B). Ufd2 und Ufd3 scheinen also im Gegensatz zum Ufd1/Npl4-Komplex nicht zur Interaktion zwischen



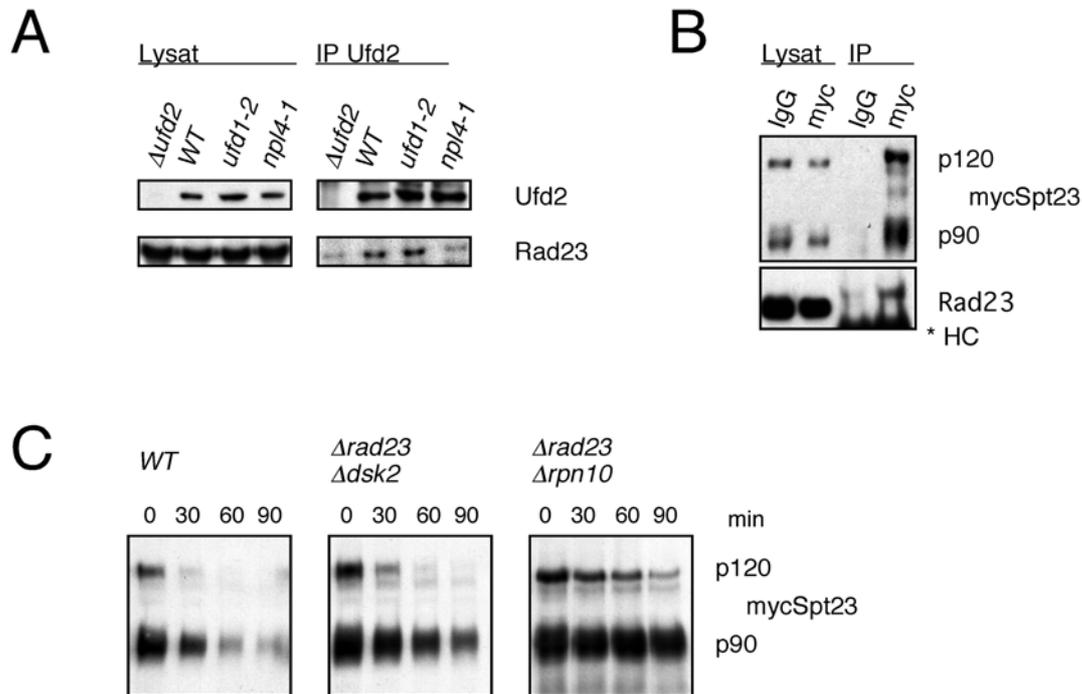
**Abbildung 8: Ufd1/Npl4 und Shp1 sind Cdc48-Substrat-Adaptoren.** A Cdc48-Substrat-Interaktion in Cdc48- und Adaptormutanten. Cdc48 wurde aus Lysaten der jeweils angegebenen Mutanten-Stämme immunpräzipitiert. Unspezifische Kaninchen-IgGs wurden als Negativkontrolle benutzt. Lysate und Präzipitate wurden mit Cdc48- oder Ubiquitinantikörpern untersucht. B Cdc48-Substrat-Interaktion in  $\Delta$ *ufd2*  $\Delta$ *ufd3*-Doppelmutanten. Cdc48 wurde wie in A immunpräzipitiert und geblottet. C Ufd1 interagiert mit Ubiquitin, und das *ufd1-2*-Allel kodiert für ein instabiles Protein. Ufd1 wurde aus Lysaten der angegebenen Stämme präzipitiert und auf Interaktionen mit Npl4-3myc, Cdc48 und Ubiquitin getestet. Unspezifische Kaninchen-IgGs wurden als Negativkontrolle verwendet. D Serielle Verdünnungsreihe. Die angegebenen Stämme wurden in fünffachen Verdünnungen ausgespiet und für 2-3 Tage bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. E Wie D. mit Doppelmutanten, Inkubation für 3-4 Tage bei den jeweils angegebenen Temperaturen.

Cdc48 und seinen Substraten beizutragen. In Übereinstimmung mit der postulierten Adaptorfunktion enthielten auch Ufd1-Präzipitate signifikante Mengen an Ubiquitinkonjugaten (Abbildung 8C). Das vom *ufd1-2*-Allel kodierte Protein schien instabil zu sein, da im *Western Blot* nur geringe Mengen Ufd1 detektiert werden konnten. Dementsprechend enthielten Ufd1-Präzipitate aus *ufd1-2*-Lysaten auch geringere Mengen an Cdc48, Npl4 und Ubiquitinkonjugaten (Abbildung 8C).

Shp1 zeigte in allen bisherigen Interaktionsanalysen ein ähnliches Interaktionsverhalten wie der Ufd1/Npl4-Komplex. Seine Funktion als Adaptor für Cdc48 ähnelt wahrscheinlich sehr der von Ufd1/Npl4. Die phänotypische Analyse von  $\Delta$ *shp1*-Mutanten ergab, dass diese Zellen relativ starke Wachstumsdefekte haben und bei 37°C nicht mehr lebensfähig sind (Abbildung 8D). Somit scheint auch Shp1 einen wichtigen Beitrag für die Cdc48-Funktion zu liefern. Eine  $\Delta$ *shp1 ufd1-2*-Doppelmutante war nur bei 23°C in geringem Maße lebensfähig (Abbildung 8E). Dieser starke synthetische Effekt der beiden Einzelmутanten könnte auch auf eine partielle Redundanz zwischen den Cdc48-Adaptoren hindeuten.

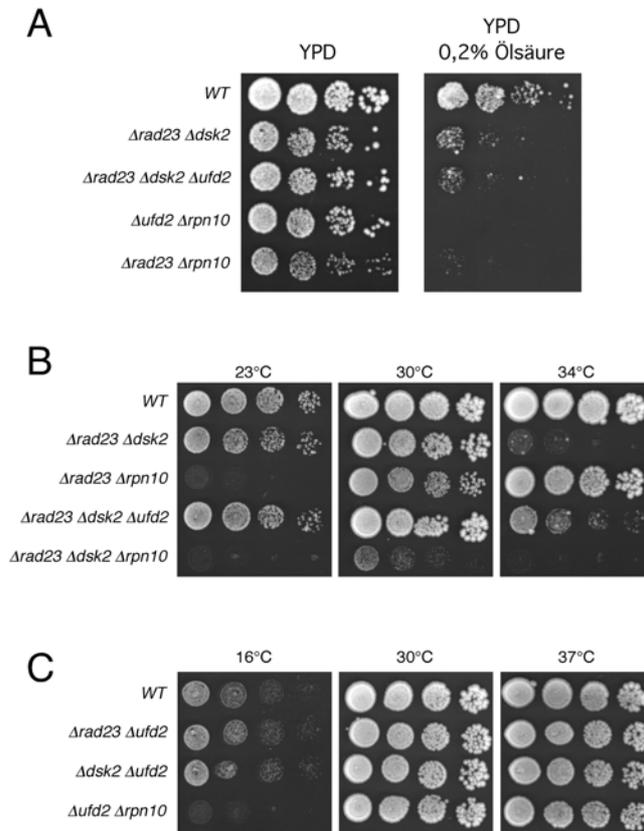
### **2.4 Die Ufd2-Interaktoren Rad23 und Dsk2 sind in einer epistatischen Weise am Abbau eines Ufd2-Substrates beteiligt**

Ufd2 interagiert sehr spezifisch mit den UFD-Faktoren Rad23 und Dsk2. Diese beiden Proteine interagieren direkt mit dem Proteasom (Schauber *et al.*, 1998, Elsasser *et al.*, 2002) und mit ubiquitinierten Proteinen (Wilkinson *et al.*, 2001). Ausserdem sind sie am (ebenfalls Ufd2-abhängigen) Abbau des UFD-Substrates Ub-P- $\beta$ gal beteiligt (Lambertson *et al.*, 1999, Rao und Sastry, 2002). Diese Daten suggerieren eine Funktion als Substratrezeptoren. Tatsächlich konnte kürzlich eine solche Rolle biochemisch belegt werden (Verma *et al.*, 2004). Eine attraktive Interpretation der beobachteten Interaktionen mit Ufd2 wäre, dass Ufd2 ein multiubiquitiniertes Substrat direkt an die Proteasomrezeptoren „weiterreicht“ und somit eine effiziente und schnelle Proteolyse ermöglicht. Diese Hypothese sagt voraus, dass Ufd2 und der Cdc48-Ufd1/Npl4-Komplex epistatisch zu Rad23/Dsk2 sein sollten und dass Rad23 und Dsk2 am Abbau weiterer Ufd2-Substrate beteiligt sein



**Abbildung 9: Rad23/Dsk2 interagieren mit Ufd2 und Spt23 und sind am Spt23 p90-Abbau beteiligt.** A Koimmunpräzipitation von Ufd2 und Rad23 in verschiedenen Mutanten. B myc-epitopmarkiertes Spt23 wurde in Wildtypzellen exprimiert und mit myc-Antikörpern oder unspezifischen Kaninchen-IgGs immunpräzipitiert. Die Proben wurden jeweils auf die Anwesenheit von Rad23 getestet. C *Promoter-Shutoff/Cycloheximide chase*-Experiment zur Untersuchung der Stabilität von Spt23. myc-markiertes Spt23 wurde in den angegebenen Stämmen unter dem GAL-Promotor exprimiert. Nach Gabe von Glukose und Cycloheximid wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und im myc-Blot untersucht.

sollten. Tatsächlich ist die Interaktion zwischen Ufd2 und Rad23 in der *npl4-1*-Mutante gestört (Abbildung 9A). Außerdem bindet Rad23 an das Ufd2-Substrat Spt23 (Abbildung 9B). In  $\Delta rad23$ -,  $\Delta dsk2$ - oder  $\Delta rpn10$ -Einzelmutanten ist der Abbau von Spt23 nicht offensichtlich gestört (nicht gezeigt und Doktorarbeit M. Rape, Universität Bayreuth), aber in einer  $\Delta rad23$   $\Delta dsk2$ -Doppelmutante ist der Spt23-Abbau merklich verlangsamt (Abbildung 9C). Die  $\Delta rad23$   $\Delta rpn10$ -Doppelmutante zeigt sogar einen kompletten Block des Spt23-Abbaus (Abbildung 9C), Rad23 und Rpn10 scheinen generell redundante Funktionen zu haben (Lambertson *et al.*, 1999). Die drei Faktoren Rad23, Dsk2 und Rpn10 haben also weitgehend überlappende Funktionen. Dabei scheinen Rad23 und Dsk2 mindestens im UFD- und im OLE1-Aktivierungsweg einen eigenen Unter-Abbauweg zu definieren, denn sie interagieren im Gegensatz zu Rpn10 direkt mit Ufd2 (Koegele *et al.*, 1999).



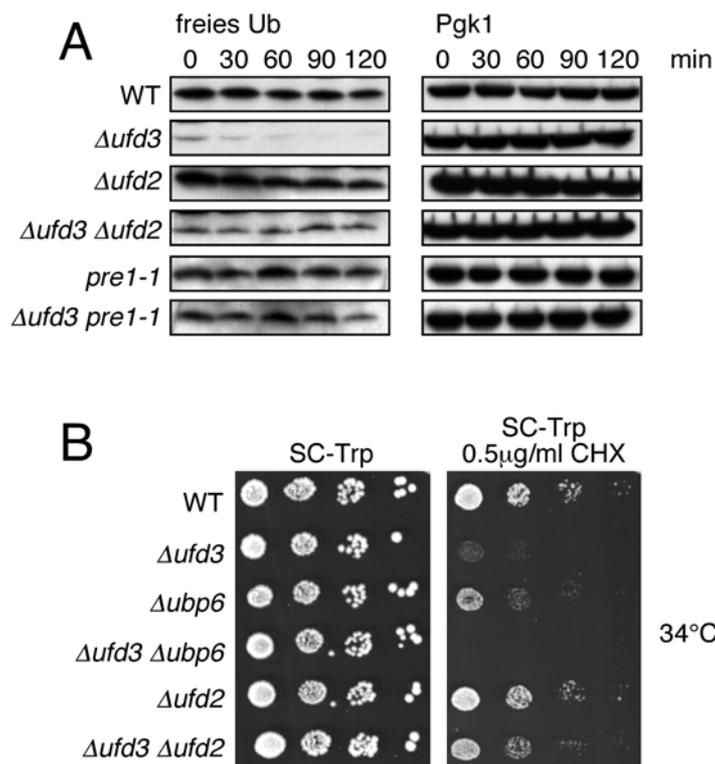
**Abbildung 10: Epistatische Analyse der späten OLE1-Aktivierungs- und UFD-Wege.** A Fünffache serielle Verdünnungen der angegebenen Mutanten auf YPD-Medium oder YPD-Medium mit 0,2% Ölsäure wurden für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. B Fünffache serielle Verdünnungen von Proteasomrezeptor-Mutanten auf YPD wurden 2-3 Tage bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. C Fünffache serielle Verdünnungen von  $\Delta ufd2$ -Doppelmutanten wurden 2-3 Tage bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

Wie verhalten sich *RAD23* und *DSK2* genetisch zu *UFD2* und *RPN10*? Die Stabilisierung von Spt23 in der  $\Delta ufd2$ -Mutante führt zu einer Hypersensitivität gegenüber dem Endprodukt des OLE1-Aktivierungsweges, Ölsäure, im Wachstumsmedium (Doktorarbeit M. Rape, Universität Bayreuth).  $\Delta rad23 \Delta dsk2$ -Mutanten sind ebenfalls hypersensitiv gegen Ölsäure, und  $\Delta rad23 \Delta dsk2 \Delta ufd2$ -Tripelmutanten zeigen gegenüber der Doppelmutante keine erhöhte Sensitivität (Abbildung 10A), was auf eine epistatische Beziehung hindeutet.  $\Delta ufd2 \Delta rpn10$ - und  $\Delta rad23 \Delta rpn10$ -Doppelmutanten zeigen eine stärkere Ölsäure-Sensitivität als die beiden oben genannten Mutanten (Abbildung 10A). *RPN10* scheint daher zwar redundant mit *RAD23* und *DSK2* zu sein, aber nicht direkt epistatisch auf *UFD2* zu folgen. Eine allgemeinere Analyse der Wachstumsphänotypen von Rezeptormutanten

zeigt, dass kombinierte Deletion von *RAD23*, *DSK2* oder *RPN10* jeweils synthetische Wachstumsdefekte hervorruft (Abbildung 10B), während die jeweiligen Einzelmutanten unter den getesteten Bedingungen uneingeschränkt lebensfähig sind (nicht gezeigt). Die Deletion von *UFD2* verstärkt die Wachstumsphänotypen von  $\Delta rad23$  oder  $\Delta dsk2$ -Mutanten nicht, zeigt aber leichte additive oder synthetische Defekte in Kombination mit der  $\Delta rpn10$ -Mutante (Abbildung 10C). Diese Daten unterstützen ein Modell, in dem *UFD2* im UFD- und *OLE1*-Weg strikt epistatisch mit *RAD23/DSK2* ist. *RPN10* dagegen ist zwar wahrscheinlich redundant mit *RAD23/DSK2*, aber eher in einem parallelen, teilweise unabhängigen Abbauweg involviert. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass die von Willebrandt-Faktor A (VWA)-Domäne von Rpn10, die die Proteasom-Interaktion vermittelt, auch für Rad23-vermittelte Proteolyse wichtig ist (Fu *et al.*, 1998, Verma *et al.*, 2004). Eine detailliertere genetische Analyse des Verhältnisses zwischen den genannten Faktoren müsste deshalb auch noch partielle Deletionsmutanten von *RPN10* beinhalten. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch klar, dass Rad23 und Dsk2 am Spt23-Abbau beteiligt sind und dabei funktionell eng mit Ufd2 kooperieren. Wahrscheinlich dienen die beobachteten Interaktionen zwischen Ufd2 und Rad23/Dsk2 tatsächlich der direkten „Weitergabe“ von multiubiquitinierten Substraten von Ufd2 an das Proteasom.

## **2.5 Ubiquitin wird in *ufd3*-Mutanten Ufd2- und proteasomabhängig abgebaut**

Da zunächst keine Interaktoren identifiziert werden konnten, die Rückschlüsse auf die Funktion von Ufd3 zuließen, wurde die  $\Delta ufd3$ -Mutante weiter hinsichtlich ihres Phänotyps in der Ubiquitin-Homöostase untersucht.  $\Delta ufd3$ -Mutanten zeigen verminderte Mengen an zellulärem konjugiertem und nicht-konjugiertem Ubiquitin (Johnson *et al.*, 1995). Eine niedrigere Expression von Ubiquitin war unwahrscheinlich (Ogiso *et al.*, 2004), daher wurde der Umsatz des freien Ubiquitins in einem *Cycloheximid Chase*-Experiment untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das freie Ubiquitin in der  $\Delta ufd3$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp unverhältnismäßig schnell depletiert wird (Abbildung 11A). Interessanterweise konnte dieser Phänotyp



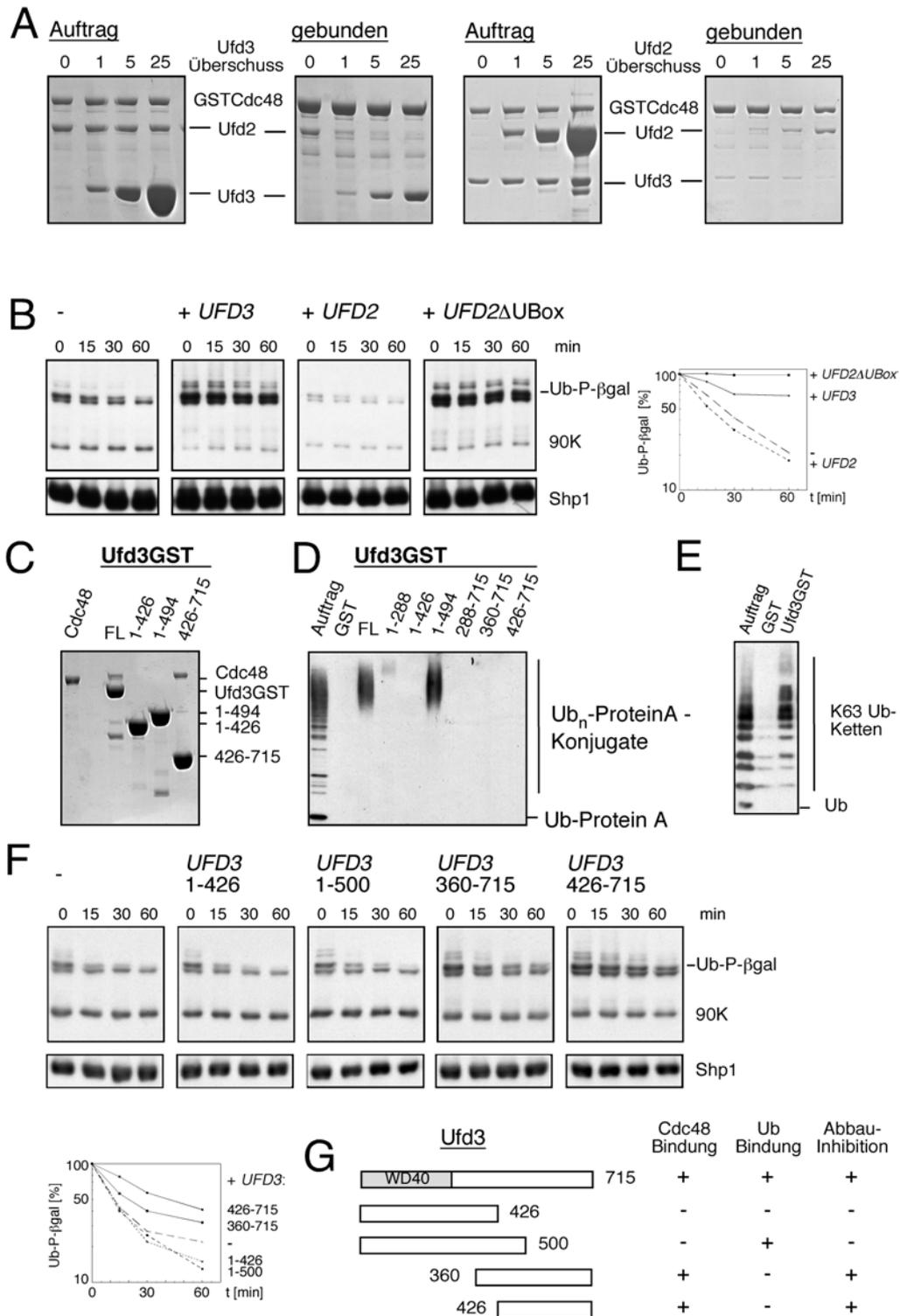
**Abbildung 11: Der Ubiquitinmangel-Phänotyp von  $\Delta ufd3$ -Mutanten.** A Ubiquitininstabilität in  $\Delta ufd3$  und  $\Delta ufd3$ -Doppelmutanten. Die angegebenen Mutanten wurden bis zur logarithmischen Phase angezogen. Nach der Zugabe von Cycloheximid wurden zu den angegebenen Zeiten Aliquots genommen und denaturierende Proteinextrakte gemacht. Analyse durch 8-20% SDS PAGE und Blot gegen Ubiquitin oder Pgk1 (als Kontrolle). B Siebenfache serielle Verdünnungsreihen der angegebenen Stämme auf SC-Medium oder SC-Medium mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid.

durch Deletion von *UFD2* partiell und durch *pre1-1*, eine Mutation im Proteasom (Heinemeyer *et al.*, 1991, Seufert und Jentsch, 1992), fast völlig supprimiert werden (Abbildung 11A). Ubiquitin könnte demnach in der  $\Delta ufd3$ -Mutante durch aberrante *UFD2*-Aktivität proteasomal abgebaut werden, möglicherweise zusammen mit Substraten. Ein ähnliches Modell ist auch für den Ubiquitin-Depletions-Phänotyp von  $\Delta ubp6$ -Mutanten vorgeschlagen worden. In dieser Mutante erzeugt eine proteasomal vermittelte Ubiquitin-Depletion eine Hypersensitivität gegenüber dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) (Hanna *et al.*, 2003). Da der beobachtete Phänotyp der  $\Delta ufd3$ -Mutante dem beschriebenen der  $\Delta ubp6$ -Mutante sehr ähnlich war, wurde getestet, ob  $\Delta ufd3$ -Mutanten ebenfalls CHX-sensitiv sind. Die  $\Delta ufd3$ -Mutante zeigte auf CHX-haltigem Medium tatsächlich einen starken

Wachstumsdefekt, der bei erhöhter Temperatur (34-37°C) zu Lethalität führte (Abbildung 11B). Dieser Defekt war auf die Depletion von Ubiquitin zurückzuführen, da der Phänotyp durch Einführung eines Ubiquitin-Überexpressionsplasmids supprimiert werden konnte (siehe unten).  $\Delta ufd3$   $\Delta ubp6$ -Doppelmutanten waren auf CHX-Medium bei keiner Temperatur lebensfähig, während die Deletion von *UFD2* die CHX-Sensitivität von  $\Delta ufd3$  wiederum partiell supprimierte.

## **2.6 Ufd3 stabilisiert Cdc48-Substrate, indem es mit Ufd2 um eine Cdc48-Bindestelle kompetiert**

Die Suppression des  $\Delta ufd3$ -Phänotyps durch Deletion von *UFD2* suggerierte, dass der  $\Delta ufd3$ -Phänotyp mindestens partiell auf eine aberrante Aktivität von Ufd2 zurückzuführen war und dass eine Funktion von Ufd3 die eines Ufd2-Gegenspielers oder Inhibitors ist. Wie könnte nun Ufd3 die Ufd2-Aktivität regulieren? Ein interessanter Hinweis hierzu ergab sich aus der Analyse der Interaktionen von Ufd3 und Ufd2 mit Cdc48. Sowohl Ufd2 als auch Ufd3 interagieren mit Cdc48 über eine Bindestelle an oder nahe der D2-ATPase-Domäne (siehe Abbildungen 1 und 2). Die beiden Faktoren sind nicht an der Substraterkennung von Cdc48 beteiligt (Abbildung 8B). Weiterhin scheint Cdc48 Substrate direkt an Ufd2 „weiterzugeben“, indem es an Ufd2 bindet. Eine Erklärung für die präsentierten genetischen Daten könnte also sein, dass Ufd3 mit der Substratbindung von Ufd2 interferiert, indem es mit Ufd2 um Cdc48-Bindung kompetiert. Die Funktion von Ufd3 wäre dann eine Stabilisierung von Cdc48-Substraten. Um diese Idee zu überprüfen, wurde zunächst getestet, ob Ufd2 und Ufd3 *in vitro* um die Cdc48-Bindung kompetieren. Dazu wurde in *Pulldown*-Experimenten eine konstante Menge rekombinantes, GST-markiertes Cdc48 mit konstanten Mengen von entweder Ufd2 oder Ufd3 und ansteigenden Mengen des jeweils anderen Proteins inkubiert und dann mit Glutathion-*Beads* präzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung analysiert. Tatsächlich verminderten hohe Mengen von Ufd3 die Bindung von Ufd2 an Cdc48 und umgekehrt (Abbildung 12A), wobei der Effekt von erhöhten Ufd3-



**Abbildung 12: Ufd3 kompetiert mit Ufd2 um die Bindung an Cdc48.** A GST-Cdc48 wurde jeweils mit konstanten Mengen Ufd2 und ansteigenden Mengen Ufd3 (links) oder umgekehrt (rechts) inkubiert und mit Glutathion-Beads präzipitiert. Gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. B Einfluss der Überexpression von Ufd3, Ufd2 oder Ufd2ΔUBox auf den Abbau von Ub-P-βgal. Analyse

im *Promoter Shutoff/Cycloheximide Chase* Experiment. Ufd3, Ufd2, Ufd2 $\Delta$ UBox sowie Ub-P- $\beta$ gal wurden jeweils unter dem GAL-Promoter exprimiert. Der Abbau von Ub-P- $\beta$ gal wurde mit einer CCD-Kamera quantifiziert (Graph rechts). C, D, E Identifikation funktioneller Domänen von Ufd3. An Glutathion-*Beads* gekoppeltes Ufd3-GST oder GST-markierte Ufd3-Fragmente wurden mit rekombinantem Cdc48 (C), auf Protein A assemblierten Ubiquitinketten (D) oder mit über Lysin 63 vernetzte Polyubiquitinketten inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen wurden gebundene Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (C), Anti-Protein A-Blot (D) oder Anti-Ubiquitin-Blot (E) analysiert. F Einfluss von überexprimierten Ufd3-Fragmenten auf den Abbau von Ub-P- $\beta$ gal. Quantifizierung im Graph unten links. G Schematische Darstellung der funktionellen Ufd3-Domänen.

Mengen auf die Ufd2-Bindung stärker war als umgekehrt. Ufd2 und Ufd3 scheinen also *in vitro* um die Cdc48-Bindung zu kompetieren. Um zu testen, ob Ufd3 auch *in vivo* eine Ufd2-Funktion inhibiert, wurde als nächstes der Effekt der Ufd3-Überexpression auf den Abbau des UFD-Substrates Ub-P- $\beta$ -Galaktosidase im *Promoter-Shutoff*-Experiment untersucht. Dieses Testprotein ist im Wildtyp kurzlebig. Überexpression von Ufd2 führte zu einer weiteren Destabilisierung des Testproteins, während eine dominant-negative Version von Ufd2 mit einer Deletion der katalytischen UBox zu einer starken Stabilisierung führte (Abbildung 12B). Die Überexpression von Ufd3 führte ebenfalls zu einer starken Stabilisierung von Ub-P- $\beta$ -Galaktosidase. Wenn die beobachtete Stabilisierung tatsächlich auf Ufd2-Kompetition zurückzuführen ist, sollte die Überexpression der Cdc48-Bindedomäne von Ufd3 alleine einen ähnlichen Effekt auf den Ub-P- $\beta$ -Galaktosidase-Abbau haben. Um diese Kontrolle durchzuführen, mussten die funktionellen Domänen von Ufd3 identifiziert werden.

Es gibt zwei bekannte direkte Interaktoren von Ufd3, Cdc48 (Ghislain *et al.*, 1996) und Ubiquitinketten (Russell und Wilkinson, 2004). Um die entsprechenden Bindedomänen in Ufd3 zu identifizieren, wurden verschiedene N- und C-terminale Fragmente von Ufd3 als GST-Fusionsproteine hergestellt. In *Pulldown*-Experimenten wurde zunächst getestet, welche Bereiche von Ufd3 für die Interaktion mit Cdc48 benötigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass alle Fragmente, die die C-terminalen 290 Aminosäuren beinhalteten, mit Cdc48 interagieren konnten (Abbildung 12C).

Zur Identifizierung der Ubiquitin-Bindedomäne wurden die Ufd3-Fragmente auf ihre Interaktion mit einem *in vitro* multiubiquitiniertem Ub-Protein-A-Fusionsprotein (Koepl *et al.*, 1999) untersucht. Diese Konjugate interagierten mit Vollängen-Ufd3 und mit einem Fragment, das die ersten 494 Aminosäuren von Ufd3 beinhaltet, aber nicht mit kürzeren N-terminalen Versionen wie etwa dem isolierten *WD40-Repeat*-Motiv oder mit Fragmenten, in denen das *WD40-Repeat*-Motiv deletiert war (Abbildung 12D). Ausserdem interagiert Ufd3 auch mit Ubiquitinketten, die über Lys-63 vernetzt sind (Abbildung 12E). Seine Spezifität hinsichtlich des Ubiquitinkettentyps scheint also gering zu sein. Insgesamt ist die Ubiquitinbindestelle von Ufd3 relativ komplex und beinhaltet sowohl das *WD40-Repeat*-Motiv als auch einen dahinterliegenden Bereich von ca. 200 Aminosäuren.

Nachdem die funktionellen Domänen von Ufd3 identifiziert worden waren, konnte die Frage beantwortet werden, welcher Bereich von Ufd3 für die Stabilisierung von Ub-P- $\beta$ -Galaktosidase verantwortlich war. Der UFD-Abbau war nicht verlangsamt, wenn die Zellen N-terminale Ufd3-Fragmente überexprimierten, die den *WD40-Repeat*-Bereich (Ufd3 1-426) oder die gesamte Ubiquitinbindestelle (Ufd3 1-500) enthielten (Abbildung 12F). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von zwei C-terminalen Ufd3-Fragmenten, die die Cdc48-Bindestelle enthielten (Ufd3 360-715 und Ufd3 426-715), zu einer Stabilisierung von Ub-P- $\beta$ -Galaktosidase. Die Cdc48-Bindedomäne war also tatsächlich für die UFD-Stabilisierung verantwortlich, was eine Konkurrenz zwischen Ufd3 und Ufd2 um Cdc48 auch *in vivo* wahrscheinlich macht.

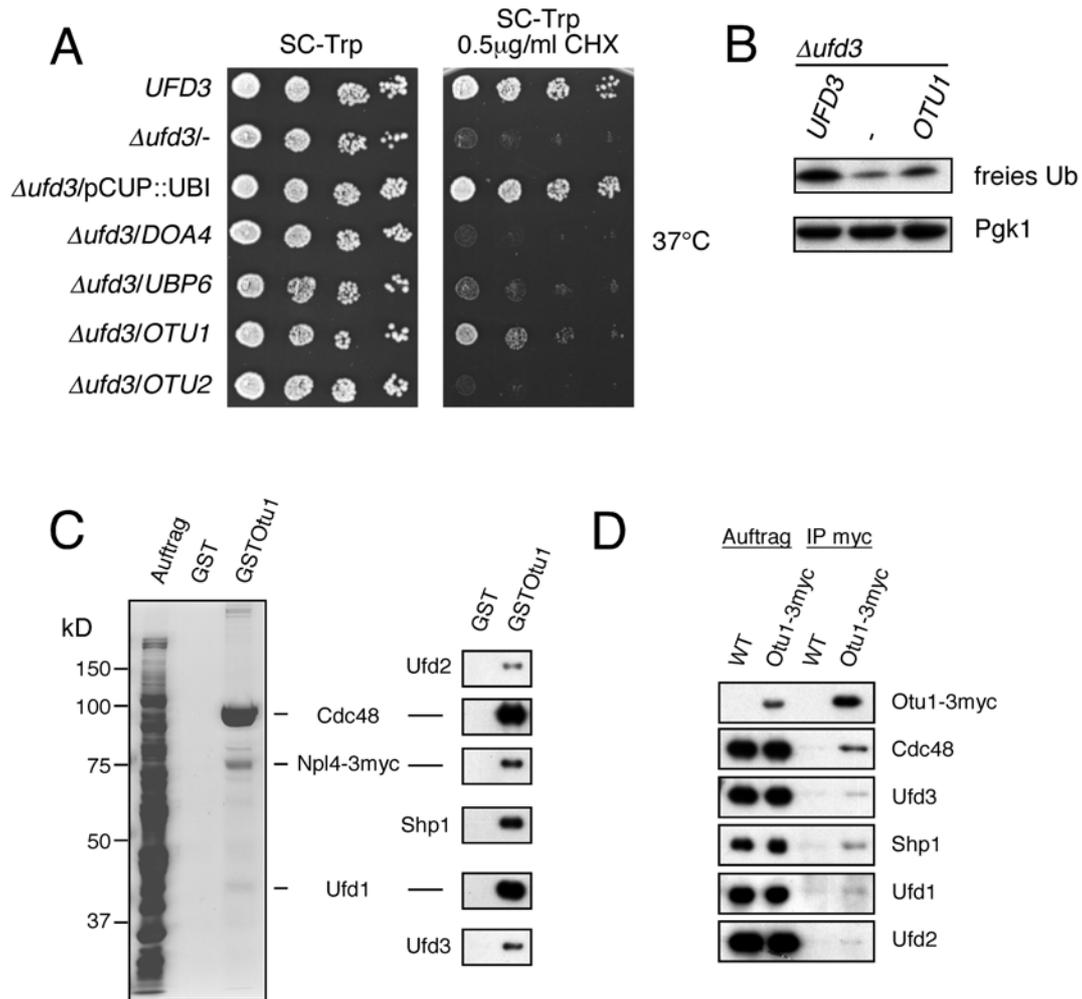
### **2.7 OTU1, ein *high copy*-Suppressor der $\Delta ufd3$ -Mutante**

Der Ubiquitin-Depletionsphänotyp der  $\Delta ufd3$ -Mutante ist dem Phänotyp der  $\Delta ubp6$ -Mutante sehr ähnlich und sogar stärker ausgeprägt. Dies und die offensichtliche Rolle von Ufd3 als Ufd2/E4-Gegenspieler legen nahe, dass Ufd3 nicht nur als Ufd2-Kompetitor wirkt, sondern auch eine Funktion in der Deubiquitinierung hat. Allerdings zeigt Ufd3 selbst keine Deubiquitinierungsaktivität *in vitro* (siehe unten). Es blieb aber die Möglichkeit, dass Ufd3 mit einem Deubiquitinierungsenzym kooperieren oder mit einem

Deubiquitinierungsenzym redundant sein könnte. Die Cycloheximid-Sensitivität der  $\Delta ufd3$ -Mutante ist eine Folge der Ubiquitindepletion und ein selektierbarer Phänotyp, der für eine Suppressionsstudie genutzt werden konnte. Wenn Ufd3 eine Funktion bei der Deubiquitinierung haben sollte – etwa durch Aktivierung eines Deubiquitinierungsenzyms, dann könnte ein solches Deubiquitinierungsenzym als *high copy*-Suppressor der  $\Delta ufd3$ -Mutante wirken. Als Kandidaten für einen Suppressionsversuch wurden folgende Deubiquitinierungsenzyme ausgewählt:

- *DOA4*, weil  $\Delta doa4$ -Mutanten starke Veränderungen im Ubiquitin-Konjugatmuster aufweisen (Swaminathan *et al.*, 1999),
- *UBP6*, da die Phänotypen der  $\Delta ufd3$ - und  $\Delta ubp6$ -Mutanten sehr ähnlich sind (siehe oben),
- die beiden putativen OTU-Domänen-Deubiquitinierungsenzyme im Hefegenom, *OTU1* und *OTU2* (Offene Leserahmen *YFL044c* bzw. *YHL013c*). VCIP135, ein kürzlich identifizierter Interaktor des Cdc48-Homologes der Ratte, p97, ist ein OTU-Deubiquitinierungsenzym (Wang *et al.*, 2004). *OTU1* war besonders interessant, da es mit Genen für Cdc48-Interaktoren koreguliert zu sein scheint (Jelinsky *et al.*, 2000).

Die Cycloheximid-Sensitivität der  $\Delta ufd3$ -Mutante lässt sich sowohl durch ein *UFD3*-Expressionsplasmid komplementieren als auch durch ein Ubiquitin-Überexpressionsplasmid (YEp96, Ubiquitinexpression vom *CUP1*-Promoter) supprimieren, sie ist also eine Folge der bereits gezeigten Ubiquitindepletion (Abbildung 13A). Die Überexpression von Doa4 hatte keinen Einfluß auf die Cycloheximid-Sensitivität von  $\Delta ufd3$ -Mutanten, ebensowenig wie die von Otu2. Ubp6 schien einen sehr leichten positiven Einfluss auf  $\Delta ufd3$ -Mutanten zu haben. Am stärksten war der Effekt der Otu1-Überexpression, durch die die Cycloheximid-Sensitivität von  $\Delta ufd3$ -Mutanten in einem beträchtlichen Maße supprimiert werden konnte. *OTU1* ist also ein klarer *high copy*-Suppressor der  $\Delta ufd3$ -Mutante. Die Überexpression von Otu1 erhöhte auch die Menge an freiem Ubiquitin in  $\Delta ufd3$ -Mutanten (Abbildung 13B), was einen indirekten Effekt von Otu1 auf die Cycloheximid-Sensitivität unwahrscheinlich machte.



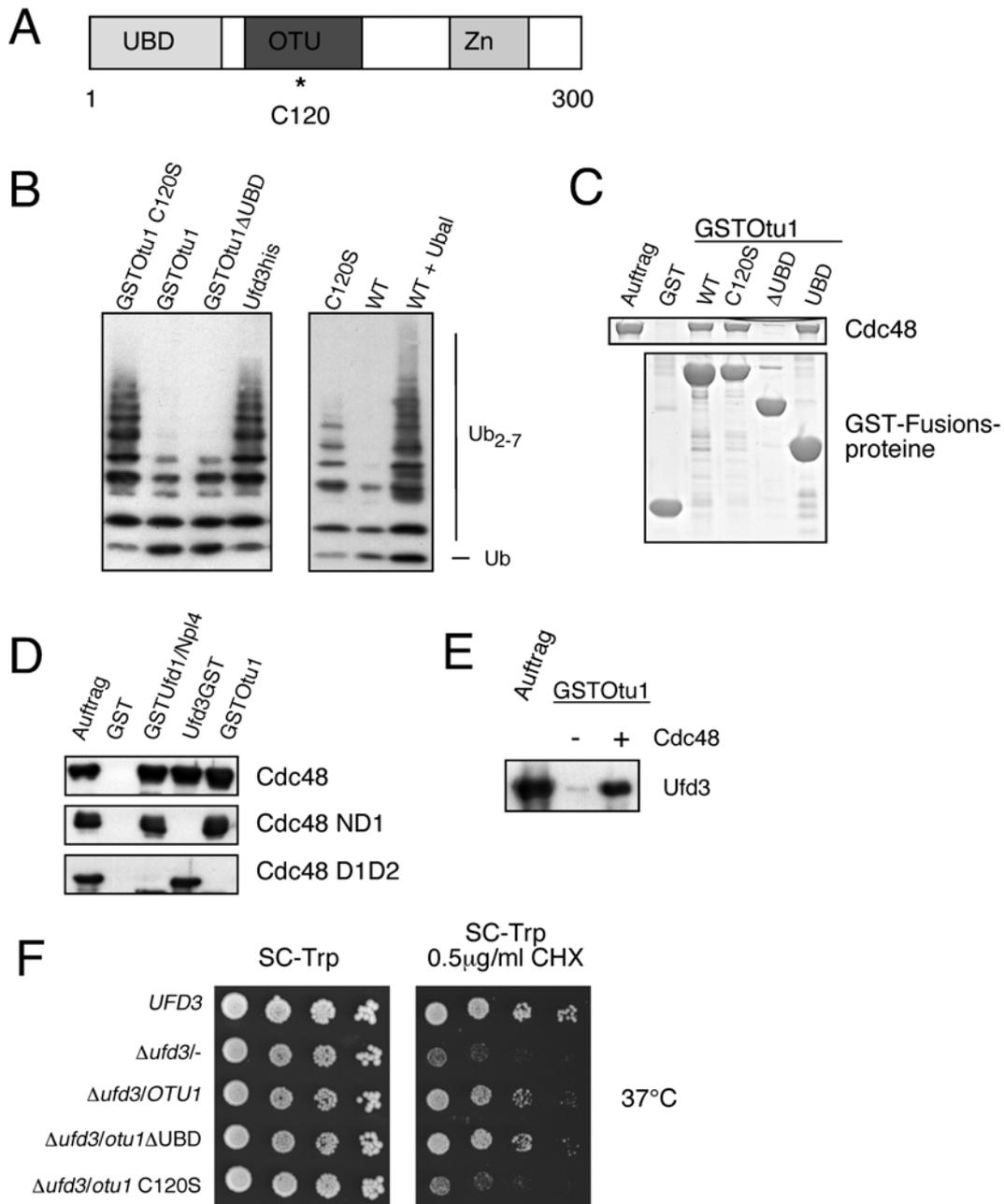
**Abbildung 13: Otu1 ist ein *high copy*-Suppressor der  $\Delta$ *ufd3*-Mutante und interagiert mit Cdc48 und seinen Kofaktoren.** A  $\Delta$ *ufd3*-Zellen, die die angegebenen Proteine von *Multicopy*-Plasmiden und dem ADH-Promoter (außer Doa4 und Ubiquitin) exprimierten, wurden in seriellen Verdünnungsreihen auf SC-Trp-Platten mit oder ohne Cycloheximid bei 37°C inkubiert. B Menge an freiem Ubiquitin in  $\Delta$ *ufd3*-Zellen mit den jeweils angegebenen Plasmiden. Western Blot mit Anti-Ubiquitin-Antikörper, Pgk1 diente als Ladekontrolle. C GST-Affinitätschromatographie mit GST-Otu1. Durchführung und Analyse wie in Abbildung 1. Links, Coomassie-gefärbtes SDS-Gel, rechts Blots mit den jeweils angegebenen Antikörpern. D Bestätigung der Otu1-Interaktoren durch Immunpräzipitation. Endogen exprimiertes Otu1-3myc wurde mit myc-Antikörpern präzipitiert und gebundene Faktoren wurden mit den angegebenen Antikörpern im Blot nachgewiesen. Als Negativkontrolle dienten Wildtypzellen mit unmarkiertem Otu1.

Um Otu1 weiter zu charakterisieren, wurde ein GST-Otu1-Fusionsprotein hergestellt und eine GST-Affinitätsreinigung durchgeführt. Glutathion-Beads wurden mit GST-Otu1 beladen und mit einem Hefe-Proteinextrakt inkubiert. Nach mehreren Waschsritten wurden die Beads mit einem Hochsalzpuffer eluiert, und das Eluat wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung analysiert. Das Eluat enthielt eine prominente Bande bei 110 kD und zwei schwächere Banden von ca. 70

und 40 kD (Abbildung 13C). Die drei Proteine konnten massenspektrometrisch und im Western Blot als Cdc48, Npl4 und Ufd1 identifiziert werden. Im Western Blot konnten im Eluat zusätzlich Shp1, Ufd2 und Ufd3 detektiert werden. Die gefundenen Interaktionen wurden durch Koimmunpräzipitation aus Hefelysaten bestätigt. Dazu wurden Hefen benutzt, die myc-epitopmarkiertes Otu1 vom endogenen Genlokus exprimierten, Wildtyp-Zellen dienten als Negativkontrolle. In myc-Präzipitaten aus Otu1-3myc-exprimierenden Zellen konnten spezifisch Cdc48, Shp1, Ufd3, Ufd1 und niedrige Mengen an Ufd2 nachgewiesen werden (Abbildung 13D). Damit ist Otu1 ein neues Cdc48-Bindeprotein. Da Otu1 ein Cdc48-Interaktor und ein *high copy*-Suppressor der  $\Delta ufd3$ -Mutante ist, sind die Defekte der letzteren Mutante wahrscheinlich zum Teil auch auf eine gestörte Deubiquitinierung von Cdc48-Substraten zurückzuführen.

## 2.8 Domänenanalyse von Otu1

Um weitere Einsichten in die Funktionsweise von Otu1 zu gewinnen, sollten als nächstes seine funktionellen Domänen definiert werden. Durch vergleichende Sequenzanalyse kann man drei unterschiedliche Domänen in Otu1 detektieren: die OTU-Domäne mit dem katalytischen Cysteinrest an der Position 120, eine putative Zinkbindedomäne mit Ähnlichkeit zu einer Ubiquitinbindestelle in Vertebraten-Npl4 (Meyer *et al.*, 2002) nahe dem C-Terminus und eine der UBX-Domäne ähnliche *Ubiquitin Fold*-Domäne (Bruderer *et al.*, 2004) in den ersten 80 Aminosäuren (Abbildung 14A). Otu1 zeigte eine klare Deubiquitinierungsaktivität gegen gereinigte, über Lys-48 vernetzte Ubiquitinketten, die durch die Mutation von Cystein 120 zu Serin verlorenging und unabhängig von der *Ubiquitin Fold*-Domäne war (Abbildung 14B). Ufd3 hingegen zeigte keine solche Aktivität und beeinflusste die Aktivität von Otu1 nicht (Abbildung 14B und nicht gezeigt). Otu1 und die katalytische Otu1 C120S Mutante binden gleichermaßen gut an Cdc48. Die Deletion der *Ubiquitin Fold*-Domäne führt hingegen zum Verlust der Cdc48-Interaktion. Die isolierte *Ubiquitin Fold*-Domäne kann Cdc48 offensichtlich mit Wildtyp-Affinität binden (Abbildung 14C). Somit konnten die Hauptaktivitäten von Otu1 klaren Bereichen des Proteins zugeordnet werden.

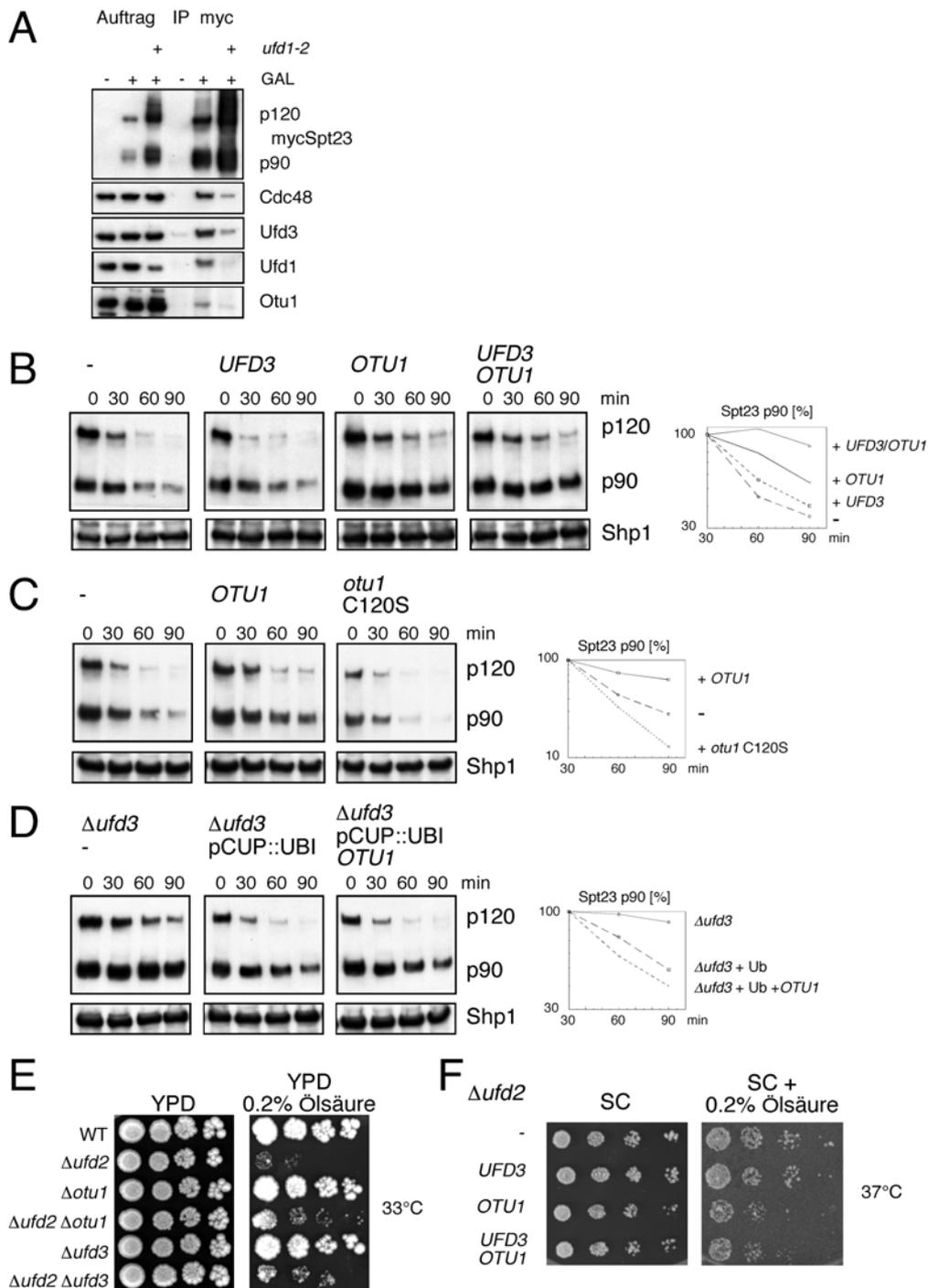


**Abbildung 14: Domänenanalyse von Otu1.** A Schematische Darstellung der Domänenorganisation von Otu1. B Deubiquitinierungsaktivität von Otu1. 0,5μg Multiubiquitinketten (n=2-7, Lysin 48-vernetzt) wurden mit je ca. 2μg der angegebenen Proteine über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Analyse mittels 8-20% Gelelektrophorese und Ubiquitin-Blot. C Die Cdc48-Bindedomäne von Otu1. Die angegebenen GST-Otu1-Fusionsproteine wurden auf Glutathion-Beads immobilisiert und mit rekombinantem Cdc48 inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde das gebundene Material durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. D Die angegebenen immobilisierten GST-Fusionsproteine wurden jeweils mit rekombinantem Cdc48, Cdc48 ND1 und Cdc48 D1D2 inkubiert. Nach Waschschritten wurden gebundene Proteine im Cdc48-Blot detektiert. E Cdc48-Abhängigkeit der Otu1-Ufd3-Interaktion. Immobilisiertes GST-Otu1 wurde mit Ufd3 mit oder ohne Cdc48 inkubiert. Gebundenes Material wurde im Cdc48-Blot detektiert. F Für die Suppression der Δufd3-Mutante benötigte Domänen von Otu1. Durchführung wie in Abbildung 13A.

Wie durch die Homologie mit Npl4 zu erwarten war, ist die Otu1-Cdc48-Interaktion abhängig von der Cdc48 N-Domäne (Abbildung 14D). Die beobachtete Interaktion zwischen Otu1 und Ufd3 wird von Cdc48 über seine verschiedenen Bindestellen vermittelt (Abbildung 14E). Abschließend wurde untersucht, ob die beiden Eigenschaften von Otu1, Deubiquitinierungsaktivität und Cdc48-Bindung, für die Suppression der  $\Delta ufd3$ -Mutante erforderlich sind. Dazu wurden Wildtyp-*OTU1* und die beiden Mutanten *otu1 C120S* und *otu1 $\Delta$ UBD* jeweils auf Überexpressionsplasmiden in  $\Delta ufd3$ -Mutanten transformiert und auf ihre Fähigkeit getestet, die Cycloheximid-Sensitivität der Mutante zu retten. Die katalytisch inaktive Mutante C120S konnte die Lebensfähigkeit von  $\Delta ufd3$ -Zellen auf Cycloheximid-Medium nicht signifikant erhöhen, interessanterweise war *otu1 $\Delta$ UBD* dazu aber wie Wildtyp-*OTU1* in der Lage (Abbildung 14F).

## 2.9 Spt23 als Substrat für Ufd3 und Otu1

Die bisher gezeigten Daten suggerierten, dass Ufd3 und Otu1 zusammen als Ufd2-Gegenspieler wirken. Als nächstes sollte deshalb untersucht werden, ob Ufd3 und Otu1 auch das endogene Ufd2-Substrat Spt23 stabilisieren können. Zunächst wurde geprüft, ob die beiden Faktoren mit Spt23 interagieren. Dazu wurde myc-markiertes Spt23 in Wildtyp- oder *ufd1-2*-Zellen überexprimiert und mit myc-Antikörpern präzipitiert. Tatsächlich konnten im Wildtyp-Präzipitat nicht nur Cdc48 und Ufd1 detektiert werden, sondern auch endogenes Ufd3 und Otu1 (Abbildung 15A). Die Interaktionen aller vier Faktoren mit Spt23 war in *ufd1-2*-Zellen stark vermindert, was auf ein epistatisches Verhältnis zwischen Cdc48 und Ufd3 bzw. Otu1 und auf eine Interaktion mit dem aktiven p90-Fragment im Zellkern hinwies (Rape *et al.*, 2001). Um den Einfluss von Ufd3 und Otu1 auf den Abbau des p90-Fragmentes zu untersuchen, wurde die Stabilität von p90 in *Promoter shutoff*-Experimenten in Zellen untersucht, die Ufd3, Otu1 oder beide Faktoren zusammen überexprimierten. Überraschenderweise hatte die Expression von Ufd3 alleine keinen großen Einfluss auf die Stabilität von p90 (Abbildung 15B). Durch Überexpression von Otu1 wurde p90 hingegen deutlich



**Abbildung 15: Spt23 als Substrat für Ufd3 und Otu1.** A myc-markiertes Spt23 wurde aus Zelllysaten immunpräzipitiert. Gebundene Proteine wurden im Western Blot detektiert. Nichtinduzierte Zellen dienten als Negativkontrolle. B, C, D Einfluss von Ufd3 und Otu1 auf die Stabilität von Spt23. Analyse durch GAL-Promotor *Shutoff/Cycloheximid Chase*. B Überexpression von Ufd3 und Otu1. C Otu1-Deubiquitinierungsaktivität ist nötig für die Stabilisierung von Spt23. D Ufd3 ist notwendig für den Otu1-Überexpressionseffekt. Spt23-*Shutoffs* in  $\Delta ufd3$ -Zellen mit oder ohne Ubiquitin- und Otu1-Überexpression. E Modulation der Ölsäuresensitivität von  $\Delta ufd2$ -Zellen durch Deletion von *UFD3* oder *OTU1*. Serielle Verdünnungsreihen der angegebenen Mutanten auf YPD-Medium mit oder ohne Ölsäure. Um eventuelle Nebeneffekte durch Ubiquitindepletion zu vermeiden, trugen alle Stämme integrative *UBI4*-Plasmide. F Überexpression von Ufd3 und Otu1 in  $\Delta ufd2$ -Zellen. Serielle Verdünnungsreihen auf SC-Medium oder SC-Medium mit 0,2% Ölsäure.

stabilisiert, und die Koexpression von Ufd3 und Otu1 führte ebenfalls zu einer – oft noch stärkeren – Stabilisierung von p90. Als weitere Kontrolle wurde der Einfluss der katalytisch inaktiven *otu1 C120S*-Mutante auf die p90-Stabilität untersucht (Abbildung 15C). Im Gegensatz zu Wildtyp-Otu1 führte die Expression dieser Mutante nicht zu einer Stabilisierung von p90, vielmehr schien es, dass Spt23 p90 zusätzlich destabilisiert wird. Dies könnte ein Hinweis auf einen dominant-negativen Effekt der katalytischen Mutante sein – also indirekt darauf, dass die p90-Stabilität auch durch endogenes Otu1 reguliert wird.

Der Effekt der Otu1-Überexpression auf die p90-Stabilität war überraschend groß und weitgehend unabhängig von der Koexpression von Ufd3. Entweder ist der beobachtete Effekt also unabhängig von Ufd3, oder die endogene Menge an Ufd3 ist ausreichend, um den Otu1-Effekt zu erzielen. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde der Einfluss der Otu1-Überexpression auf Spt23 in  $\Delta ufd3$ -Mutanten untersucht. Dabei musste berücksichtigt werden, dass die Depletion von Ubiquitin in diesen Mutanten zu einer unspezifischen, starken Stabilisierung der meisten Ubiquitin-abhängigen Abbausubstrate führt. Dies war auch für Spt23 der Fall, und zwar sowohl bei der Ubiquitin-abhängigen Prozessierung von p120 und – extrem stark – beim Abbau des p90-Fragmentes (Abbildung 15D). Die Expression von Ubiquitin vom *CUP1*-Promotor revertierte diese Stabilisierung jedoch weitgehend. Wenn Otu1 in  $\Delta ufd3$ -Mutanten mit zusätzlichem Ubiquitin überexprimiert wurde, führte dies zu keiner nennenswerten Veränderung der Abbaukinetik (Abbildung 15D). Ufd3 könnte also für die volle Aktivität von Otu1 nötig sein.

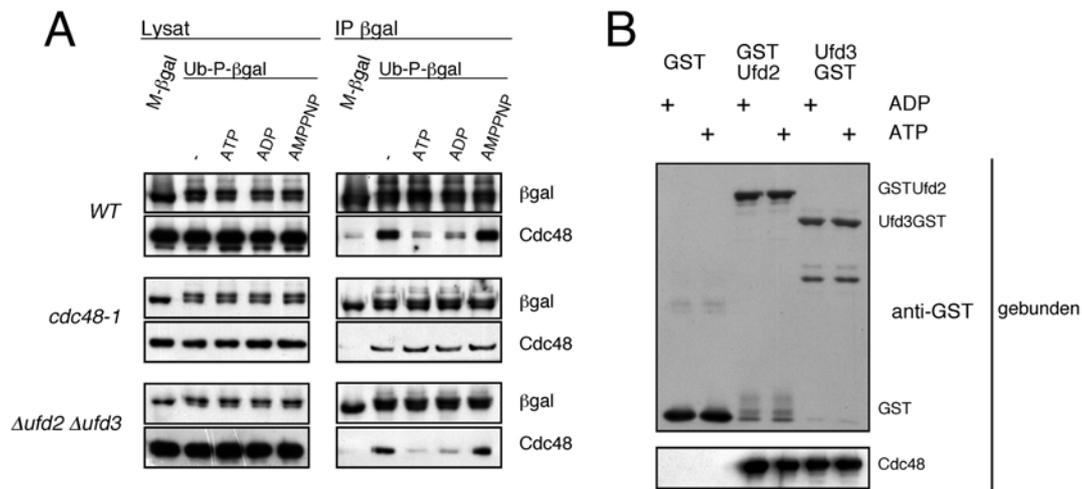
Die Interpretation von Überexpressionsphänotypen ist manchmal schwierig, da die Überexpression eines Faktors auch zu unerwünschten, unspezifischen Nebeneffekten führen kann. Um *loss-of-function*-Evidenz für die Funktion von Ufd3 und Otu1 als Antagonisten von Ufd2 im Spt23-Abbau zu finden, wurden  $\Delta ufd2 \Delta otu1$  und  $\Delta ufd2 \Delta ufd3$ -Doppelmutanten untersucht. Die Stabilisierung von Spt23 in  $\Delta ufd2$ -Mutanten führt in diesen Zellen zu einer Hypersensitivität gegen Ölsäure, das Endprodukt des OLE1-Aktivierungswegs (Doktorarbeit M. Rape, Universität Bayreuth). Wenn nun Ufd3 und Otu1 stabilisierend auf Spt23 wirken, könnte die Deletion von *UFD3* oder *OTU1* im

$\Delta ufd2$ -Hintergrund zu einer partiellen Destabilisierung von Spt23 führen und somit zu einer Suppression der Ölsäure-Sensitivität der  $\Delta ufd2$ -Mutante. Um potentielle Nebeneffekte durch die Ubiquitindepletion in  $\Delta ufd3$ -Mutanten zu vermeiden, wurden alle Stämme für diesen Versuch mit einem integrativen *UBI4*-Plasmid transformiert. Im entsprechenden Versuch waren  $\Delta ufd2$ -Mutanten extrem empfindlich gegen Ölsäure, während  $\Delta otu1$ -Mutanten und  $\Delta ufd3$ -Mutanten keine offensichtlichen Wachstumsdefekte zeigten (Abbildung 15E). Die jeweiligen Doppelmutanten  $\Delta ufd2 \Delta otu1$  und  $\Delta ufd2 \Delta ufd3$  zeigten zwar klare Wachstumsdefekte auf Ölsäuremedium, wuchsen aber dennoch deutlich besser als die  $\Delta ufd2$ -Einzelmutante, supprimierten ihren Phänotyp also partiell. Dieser Befund war konsistent mit der Annahme, dass Ufd2 und Ufd3/Otu1 antagonistische Wirkungen auf den p90-Abbau haben.

Die Ölsäure-Sensitivität von  $\Delta ufd2$ -Mutanten ist auf Vollmedium am stärksten, auf synthetischen Ölsäuremedien zeigen diese Zellen relativ robustes Wachstum. Durch Überexpression von *OTU1* können  $\Delta ufd2$ -Zellen aber auch auf SC-Medium gegen Ölsäure sensitiviert werden (Abbildung 15E). Dies spricht ebenfalls für das oben dargelegte Modell.

### **2.10 Ist die Substratweitergabe von Cdc48 auf Ufd2/Ufd3 ATP-abhängig?**

Die bisherigen Daten sprechen für ein Modell, in dem ein an Cdc48 gebundenes Substrat an Ufd2 oder Ufd3/Otu1 weitergegeben und von diesen dann entsprechend ihrer Aktivität modifiziert wird. Der Mechanismus dieser Substratweitergabe ist aber noch weitgehend unklar. Eine offene Frage ist zum Beispiel, ob die ATP-Hydrolyse durch Cdc48 bei diesem Prozess eine Rolle spielt, und ob dies durch Ufd2 und Ufd3 beeinflusst wird. Deshalb wurde der Effekt von ATP und Ufd2/3 auf die Interaktion zwischen einem Substrat und Cdc48 untersucht. Das UFD-Protein Ub-P- $\beta$ -Galaktosidase ist ein gut charakterisiertes Cdc48-Substrat, und man findet gut detektierbare Mengen an Cdc48 in Ub-P- $\beta$ -Galaktosidase-Präzipitaten aus Zelllysaten (Abbildung 16A). Die Zugabe von 5 mM ATP oder ADP zum Versuchsansatz unterbrach diese Interaktion, jedoch nicht die Gabe von 5 mM des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogs AMPPNP. Das *cdc48-1*-Allel hat eine Mutation im „Walker B“-



**Abbildung 16: ATP-Abhängigkeit verschiedener Cdc48-Interaktionen.** A Einfluss verschiedener Nukleotide und Mutanten auf die Cdc48-Substrat-Interaktion. Die jeweiligen Stämme exprimierten entweder βgal oder Ub-P-βgal. Nach Zell-Lyse wurden 5 mM des jeweils angegebenen Nukleotids zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurden die βgal-Derivate aus dem Zelllysate immunpräzipitiert, und das gebundene Cdc48 wurde im Western Blot detektiert. B Einfluss von ATP oder ADP auf die Interaktion zwischen Ufd2 oder Ufd3 und Cdc48. Immobilisiertes GST, GSTUfd2 oder Ufd3GST wurden mit rekombinantem Cdc48 in der Gegenwart von 5 mM ATP oder ADP inkubiert, gebundenes Cdc48 wurde im Western Blot detektiert.

Motiv der D1-ATPase-Domäne (Christian Schuberth, persönliche Mitteilung) und das kodierte *cdc48-1*-Protein könnte daher eine langsamere ATP-Hydrolyse-Rate haben. Die Gabe von ATP oder ADP hatte interessanterweise keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Ub-P-β-Galaktosidase und dem *cdc48-1*-Mutantenprotein. Die ATP-Hydrolyse in der D1-Domäne könnte also für die Substratfreigabe von Cdc48 benötigt werden. Im entsprechenden Experiment in  $\Delta ufd2 \Delta ufd3$ -Doppelmutanten wurde die Interaktion zwischen Cdc48 und Ub-P-β-Galaktosidase hingegen wie im Wildtyp durch die Zugabe von ATP oder ADP, aber nicht AMPPNP, unterbrochen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Substratweitergabe von Cdc48 auf Ufd2/Ufd3 nicht mit einer Ufd2/3-induzierten ATPase-Aktivität von Cdc48 einhergeht. Dementsprechend wird die Interaktion zwischen Ufd2/Ufd3 und Cdc48 in GST-Pulldown-Experimenten auch nicht von zugesetzten Nukleotiden beeinflusst (Abbildung 16B). Am wahrscheinlichsten ist also, dass die Interaktion von Ufd2 und Ufd3 mit Cdc48 der Erhöhung der lokalen

Konzentration der beiden erstenen Faktoren dient, damit sie von Cdc48 losgelöste Substrate effizient „abfangen“ und prozessieren können.

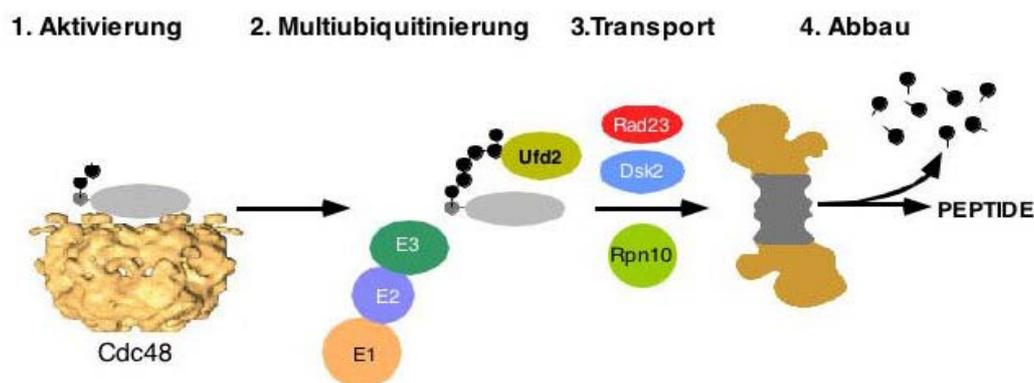
### 3 Diskussion

Die AAA-ATPase Cdc48 und ihre Interaktionspartner sind wichtige Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems und vermitteln den Abbau ubiquitiniertes Substratproteine. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stabilität von Cdc48-Substraten durch die Cdc48-Bindeproteine Ufd2 und Ufd3 moduliert bzw. reguliert werden kann. Dabei wirken Ufd2 und Ufd3 als jeweils pro- bzw. anti-degradative Faktoren und somit antagonistisch. Cdc48- und Ufd2-abhängige Abbausubstrate werden über die Rezeptorproteine Rad23 und Dsk2 zum Proteasom geleitet. Die Substratweitergabe scheint dabei durch eine direkte Interaktion zwischen Ufd2 und den Rezeptorproteinen vermittelt zu werden. Ufd3 interferiert mit diesem Abbauweg, indem es mit Ufd2 um eine Cdc48-Bindestelle kompetiert, und bewirkt so die Stabilisierung von Cdc48-Substraten. Mindestens in manchen Fällen scheint Ufd3 dabei mit dem neu identifiziertem Deubiquitinierungsenzym Otu1 zu kooperieren.

#### 3.1 Ufd2 interagiert mit Proteasomrezeptoren – ein Fall von *substrate channeling*

In Affinitätsreinigungsexperimenten konnten die beiden proteasomalen Rezeptorproteine Rad23 und Dsk2 als Interaktoren von Ufd2 identifiziert werden. Beide Proteine sind in den Abbau von UFD-Substraten impliziert (Rao und Sastry, 2002), und es konnte hier gezeigt werden, dass sie ebenfalls für den effizienten Abbau des endogenen Ufd2-Substrates Spt23 p90 benötigt werden. Dabei sind sie partiell redundant mit einem weiteren proteasomalen Rezeptor, Rpn10. Epistatische Analysen der Wachstumsphänotypen und der Ölsäuresensitivität von Doppel- und Tripelmutanten ergaben, dass Ufd2 und Rad23/Dsk2 strikt epistatisch sind, während zusätzliche Deletion von Rpn10 schwerere Defekte hervorrief. Diese Daten können durch ein Modell erklärt werden, in dem Ufd2 seine – multiubiquitinierten – Substrate obligatorisch an Rad23/Dsk2 weitergibt. Es scheint aber zumindest für Spt23 p90 noch einen weiteren Abbauweg zu geben, der vom Rezeptor Rpn10 abhängt und parallel zum beschriebenen Weg aktiv ist. Ob dieser Abbauweg noch von einer anderen Ubiquitinligase

als Ufd2 abhängt, ist unklar. Die hohe Redundanz der Substraterezeptoren ist bemerkenswert: die Ufd2-assoziierten Rezeptoren Rad23 und Dsk2 scheinen im Ubiquitinsystem weitgehend überlappende Funktionen zu haben, und mindestens im UFD- (Lambertson *et al.*, 1999) und im *OLE1*-Aktivierungsweg sind ihre Funktionen noch teilweise redundant mit Rpn10. Die genauen Beiträge der jeweiligen Rezeptoren lassen sich indes nur schwer ermitteln, da die Rolle von Rpn10 in der Substratrezeption noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Jüngere Ergebnisse lassen vermuten, dass die VWA-Domäne von Rpn10 auch für effiziente proteasomale Substraterkennung über Rad23 benötigt wird (Verma *et al.*, 2004). Trotzdem ist es interessant, dass bis zu drei verschiedene, redundante Faktoren mit Rezeptorfunktion an der proteasomalen Erkennung von UFD-Substraten und Spt23 p90 beteiligt sind. Dies unterstreicht die außerordentliche Wichtigkeit des erleichterten Substrattransports zum Proteasom. Insgesamt ist der UFD- oder Spt23-Abbauweg ein Beispiel für *substrate channeling*, da die Abbaufaktoren das Substrat systematisch zum nächsten Partner weiterreichen zu scheinen (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Epistasie im Cdc48-vermittelten Proteinabbau.** Gezeigt ist die Abfolge der Interaktionen, die ein UFD-Substrat (grau) während des Abbauprozesses mit den verschiedenen UFD-Faktoren eingeht.

### 3.2 Ufd3 ist ein Ufd2-Antagonist

Die Funktion von Ufd3 war lange Zeit unklar. Es war bekannt, dass Ufd3 ein Cdc48-Bindeprotein ist und dass einige Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems in  $\Delta ufd3$ -Mutanten stabilisiert werden. Dies sprach für eine positive Funktion im Abbau. Allerdings besitzen  $\Delta ufd3$ -Mutanten abnormal niedrige Mengen an freiem Ubiquitin, und die zusätzliche Expression von Ubiquitin scheint eine Reihe der beschriebenen Defekte aufzuheben (Johnson *et al.*, 1995, Ghislain *et al.*, 1996, Ogiso *et al.*, 2004). Dieser Defekt ist auf aberranten Ubiquitinabbau in der Mutante zurückzuführen. Vergleichbare Störungen in der Ubiquitin-Homöostase und daraus folgende, indirekte proteolytische Defekte und Hypersensitivität gegen verschiedene Inhibitoren wie etwa den Translationsinhibitor Cycloheximid sind aber typische Phänotypen für Mutanten in Deubiquitinierungsenzymen wie etwa  $\Delta ubp6$  oder  $\Delta doa4$  (Amerik *et al.*, 1997, Swaminathan *et al.*, 1999, Leggett *et al.*, 2002, Amerik und Hochstrasser, 2004). Tatsächlich sind  $\Delta ufd3$ -Mutanten ebenfalls hypersensitiv gegen Cycloheximid. Diese Ähnlichkeiten sprechen also wiederum für eine stabilisierende Funktion von Ufd3 im Ubiquitinsystem – und eventuell auch für eine Verbindung zur Deubiquitinierung. Dafür spricht auch eine synthetische Lethalität zwischen  $\Delta ufd3$ - und  $\Delta ubp6$ -Mutanten auf Cycloheximidplatten. Ufd3 zeigt allerdings selbst keine Deubiquitinierungs-aktivität. Die hier präsentierten Befunde sprechen insgesamt für eine Rolle von Ufd3 als Inhibitor (oder Modulator) des Cdc48- und Ufd2-abhängigen Proteinabbaus:

- die biochemische Analyse der Cdc48-Interaktionen zeigt, dass Ufd3 die gleiche Bindestelle auf Cdc48 besitzt wie Ufd2. Die beiden Faktoren kompetieren um die Cdc48-Bindung,
- im Gegensatz zu Ufd2 bindet Ufd3 nicht an proteasomale Substratrezeptoren wie Rad23 und Dsk2,
- *in vivo* führt die Überexpression von Ufd3 zu einer Störung des Ufd2-abhängigen UFD-Abbauweges. Dieser Effekt kann durch die Überexpression der Cdc48-Bindedomäne von Ufd3 allein teilweise reproduziert werden,

- der niedrige Level von Ubiquitin in  $\Delta ufd3$ -Mutanten ist offensichtlich auf aberranten Ubiquitinabbau zurückzuführen. Die Analyse von Doppelmutanten zeigt, dass dieser Abbau Ufd2- und proteasomabhängig ist. Deletion von *UFD2* supprimiert ebenfalls die Cycloheximidsensitivität von  $\Delta ufd3$ -Mutanten. Genetisch scheint also *UFD3* ein Antagonist von *UFD2* zu sein.

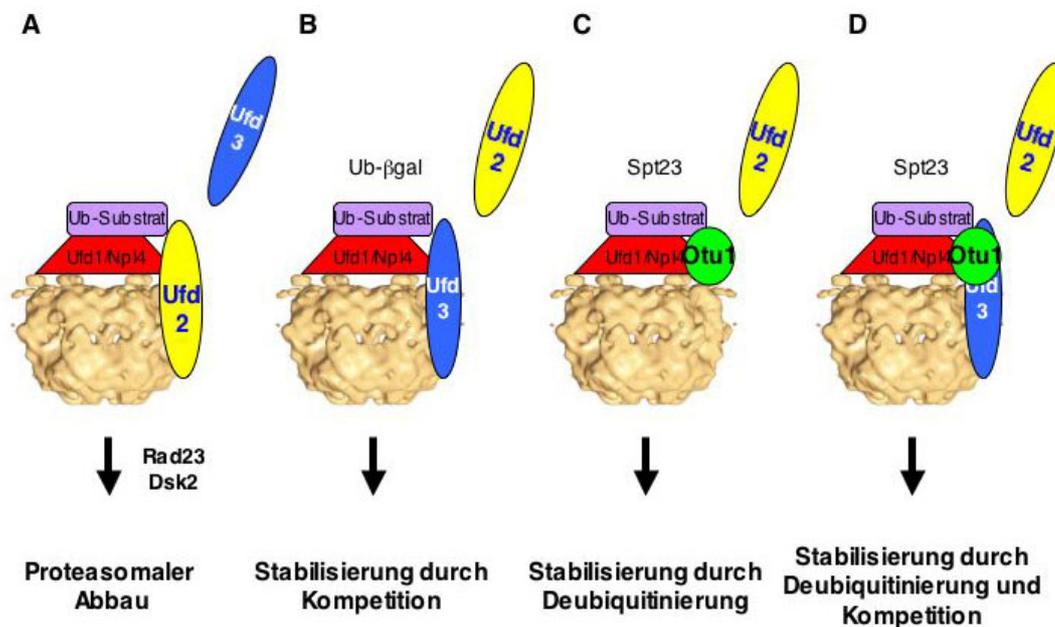
Diese Befunde können in einem einfachen Modell erklärt werden. Sowohl Ufd2 als auch Ufd3 binden Cdc48-Substratkomplexe und können die betreffenden Substrate von Cdc48 übernehmen. Dabei kompetieren sie um die Bindung an Cdc48. Die Bindung von Ufd2 führt zur Multiubiquitinierung und zum Abbau des gebundenen Substrats, während die Bindung von Ufd3 dies verhindert und zur Stabilisierung und gegebenenfalls auch zur Deubiquitinierung des Substrates führen kann (Abbildung 18). Durch Überexpression von Ufd3 werden Cdc48-Substrate präferentiell stabilisiert. Eine mögliche Erklärung für den  $\Delta ufd3$ -Mutanten-Phänotyp ist, dass normalerweise stabile, durch Ufd3 geschützte Cdc48-Substrate von Ufd2 multiubiquitiniert und zusammen mit der Ubiquitinkette abgebaut werden könnten.

### **3.3 Das Deubiquitinierungsenzym Otu1 ist ein *high copy*-Suppressor der $\Delta ufd3$ -Mutante und könnte mit Ufd3 kooperieren**

Der Ubiquitindefizienz-Phänotyp der  $\Delta ufd3$ -Mutante und die synthetischen Phänotypen mit der  $\Delta ubp6$ -Mutante sprachen für eine direkte Rolle von Ufd3 in der Deubiquitinierung von spezifischen Substraten. Da Ufd3 keine Deubiquitinierungsaktivität besitzt, blieb die Möglichkeit, dass es stattdessen mit einem Deubiquitinierungsenzym kooperiert oder in einem teils redundanten Verhältnis zu einem Deubiquitinierungsenzym steht. Ein solches Enzym sollte genetisch als *high copy*-Suppressor der  $\Delta ufd3$ -Mutante funktionieren. Tatsächlich konnte das OTU-Domänenprotein Otu1 als ein partieller Suppressor der Cycloheximidsensitivität von  $\Delta ufd3$  identifiziert werden. Eine Reihe von Befunden in dieser Arbeit sprechen zusätzlich dafür, dass Ufd3 und Otu1 funktionell miteinander kooperieren (Abbildung 18). So bindet Otu1 über seine *Ubiquitin Fold*-Domäne (Bruderer *et al.*, 2004) direkt

an Cdc48. Diese Interaktion erfolgt an der N-Domäne, so dass Ufd3 und Otu1 gleichzeitig an Cdc48 binden können. Sowohl Ufd3 als auch Otu1 interagieren mit dem Cdc48-Substrat Spt23 p90 in einer Ufd1-abhängigen Weise, und die Überexpression von Otu1 führt zu einer Stabilisierung von Spt23 p90. Dies ist nicht der Fall für Ufd3, aber es scheint, dass Ufd3 für den stabilisierenden Effekt von Otu1 erforderlich ist (Abbildung 15D).

Andererseits konnte kein stimulierender Effekt von Ufd3 auf die *in vitro*-Aktivität von Otu1 beobachtet werden. Hinzu kommt, dass  $\Delta otu1$ -Mutanten keine ausgeprägte Ubiquitindefizienz aufweisen (nicht gezeigt). Mögliche Erklärungen hierfür sind, dass noch ein zweites, mit Otu1 redundantes Deubiquitinierungsenzym existiert, oder dass nicht alle Ufd3-Substrate auch von Otu1 deubiquitiniert werden müssen und die Konkurrenz von Ufd2 zur Verhinderung des Abbaus bestimmter Substrate ausreicht. Für die erstere Variante spricht, dass die Überexpression einer katalytisch inaktiven Mutante von Otu1 (*otu1* C120S) eine destabilisierende (also dominant-negative) Wirkung auf Spt23 p90 hat (Abbildung 15C).



**Abbildung 18: Modell für die verschiedenen Modi von Cdc48 im Ubiquitinsystem.** Cdc48 ist beige, die Cryo-EM-Struktur ist die des Säugetierhomologen-p97 (Zhang *et al.*, 2000). Gezeigt sind die verschiedenen Modi für Abbau (A) und Ufd3- oder Otu1-abhängige Substratstabilisierung (B-D).

### 3.4 Die Stabilität von Spt23 ist modulierbar

Der Transkriptionsfaktor Spt23 p90 ist ein kurzlebiges Protein und ein Substrat des Cdc48- und Ufd2-abhängigen Abbauweges. Interessanterweise kann Spt23 p90 mit den negativen Abbau-Regulatoren Ufd3 und Otu1 interagieren. Ausserdem kann die Ölsäuresensitivität der  $\Delta ufd2$ -Mutante, die auf Hyperaktivität von Spt23 p90 beruht, durch die zusätzliche Deletion von *UFD3* oder *OTU1* partiell behoben werden. Diese Ergebnisse suggerieren, dass Spt23 p90 kein konstitutives Abbausubstrat ist. Vielmehr wird die p90-Stabilität durch ein Gleichgewicht zwischen Ubiquitinierung (Ufd2) und Stabilisierung/Deubiquitinierung (Ufd3/Otu1) reguliert. Unter normalen Laborbedingungen scheint dieses Gleichgewicht auf der Seite von Ufd2 zu liegen. Man kann aber spekulieren, dass es unter gewissen metabolischen Bedingungen für Zellen von Vorteil sein könnte, Spt23 p90 mittels Ufd3 und Otu1 zu stabilisieren und dadurch seine Aktivität zu erhöhen.

### 3.5 Es gibt verschiedene Typen von Cdc48-Interaktoren

Ein Charakteristikum von Cdc48 ist seine große Zahl von Interaktionspartnern. Dabei scheinen der Ufd1/Npl4-Komplex und Shp1 als Substratadaptoren zu wirken (Kondo *et al.*, 1997, Rape *et al.*, 2001, Meyer *et al.*, 2002). Wegen dieser essentiellen Rolle im Mechanismus von Cdc48 sind die Wachstumsphänotypen von  $\Delta shp1$ - und konditionalen *ufd1*- oder *npl4*-Mutanten schwer. Die anderen Cdc48-Interaktoren Ufd2, Ufd3, Otu1 und die UBX-Domänenproteine Ubx2-Ubx7 scheinen aber für die Substratbindung von Cdc48 nicht benötigt zu sein, die entsprechenden Wachstumsphänotypen sind deutlich schwächer. Während Ufd2, Ufd3 und Otu1 wahrscheinlich ihre Substrate von Cdc48 empfangen und somit als „substratprozessierende“ Faktoren wirken, scheint Ubx2 die Lokalisierung von Cdc48 am Endoplasmatischen Retikulum zu beeinflussen (Schuberth und Buchberger, 2005). Interessanterweise interagieren diese Faktoren je nach Funktion unterschiedlich mit Cdc48 (Abbildung 18):

- die Substratadaptoren Ufd1/Npl4 und Shp1 besitzen jeweils eine UBX- oder UBX-ähnliche *Ubiquitin-Fold*-Domäne sowie eine weitere Cdc48-Interaktionsstelle, die beide mit der N-Domäne von Cdc48 interagieren (Uchiyama *et al.*, 2002, Bruderer *et al.*, 2004, Schuberth *et al.*, 2004),

- die substratprozessierenden Faktoren Ufd2 und Ufd3 interagieren mit der D2-Region von Cdc48,
- Otu1 und Ubx2-Ubx7 interagieren zwar mit der N-Domäne, benutzen dafür aber nur eine UBX-Domäne und haben im Gegensatz zu den Substratadaptoren Ufd1/Npl4 und Shp1 wahrscheinlich keine weitere Cdc48-Bindestelle.

Faktoren unterschiedlichen Typs können auch gleichzeitig an Cdc48 binden und überbrückte Komplexe bilden. Faktoren gleichen Typs wie die Adaptoren Shp1 und der Ufd1/Npl4-Komplex (Meyer *et al.*, 2000) oder die „substratprozessierenden“ Faktoren Ufd2 und Ufd3 können nicht gleichzeitig binden. Otu1 und Ubx2 (Schuberth und Buchberger, 2005) können an Cdc48-Adaptorkomplexe binden, ob aber gleichzeitig mehrere UBX-Proteine dieses („Nur-UBX“-) Typs an Cdc48 binden können, ist noch nicht untersucht worden.

Da offensichtlich mindestens ein weiteres UBX- bzw. *Ubiquitin Fold*-Domänenprotein zusätzlich zu den Adaptoren (entweder Ufd1/Npl4 oder Shp1) an Cdc48 binden kann, kann die UBX-Domäne nicht die Exklusivität der Bindung vermitteln. Prinzipiell sollte es auf dem Cdc48-Hexamer auch drei bis sechs UBX-Bindestellen geben (Dreveny *et al.*, 2004). Da aber die beiden Adaptoren nicht gleichzeitig binden können, kann man spekulieren, dass die zweite Bindestelle der Adaptoren eine „Exklusivitätsdeterminante“ ist, d. h., wenn diese zweite Bindestelle auf Cdc48 besetzt ist, werden weitere Faktoren mit derselben Bindestelle sterisch ausgeschlossen. Welche Eigenschaften von Ufd2 und Ufd3 die jeweils exklusive Bindung bedingen, ist unklar, da auch hier theoretisch mehrere Bindestellen pro Cdc48-Hexamer zur Verfügung stehen könnten. Da Ufd2 und Ufd3 spezifische Cdc48-Substrate prozessieren, könnte hierbei auch ein an Cdc48 gebundenes Substrat eine Rolle spielen.

Insgesamt ist also Cdc48 über ein Netz von Protein-Protein-Interaktionen in das Ubiquitin-Proteasom-System eingebettet, und das „Schicksal“ seiner Substrate wird von eben diesen Interaktionspartnern bestimmt.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Materialien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagentien der Firmen Aldrich, Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Difco, Fluka, Invitrogen, Kodak, Merck, Roth, Riedel de Haen, Serva oder Sigma verwendet. Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsenzyme und die meisten anderen Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Roche, MBI, Pharmacia und Promega bezogen. Es wurde ausschließlich deionisiertes Wasser verwendet.

### Computeranalysen

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und -vergleiche) sowie Literaturrecherchen wurden meistens beim *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) durchgeführt. Peptidmassen aus massen-spektrometrischen Analysen wurden auf der Internetseite <http://www.expasy.org> mit dem Programm Peptident identifiziert. Als Informationsdatenbanken für Hefegene wurden sowohl die *Saccharomyces Genome Database* (SGD, <http://www.yeastgenome.org>) als auch YPD (<http://www.proteome.com>) benutzt. Für DNA-Sequenzanalysen (Restriktionskarten, DNA-Sequenzierung, Primerdesign) wurden die Programme *Lasergene* oder *DNASar* (DNA Star Inc.) verwendet.

### Kommerziell erhältliche Antikörper

Polyclonale anti-myc-Antikörper (sc789), monoklonale HA-Antikörper (12CA5 oder F7), monoklonale myc-Antikörper (9E10) und monoklonale Ubiquitin-Antikörper (P4D1) waren von Santa CruzBiochemicals. Monoklonale Pgl1- und GST-Antikörper waren von Molecular Probes, monoklonale  $\beta$ -Galaktosidase-Antikörper (Z378A) von Molecular Probes. Sekundäre anti-Kaninchen- und anti-Maus-Antikörper waren von Dianova.

### Standardpuffer

PBS (Phosphate buffered Saline), TE (Tris-EDTA) und TBE (Tris-Borat-EDTA) wurden nach Standardrezepten gemischt (Ausubel, 2001).

### *E. coli*-Stämme

XL1-Blue: *supE44, hsd R17, rec A1, gyr A46, thi, rel A1, lac-, F' [proAB +, lac Iq, LacZ M15, Tn10(tet r)]*

BL21-Codon Plus (DE3)-RIL *E. coli B F- ompT hsdS(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) dcm+Tet<sup>r</sup> gal I (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]*

TG1: *D(lac, pro), supE, thi, hsd D5, F'[Tra D36pro+, lac Iq, lacZ DM15]*

### *E. coli*-Expressionsvektoren

*pET21d* (Novagen)

*pSEB21d* modifizierter *pET21d* für C-terminale GST-Fusionen

*pGEX-4T* Serie (Pharmacia)

### *E. coli*-Medium

Luria-Bertani-Medium (LB): 1% Trypton (Difco), 0,5% Hefeextrakt (Difco), 1% NaCl

Steril autoklavieren. Für Agarplatten wurde 1,5% Agar zugegeben.

### Hefevektoren

*p424GAL1* (Mumberg et al., 1994)

*p424ADH*

*p415GPD* beide (Mumberg et al., 1995)

*YEplac181*

*YEplac195*

*Yiplac128* alle (Gietz und Sugino, 1988)

### Hefemedien

YPD: 1% Bacto Yeast Extract (Difco), 2% Bacto-Pepton (Difco), 2% Glukose

YPGal wie YPD, 2% Galaktose statt Glukose

SC-Medium: 2% Kohlenstoffquelle (Glukose, Raffinose, Galaktose), 0,67% Yeast Nitrogen Base (Difco), 0,2% *drop out* Aminosäure-Mix (Burke, 2000).

Für Agarplatten wurde jeweils 2% Agar zugegeben.

YPD G418 zur Selektion auf Kanamycin-resistente Zellen – YPD nach Autoklavieren auf 50°C abkühlen lassen, Zugabe von 200 mg/l G418 Pulver (Sigma)

Ölsäure-Platten – nach Abkühlen auf 50°C wurden 4 ml einer 1:1-Mischung von Ölsäure (Sigma) und NP40 (Fluka) pro Liter Medium zugegeben. Generell wurden publizierte Protokolle verwendet (Guthrie, 1991, Burke, 2000).

### Hefestämme

Wenn nicht anders angegeben, sind alle Stämme isogen zu DF5 (Finley *et al.*, 1987).

<u>Name</u>	<u>Genotyp</u>
YWO1	DF5 $\alpha$ : <i>MAT</i> $\alpha$ , <i>his3-<math>\Delta</math>200</i> , <i>leu2-3,2-112</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-1 (am)</i> , <i>ura3-52</i>
YWO2	DF5a: <i>MATa</i>
SCY43	<i><math>\Delta</math>ufd3::HIS3</i> <i>MAT</i> $\alpha$
SCY44	<i><math>\Delta</math>ufd3::HIS3</i> <i>MATa</i>
EJY134	<i><math>\Delta</math>ufd2::LEU2</i> <i>MATa</i>
EJY135	<i><math>\Delta</math>ufd2::LEU2</i> <i>MAT</i> $\alpha$ <i><math>\Delta</math>ufd2::LEU2</i> , <i><math>\Delta</math>ufd3::HIS3</i>
SCY35	<i>ufd1-2</i> <i>MATa</i>
SCY36	<i>ufd1-2</i> <i>MAT</i> $\alpha$ <i>cdc48-1</i> <i>cdc48-6</i> <i>MATa</i> <i>cdc48-6</i> <i>MAT</i> $\alpha$
YWO74	<i><math>\Delta</math>pre1::TRP1</i> , pSE362 <i>pre1-1</i> <i><math>\Delta</math>ubp6::kanMX4</i> , <i>MATa</i> <i><math>\Delta</math>ubp6::kanMX4</i> , <i>MAT</i> $\alpha$
M35	<i><math>\Delta</math>shp1::kanMX4</i> , <i>MATa</i>
SCY47	<i><math>\Delta</math>rpm10::HIS3</i> , <i>MATa</i> <i>npl4-1</i> <i>MATa</i>
SCY54	<i><math>\Delta</math>ufd2::LEU2</i> <i><math>\Delta</math>rpm10::HIS3</i>
YMR31	<i>NPL4-3myc::kanMX4</i>

YMR32	<i>ufd1-2 NPL4-3myc::kanMX4</i>
YMR68	<i>NPL4-3HA::kanMX4</i>
YMR71	<i>Δufd2::LEU2 NPL4-3HA::kanMX4</i>
SRY1	<i>Δufd3::HIS3 NPL4-3HA::kanMX4</i>
SRY2	<i>Δotu1::kanMX4 MATa</i>
SRY3	<i>Δotu1::kanMX4 Δufd2::LEU2</i>
SRY4	<i>OTU1-3myc::kanMX4</i>
SRY5	<i>Δdsk2::kanMX4</i>
SRY6	<i>Δrad23::kanMX4 Δdsk2::kanMX4</i>
SRY7	<i>Δrad23::kanMX4 Δdsk2::kanMX4 Δufd2::LEU2</i>
SRY8	<i>Δrad23::kanMX4 Δdsk2::kanMX4 Δrpn10::HIS3</i>
SRY9	<i>Δrad23::kanMX4 Δrpn10::HIS3</i>
SRY10	<i>Δpre1::TRP1, pSE362pre1-1 Δufd3::HIS3</i>
YCH029	<i>Δdsk2::kanMX4 Δufd2::LEU2</i>
YCH132	<i>Δrad23::kanMX4 Δufd2::LEU2</i>
RH448	<i>leu2 his4 lys2 ura3 bar1 MATa</i> (Testerstamm, nicht isogen zu DF5)
RC757	<i>his6 met1 sst2-1 cyh2 can1MATα</i> (Testerstamm)

## Verwendete Plasmide

Soweit nicht anders angegeben, in dieser Arbeit hergestellt.

<u>Name</u>	<u>Verwendungszweck</u>
<i>pSEB21d UFD3</i>	Rekombinantes C-terminal GST-markiertes Ufd3
<i>pSEB21d UFD3 1-288</i>	GST-markiertes Ufd3-Fragment
<i>pSEB21d UFD3 1-426</i>	GST-markiertes Ufd3-Fragment
<i>pSEB21d UFD3 1-494</i>	GST-markiertes Ufd3-Fragment
<i>pSEB21d UFD3 288-715</i>	GST-markiertes Ufd3-Fragment
<i>pSEB21d UFD3 360-715</i>	GST-markiertes Ufd3-Fragment
<i>pSEB21d UFD3 426-715</i>	GST-markiertes Ufd3-Fragment
<i>pET21d UFD3</i>	Rekombinantes C-terminal his-markiertes Ufd3

<i>pGEX4-T1 CDC48</i>	Rekombinantes GST-markiertes Cdc48
<i>pGEX4-T1 CDC48 N</i>	GST-markiertes Cdc48-Fragment
<i>pGEX4-T1 CDC48 D1D2</i>	GST-markiertes Cdc48-Fragment
<i>pQE30 CDC48 ND1</i>	His <sub>6</sub> -markiertes Cdc48-Fragment
<i>pGEX4-T1 SHP1</i>	GST-markiertes Shp1
<i>pGEX4-T1 OTU1</i>	GST-markiertes Otu1
<i>pGEX4-T1 OTU1 C120S</i>	GST-markierte Otu1-Mutante
<i>pGEX4-T1 OTU1 ΔUBD</i>	GST-markiertes Otu1-Fragment
<i>pGEX4-T1 OTU1 UBD</i>	GST-markiertes Otu1-Fragment
<i>p424GAL1 FLAG-UFD3</i>	Induzierbare Ufd3-Expression in Hefe
<i>p424GAL1 FLAG-UFD3 1-426</i>	Induzierbare Ufd3-Fragment-Expression in Hefe
<i>p424GAL1 FLAG-UFD3 1-494</i>	Induzierbare Ufd3-Fragment-Expression in Hefe
<i>p424GAL1 FLAG-UFD3 360-715</i>	Induzierbare Ufd3-Fragment-Expression in Hefe
<i>p424GAL1 FLAG-UFD3 426-715</i>	Induzierbare Ufd3-Fragment-Expression in Hefe
<i>p424ADH FLAG-UFD3</i>	Konstitutive Überexpression von Ufd3
<i>p424ADH UBP6</i>	Konstitutive Überexpression von Ubp6
<i>p424ADH OTU1</i>	Konstitutive Überexpression von Otu1
<i>p424ADH otu1 C120S</i>	Konstitutive Überexpression von otu1 C120S
<i>p424ADH otu1 ΔUBD</i>	Konstitutive Überexpression von otu1 ΔUBD
<i>P415GPD OTU1</i>	Konstitutive Überexpression von Otu1
<i>p424ADH OTU2</i>	Konstitutive Überexpression von Otu2
<i>YEp112 DOA4</i>	Konstitutive Überexpression von Doa4, (S. Schlenker)
<i>Ylplac128 UBI4</i>	Integratives UBI4-Plasmid
<i>YEp181 mycUFD3</i>	Konstitutive Überexpression von Ufd3, (T. Hoppe)
<i>YEp195 mycUFD3</i>	Konstitutive Überexpression von Ufd3, (T. Hoppe)

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

Generell richteten sich die Methoden nach publizierten Protokollen (Ausubel, 2001, Sambrook, 2001).

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

Plasmide wurden im kleinen Maßstab mit Minipreps aus *E. coli* gewonnen. Dazu wurden Miniprep-Kits der Firmen Qiagen (Miniprep Kit) oder Macherey-Nagel (Nucleospin Plasmid Quick Pure) nach den Anweisungen der Hersteller benutzt.

### Restriktionsverdau

Puffer- und Verdaubedingungen richteten sich nach den Anweisungen der Enzym-Hersteller.

### Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Für analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-1,2%ige Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. Zur Färbung der DNA-Fragmente wurde den Gelen 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 0,25% OrangeG, 15% Ficoll (Typ 400, Pharmacia) in Wasser) und bei 50-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Moleküle wurden auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und ihre Größe wurde mit Hilfe eines Größenmarkers (1kb DNA-Ladder, Invitrogen) bestimmt.

Zu isolierende DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (324 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers eluiert.

### Ligation

Insert und Vektor wurden in einem Verhältnis von 3:1 bis 5:1 eingesetzt und entweder 1-2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C mit T4 DNA Ligase nach den Angaben des Herstellers (NEB) ligiert.

## Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem 377-Sequencer der Firma ABI in der Arbeitsgruppe oder durch Firmen durchgeführt.

## Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Punktmutagenese

Für Plasmid-PCR wurde Pfu Turbo Polymerase (Stratagene) verwendet, bei langen Primern (ab ca. 45 Basen) wurde auch Taq Polymerase zugesetzt. Das Reaktionsprofil wurde jeweils dem Primerschmelzpunkt und der Länge des erwarteten PCR-Produktes angepasst. Für die Amplifizierung von *Knockout*- oder *in vivo*-Markierungs-Kassetten zur homologen Rekombination (Knop *et al.*, 1999) wurde eine Mischung aus Taq und Vent-Polymerase im Verhältnis 4:1 verwendet, sowie ein besonderes Programm:

- 94°C 4min
- 10 Zyklen (94°C 1 min – 45°C 50 s – 68°C 1 min 40 s)
- 20 Zyklen (94°C 1 min – 53°C 50 s – 68°C 1 min 40 s Extension 20 s/  
Zyklus)
- 4°C

Die korrekte Insertion von *Knockout*-Kassetten wurde ebenfalls durch PCR überprüft, dabei wurde 0,1 µg genomische DNA als Template sowie Taq Polymerase verwendet.

Um Punktmutationen in Gene einzuführen, wurde das Quikchange Kit der Firma Stratagene nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

## 4.3 Mikrobiologische Methoden

Wenn nicht anders beschrieben, wurden publizierte Protokolle verwendet (Ausubel, 2001, Sambrook, 2001).

### Kompetente *E. coli*-Zellen

Chemisch-kompetente Zellen

Eine stationäre Kultur des gewünschten Stammes wurde 1:100 in 300 ml vorgewärmtes LB-Medium inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3

herangezogen. Die Kultur wurde dann 10 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml kaltem 0,1 M  $MgCl_2$  gewaschen, in 80 ml kaltem 0,1 M  $CaCl_2$  resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen wieder abzentrifugiert, in 0,1 M  $CaCl_2$ / 15% Glycerin resuspendiert, aliquotiert und in Flüssigstickstoff eingefroren.

### Elektrokompetente Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 3 ml einer stationären Kultur des gewünschten Stammes beimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,7 herangezogen. Die Kulturen wurden dann für eine Stunde auf Eis inkubiert, abzentrifugiert, in 500 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und wiederum für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert, in 250 ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann in 10 ml 10% Glycerin gewaschen, in 1,5 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert, aliquotiert und in Flüssigstickstoff eingefroren.

### **Transformation von Bakterienzellen**

Die kompetenten Zellen wurden kurz vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Bei chemisch-kompetenten Zellen wurden 1  $\mu$ l Plasmid oder 5-10  $\mu$ l Ligationsansatz mit 50  $\mu$ l kompetenten Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann folgte ein Hitzeschock (42°C, 1 min), die Zellen wurden in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen, für 30-60 min bei 37°C geschüttelt und auf selektiven Platten ausgestrichen.

Zur Elektroporation wurden 40-50  $\mu$ l kompetente Zellen mit 1-2  $\mu$ l mikrodialysiertem Ligationsansatz gemischt, in eine Elektroporationsküvette (0,1 cm Dicke, Biorad) pipettiert und durch einen Puls von 1,8 kV und 25  $\mu$ F bei 200  $\Omega$  Widerstand elektroporiert. Dann wurden die Zellen in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen, für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt und auf selektiven Platten ausplattiert.

### **Isolierung von genomischer DNA oder Plasmiden aus Hefen**

Dazu wurden 2-5 ml einer stationären Hefekultur abzentrifugiert, mit 1 ml Wasser gewaschen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Zellpellet wurde dann in Aufschlusspuffer aufgenommen (10 mM Tris/HCl pH8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% Triton X100, 1% SDS), dann wurden ca. 400 µl Glasperlen und 400 µl Phenol/Chloroform zugegeben und die Suspension für 5 min gevortext. Es wurden weitere 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH7,5, 1mM EDTA) zugegeben, nochmals kurz gevortext, und dann 6 min bei mindestens 10000g und Raumtemperatur abzentrifugiert. 500 µl des wässrigen Überstandes wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde 10 min bei mindestens 10000g abzentrifugiert und mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Dann wurde das Pellet bei 37°C getrocknet, in 50 µl TE-Puffer mit 100 µg/ml RNase (Miniprep-Puffer 1 in den meisten kommerziell erhältlichen Kits) aufgenommen und bis zur vollständigen Auflösung des Pellets bei 50°C geschüttelt. Die so erhaltene DNA konnte als PCR-Template zum Klonieren oder zur Überprüfung der korrekten genomischen Integration verwendet werden. Zur schnellen Isolation von Plasmiden aus Hefen wurde auch ein anderes Protokoll verwendet (Robzyk und Kassir, 1992).

### **Kompetente Hefezellen, Hefe-Transformation**

Die Herstellung kompetenter Hefezellen und Hefetransformationen wurden nach einem publizierten Protokoll (Knop *et al.*, 1999) durchgeführt.

### **Bestimmung des *Mating Type* von Hefestämmen**

Bäckerhefen besitzen zwei verschiedene *Mating Types* (Paarungstyp, „Geschlecht“), die  $\alpha$  und **a** genannt werden, und können sich geschlechtlich fortpflanzen. Dies ermöglicht die Kreuzung verschiedener Hefestämme und die genetische Analyse. Der *Mating Type* eines Hefestammes wird durch einen Halo-Assay bestimmt. Dazu werden zwei Testerstämme (Mutanten jeweils eines *Mating Type*, die gegen das *Mating*-Pheromon des jeweils anderen hypersensitiv sind) in einer dünnen Top-Agarschicht auf je eine YPD-Platte aufgetragen und die zu testende Kolonie wird jeweils auf diese Platten

überstempelt. Die Testerstämme im Agar bilden normal einen Rasen, aber falls die überstempelte Kolonie auf dem Agar vom anderen *Mating Type* ist, werden die Testerzellen vom *Mating*-Pheromon im Wachstum arretiert, und es bildet sich ein Halo um die Kolonie. Diploide Zellen sezernieren keine *Mating*-Pheromone und erzeugen deshalb weder auf  $\alpha$ - noch auf **a**-Testerplatten einen Halo.

### Kreuzung von Hefen

Zur Herstellung von Doppelmutanten können Hefen gekreuzt werden, dazu paart man zwei Hefestämme mit unterschiedlichen *Mating Type*, so dass ein (wenn man Mutanten kreuzt, heterozygoter) diploider Stamm entsteht. Dieser wird wieder sporuliert (d. h. man lässt ihn eine Meiose durchlaufen), und nach Tetraden-dissektion kann man einzelne Sporen mit den gewünschten beiden Mutationen isolieren.

Zur Kreuzung wurden die beiden Ausgangsstämme bis zur logarrithmischen Wachstumsphase angezogen. Dann wurden je etwa 10  $\mu$ l der beiden Kulturen übereinander auf eine warme YPD-Platte getropft und für ca. 3-5 Stunden bei 30°C inkubiert. Dann wurde der eingetrocknete Tropfen mit einem Zahnstocher auf der Platte verteilt, so dass die Hefezellen vereinzelt wurden. Die Platte wurde für 24 Stunden bei 30°C inkubiert, dann wurden die größten Kolonien gepickt (die meistens robustere diploide mit Wildtyp-Phänotyp waren) und auf die Mutationsmarker oder den *Mating Type* untersucht. Diploide Zellen wurden dann wiederum bis zur stationären Phase angezogen. 0,5-1 ml der Kultur wurde dann in Sporulationsmedium (2% Kaliumazetat) gewaschen, in 5 ml Sporulationsmedium überführt und für 2-4 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurden die Tetraden (sporulierte Zellen) mit Zymolyase verdaut. Dazu wurden 40  $\mu$ l Zellen mit 40  $\mu$ l Zymolyasepuffer (1 M Sorbitol, 25 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8), 2  $\mu$ l 1 M DTT und 1  $\mu$ l 10 mg/ml Zymolyase 100T (Seikagaku Corporation, Japan) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 10  $\mu$ l verdaute Zellen wurden dann auf eine YPD-Platte getropft, und die Tetraden wurden mit einem Mikromanipulator (Singer MSM Systems) gepickt und dissektiert.

### **Gendeletion über homologe Rekombination und Epitop-Markierung von Hefegenen am endogenen Lokus**

Die Deletion nichtessentieller Gene und die Epitopmarkierung von Proteinen *in vivo* wurde ausschließlich nach veröffentlichten Protokollen durchgeführt (Knop *et al.*, 1999).

### **Serielle Verdünnungsreihen von Hefezellen**

Für Wachstumsanalysen von Hefestämmen wurden serielle Verdünnungsreihen von Hefekulturen auf Testmedien getüpfelt. Dazu wurden logarithmisch wachsende Hefekulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 oder 0,2 in sterilem Wasser verdünnt. Von dieser Ausgangssuspension wurden drei weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:5 oder 1:7 hergestellt. 2-5 µl dieser Verdünnungen wurden dann jeweils in Reihen auf Testplatten pipettiert und für 2-4 Tage unter den jeweils angegebenen Bedingungen inkubiert.

## **4.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **SDS-Gelelektrophorese**

Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Meistens wurden 8%-Gele verwendet, für die Analyse des Ubiquitinkonjugatmusters von Zellen kamen auch 6-20%- oder 8-20%-Gradientengele zur Verwendung. Für die Analyse des Spt23-Abbaus wurden 4-12% Bis/Tris-Gele (z. B. Invitrogen) verwendet. Als Probenpuffer wurde entweder „Lämmli“-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% β-Mercaptoethanol, 0,1% Bromphenolblau) oder HU-Puffer (8 M Harnstoff, 5% SDS, 0,2 M Tris/HCl pH 6,8, 1 mM EDTA, 5% β-Mercapto-ethanol, 0,1% Bromphenolblau) verwendet.

### **Expression von rekombinanten GST- oder his<sub>6</sub>-getaggtten Proteinen in *E. coli* und native Affinitätsreinigung**

Generell wurden nur his<sub>6</sub>- oder GST-markierte rekombinante Proteine verwendet, um die Aufreinigung einfach zu halten. 1-2 l LB-Medium mit den

erforderlichen Antibiotika wurde 1:100 aus einer stationären Kultur von BL21 DE3 RIL-Zellen mit dem entsprechenden Expressionsplasmid beimpft. Die Zellen wurden bei 37°C bis zur logarithmischen Phase angezogen, dann wurden sie auf Raumtemperatur gestellt und mit 0,1-1 mM IPTG induziert. Nach 3-5 Stunden (in Ausnahmen auch nach ÜN-Expression) wurden die Zellen geerntet und zweimal in kaltem Wasser gewaschen.

Bei GST-Fusionsproteinen wurde das Zellpellet nun in kaltem 10-20 ml PBS, 5% Glycerin, 1 mM PMSF, 1× complete<sup>®</sup> Proteaseinhibitor mix resuspendiert, und die Zellen wurden durch drei Passagen durch eine French Press aufgeschlossen. Aus einer 20%-Stammlösung wurde Triton X100 bis zu einer Konzentration von 0,3% zugegeben, und Zelltrümmer und unlösliches Material wurden 30 min bei 4°C und mindestens 30000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 3-5 ml im gleichen Puffer voräquilibrierten Glutathion-Sepharose-*Beads* (Pharmacia) versetzt und für 1-2 Stunden auf einem Roller inkubiert. Dann wurde die Suspension in eine 5 ml-PIERCE-Säule überführt, sodass die Lösung durchlief. Die so entstandene Säule wurde mit je 20 ml Waschpuffer I (0,5 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 5% Glycerin und Proteaseinhibitoren), Waschpuffer II ( PBS, 5% Glycerin, 1% Triton X100, Protease-inhibitoren) und PBS mit 5% Glycerin gewaschen. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur mit 5 x 2 ml 100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH8, 10 mM Glutathion (bei manchen schwer zu eluierenden Proteinen auch 30 mM Glutathion). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gegen PBS, 5% Glycerin dialysiert und bei -80°C eingefroren.

Für his<sub>6</sub>-markierte Proteine wurde das Zellpellet in Lysepuffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH8, 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 5% Glycerin, 10 mM Imidazol, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und ebenfalls mit einer French Press aufgeschlossen. Triton X100 wurde bis zu einer Konzentration von 0,3% zugegeben, und das Lysat durch Zentrifugation wie oben geklärt. Dann wurden 3 ml in Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-*Beads* (Qiagen) zugegeben und die Suspension für 1-2 Stunden bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Die Suspension wurde in eine 5 ml-PIERCE-Säule geschüttet, sodass das Lysat durchlaufen konnte. Die Säule wurde sodann mit je 20 ml Lysepuffer mit Triton und Lysepuffer mit Triton und 20 mM Imidazol gewaschen. Die Säule wurde dann mit Lysepuffer mit 250 mM Imidazol

eluiert, proteinhaltige Fraktionen wurden zusammengeführt, gegen PBS, 5% Glycerin dialysiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **GST-Affinitätsaufreinigung von Interaktoren aus Hefelysat**

Um potentielle Interaktionspartner für Ufd2, Ufd3 und Otu1 zu identifizieren, wurden die GST-markierten Proteine als Matrix für Affinitätschromatographie benutzt. Zunächst wurden 2 l Hefekultur ( $\text{OD}_{600} \sim 3$ ) geerntet, mit kaltem Wasser gewaschen, in 20-30 ml Lysepuffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 1 mM EDTA, 5% Glycerin, Proteaseinhibitoren) aufgenommen und durch drei Passagen durch eine French Press aufgeschlossen. Das Zellysate wurde mit Triton X100 bis zu einer Konzentration von 0,3% versetzt, und unlösliches Material wurde durch Zentrifugation entfernt (zweimal 30 min, mindestens 30000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Die rekombinanten GST-markierten Fusionsproteine (3-5 mg) sowie GST als Negativkontrolle (1 mg) wurden für eine Stunde mit 400  $\mu\text{l}$  Glutathion-Sepharose (äquilibriert in Lysepuffer) inkubiert. Diese wurde dann als Affinitätsmatrix für 3 Stunden mit etwa 15 ml Lysat inkubiert. Dann wurde die Suspension vorsichtig in eine 5 ml-PIERCE-Säule geschüttet, und die Beads wurden mit 15 ml Lysepuffer mit Triton gewaschen. Die Elution erfolgte mit dreimal 500  $\mu\text{l}$  1 M NaCl in Lysepuffer. Das Eluat wurde dann mit Trichloressigsäure (ad 10%) gefällt und das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### **Direkte Interaktionstests mittels GST-Pulldown**

Um Protein-Proteininteraktionen mit rekombinanten Proteinen nachzuweisen, wurden GST-markierte Proteine (30-50  $\mu\text{g}$ ) für eine Stunde bei  $4^{\circ}\text{C}$  in PBS, 0,3% Triton X100 an Glutathion-Beads (10  $\mu\text{l}$ ) gebunden. Dann wurden unmarkierte (wie Lysin63-vernetzte Polyubiquitinketten, Affiniti) oder his<sub>6</sub>-markierte potentielle Interaktionspartner (10-20  $\mu\text{g}$ ) zugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Die Beads wurden drei- bis viermal mit PBS/Triton gewaschen und dann mit SDS-Probenpuffer eluiert. Alternativ konnten die GST-markierten Proteine zuerst für eine Stunde mit den potentiellen Interaktionspartnern inkubiert werden und dann mit äquilibrierten

Glutathion-*Beads* präzipitiert werden. Dieses Protokoll konnte auch abgewandelt werden, um die Konkurrenz zwischen zwei Proteinen für eine Bindestelle auf einem dritten Protein zu untersuchen. In diesem Fall wurde das Protein mit der untersuchten Bindestelle als GST-Fusion angeboten, und in mehreren Ansätzen wurde die Menge des einen Bindepartners konstant gehalten, während die des anderen variiert wurde. Dabei musste das GST-Fusionsprotein in limitierenden Mengen zugegeben werden, um eine Konkurrenz zwischen seinen zwei Bindepartnern zu ermöglichen. Anschließend konnte im Western Blot oder durch Coomassie-Färbung gezeigt werden, ob hohe Mengen des einen Partners die Bindung des anderen verringerten.

### **Herstellung von spezifischen Antiseren in Kaninchen**

Um spezifische Antikörper gegen Zielproteine herzustellen, wurden jeweils 1 ml Proteinlösung (0,2-0,5 mg/ml in PBS) hitzedenaturiert (10 min 99°C) und mit einem ml Freud's Adjuvans (complete, Sigma Aldrich) zu einer homogenen Suspension vermischt. Diese Suspension wurde dann je einem Kaninchen an etwa zehn verschiedenen Stellen subkutan zur Immunisierung gespritzt. Nach 4-6 Wochen wurde dem Kaninchen dann zur Auffrischung 0,1-0,2 mg Protein in 1 ml Suspension mit inkompletten Freud's Adjuvans gespritzt. Diese Auffrischung wurde in vierwöchigen Abständen zwei bis drei Mal wiederholt. Jeweils ca. 10 Tage nach den Auffrischungen wurde dem Kaninchen Testblut abgenommen. Dieses wurde eine Stunde bei 37°C und dann über Nacht im Kühlschrank gelagert und dann bei 20000g abzentrifugiert. Der Überstand konnte als Serum im Western Blot getestet werden. Bei ausreichender Empfindlichkeit wurde das Kaninchen ausgeblutet und das Serum wie für das Testblut beschrieben gewonnen.

### **Affinitätsaufreinigung von Antikörpern aus Serum**

Um die spezifische Aktivität von Antiseren noch zu erhöhen, konnten Antikörper über eine Antigensäule affinitätsgereinigt werden. Das Zielprotein wurde zunächst rekombinant hergestellt (ca. 10 mg, vorzugsweise mit einem anderen „Tag“ als bei der Immunisierung verwendet) und gegen Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,3 mit HCl) dialysiert.

Das Säulenmaterial (CNBr-Sepharose von Pharmacia, ca. 0,6 g) wurde mehrmals in je 200 ml 1 mM HCl vorgequollen, abgenutscht und mit Kopplungspuffer gewaschen. Dann wurde die Proteinlösung zugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Kopplung wurde das Säulenmaterial abzentrifugiert und mit 0,2 M Glycin pH 8 für weitere 2 Stunden geblockt. Nun wurde das Säulenmaterial in eine PIERCE-Säule überführt und mit ca. 8 ml 0,1 M Na-Azetat, 0,5 M NaCl pH 4 gewaschen. Vor der Reinigung wurde noch mehrere Waschschriffe durchgeführt, mit denen die Säule nach der Reinigung auch regeneriert werden konnte: 4 ml PBS, 4 ml PBS, 1% SDS, 1 Stunde Inkubation bei 65°C, 2 ml PBS 1% SDS, 4 ml PBS, 1% Triton X100, 4 ml PBS, 1% Triton X100, 1% BSA, 8 ml PBS 1% Triton X100.

Falls erforderlich, konnte auch noch eine unspezifische Vorsäule benutzt werden, an die statt des Antigens *E. coli*-Lysat oder verschiedene nicht verwandte ander rekombinante Proteine gekoppelt waren.

Vor der Reinigung wurde ca. 5 ml Antiserum bei 20.000g abzentrifugiert. Dann wurde es bei Raumtemperatur mehrmals (zwei- bis fünfmal) über die Säule gegeben. Dann wurde die Säule mit 6 ml PBS, 1% Triton X100 und dann mit 8 ml PBS gewaschen. Die Elution wurde bei 4°C durchgeführt. Dabei wurde die Säule acht mal mit 1ml Glycin-Puffer (0,2 M Glycin, 1 mM EGTA, pH 2,5) eluiert, die Fraktionen wurden in Eppendorfgefäßen mit je 0,3 ml 1 M Tris pH 8 aufgefangen. Dann wurde die Säule noch fünfmal mit je 1 ml 4 M Guanidinium-HCl, pH 7 eluiert. Die im Bradfordtest proteinhaltigen Fraktionen wurden zusammengeführt, mit BSA bis zu einer Konzentration von 0,2% versetzt und gegen PBS dialysiert.

### **Immunpräzipitation von Proteinen aus Hefelysaten**

Um Proteininteraktionen nachzuweisen, wurden Proteine aus Hefelysaten immunpräzipitiert. Dazu wurden 30-60 OD des gewünschten Hefestamms (logarithmische Wachstumsphase) bei ca. 700g abzentrifugiert und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden dann in 150 µl kaltem Lysepuffer (0,1 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 5% Glycerin, 1 mM PMSF, 1x complete<sup>®</sup> Protease-Inhibitoren (Roche)) aufgenommen, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und mit

kalten Glasperlen (Sigma Aldrich) bis zum Meniskus versetzt. Die Lyse erfolgte durch Vortexen (4 mal 40 s mit 40 s Intervallen auf Eis). Es wurden weitere 150  $\mu$ l kalter Lysepuffer mit 0,6% Triton X100 (doppelte Konzentration) zugegeben und gemischt, dann wurde die Suspension für 5 min bei ca. 800g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit weiteren 150  $\mu$ l kaltem Lysepuffer incl. 0,3% Triton X100 versetzt und für 3 Stunden mit Antikörper-beladenen Protein A- oder Protein G-Beads inkubiert (1 Stunde Vorinkubation der „Beads“ mit Antikörper). Danach wurden die „Beads“ bei 130g abzentrifugiert und 3 mal 5 min mit Lysepuffer incl. 0,3% Triton X100 gewaschen. Die Elution erfolgte durch Kochen in SDS-Probenpuffer.

### **Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Beads**

Falls die Antikörper bei einer Immunpräzipitation nicht mit von den Protein A-Beads eluiert werden sollten, konnten sie mit Dimethylpimelimidat an die Beads gekoppelt werden. Dies geschah nach einem publizierten Protokoll (Harlow, 1988).

### **Herstellung von denaturierenden Hefeextrakten**

Denaturierende Hefeextrakte für Western Blots wurden hergestellt wie beschrieben (Knop et al., 1999).

### **Untersuchung der Stabilität von Proteinen im *Promoter shutoff/Cycloheximide chase***

Die metabolische Stabilität von Testproteinen wurde mit „*Promoter shutoff*“-Experimenten untersucht. Dazu wurde das untersuchte Protein unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GAL1-10*-Promotors in Hefen exprimiert, indem die Hefen bis zur logarithmischen Phase in Galaktose-haltigem Medium angezogen wurden. Zum Zeitpunkt 0 wurden 10 OD-Einheiten Zellen abzentrifugiert und in Glukose-haltiges Medium mit 0,5 mg/ml Cycloheximid überführt. Dadurch wurde sowohl der *GAL1-10*-Promotor reprimiert als auch die Translation des Testproteins gehemmt. Es wurde ein Aliquot von einem OD genommen, abzentrifugiert und sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Hefen wurden weiter kultiviert und es wurden zu späteren, definierten Zeitpunkten weitere Aliquots entnommen und

eingefroren. Nach Abschluss des Experiments wurden von den gesammelten Aliquots denaturierende Proteinextrakte hergestellt und mittels SDS-PAGE und Western Blot gegen das jeweilige Testprotein untersucht. Falls das untersuchte Protein nicht vom *GAL1-10*-Promotor exprimiert werden konnte, wurde nur die Translation mit Cycloheximid gehemmt („*Cycloheximid chase*“). *Shutoff*-Experimente mit Spt23 wurden bei 33°C durchgeführt, um die Prozessierung zu stimulieren (Hoppe et al., 2000).

### **Deubiquitinierungsversuch**

Die enzymatische Aktivität von Otu1 und verschiedenen Otu1-Mutanten wurde folgendermassen untersucht: je 2 µg GST-markiertes Otu1 oder Mutanten wurden mit 0,5 µg Polyubiquitinketten über Nacht bei Raumtemperatur in PBS inkubiert (über Lysin 48 vernetzt, n=2-7, Affiniti Research Products). Die Reaktionen wurden dann mit 3× SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert. Die Analyse erfolgte durch 8-20% SDS-PAGE und anti-Ubiquitin-Blot.



## Literaturverzeichnis

Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B. A., Wilkinson, K. D. und Hochstrasser, M. (1997). In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *Embo J* 16, 4826-38.

Amerik, A. Y. und Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695, 189-207.

Amerik, A. Y., Nowak, J., Swaminathan, S. und Hochstrasser, M. (2000). The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* 11, 3365-80.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., ed. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.)

Bartel, B., Wunning, I. und Varshavsky, A. (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. *Embo J* 9, 3179-89.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. und Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-80.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. und Huber, R. (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 295-317.

Borodovsky, A., Ovaa, H., Kolli, N., Gan-Erdene, T., Wilkinson, K. D., Ploegh, H. L. und Kessler, B. M. (2002). Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family. *Chem Biol* 9, 1149-59.

Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. und Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1, 221-6.

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

Brew, C. T. und Huffaker, T. C. (2002). The yeast ubiquitin protease, Ubp3p, promotes protein stability. *Genetics* 162, 1079-89.

Bruderer, R. M., Brasseur, C. und 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* 279, 49609-16.

Buchberger, A., Howard, M. J., Proctor, M. und Bycroft, M. (2001). The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. *J Mol Biol* 307, 17-24.

Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. (2000). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Burnett, B., Li, F. und Pittman, R. N. (2003). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet* 12, 3195-205.

- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K. und Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-83.
- Choi, J. Y., Stukey, J., Hwang, S. Y. und Martin, C. E. (1996). Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J Biol Chem* **271**, 3581-9.
- Cohen, M., Stutz, F., Belgareh, N., Haguenaer-Tsapis, R. und Dargemont, C. (2003). Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol* **5**, 661-7.
- Daniel, J. A., Torok, M. S., Sun, Z. W., Schieltz, D., Allis, C. D., Yates, J. R., 3rd und Grant, P. A. (2004). Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem* **279**, 1867-71.
- Decottignies, A., Evain, A. und Ghislain, M. (2004). Binding of Cdc48p to a ubiquitin-related UBX domain from novel yeast proteins involved in intracellular proteolysis and sporulation. *Yeast* **21**, 127-39.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. und Rechsteiner, M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **269**, 7059-61.
- Dohmen, R. J., Madura, K., Bartel, B. und Varshavsky, A. (1991). The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7351-5.
- Dreveny, I., Kondo, H., Uchiyama, K., Shaw, A., Zhang, X. und Freemont, P. S. (2004). Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *Embo J* **23**, 1030-9.
- Driscoll, J. und Goldberg, A. L. (1990). The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *J Biol Chem* **265**, 4789-92.
- Elsasser, S., Gali, R. R., Schwickart, M., Larsen, C. N., Leggett, D. S., Muller, B., Feng, M. T., Tubing, F., Dittmar, G. A. und Finley, D. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* **4**, 725-30.
- Emre, N. C., Ingvarsdottir, K., Wyce, A., Wood, A., Krogan, N. J., Henry, K. W., Li, K., Marmorstein, R., Greenblatt, J. F., Shilatifard, A. und Berger, S. L. (2005). Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol Cell* **17**, 585-94.
- Evans, P. C., Smith, T. S., Lai, M. J., Williams, M. G., Burke, D. F., Heyninck, K., Kreike, M. M., Beyaert, R., Blundell, T. L. und Kilshaw, P. J. (2003). A novel type of deubiquitinating enzyme. *J Biol Chem* **278**, 23180-6.
- Finley, D., Ozkaynak, E. und Varshavsky, A. (1987). The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**, 1035-46.
- Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J. A., Capati, C., McDonald, W. H., Yates, J. R. und Kaiser, P. (2004). Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* **6**, 634-41.

- Fu, H., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D. und Vierstra, R. D. (1998). Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J Biol Chem* 273, 1970-81.
- Galan, J. M. und Haguenauer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J* 16, 5847-54.
- Ghislain, M., Dohmen, R. J., Levy, F. und Varshavsky, A. (1996). Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15, 4884-99.
- Gietz, R. D. und Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-34.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A. und Finley, D. (1998). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149-62.
- Guthrie, C., Fink, G. R., ed. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, San Diego)
- Hanna, J., Leggett, D. S. und Finley, D. (2003). Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Mol Cell Biol* 23, 9251-61.
- Hanway, D., Chin, J. K., Xia, G., Oshiro, G., Winzeler, E. A. und Romesberg, F. E. (2002). Previously uncharacterized genes in the UV- and MMS-induced DNA damage response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10605-10.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hartmann-Petersen, R., Wallace, M., Hofmann, K., Koch, G., Johnsen, A. H., Hendil, K. B. und Gordon, C. (2004). The Ubx2 and Ubx3 cofactors direct Cdc48 activity to proteolytic and nonproteolytic ubiquitin-dependent processes. *Curr Biol* 14, 824-8.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J. A., Saidowsky, J., Escher, C. und Wolf, D. H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J* 10, 555-62.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L. und Rose, I. A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1783-6.
- Hetzer, M., Meyer, H. H., Walther, T. C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G. und Mattaj, I. W. (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* 3, 1086-91.
- Hicke, L. und Riezman, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-87.
- Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T. und Wolf, D. H. (2004). Endoplasmic reticulum-associated protein degradation--one model fits all? *Biochim Biophys Acta* 1695, 215-23.

- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-41.
- Hofmann, K. und Bucher, P. (1996). The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci* **21**, 172-3.
- Hofmann, K. und Falquet, L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* **26**, 347-50.
- Hofmann, R. M. und Pickart, C. M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **96**, 645-53.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D. und Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**, 577-86.
- Hwang, W. W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A. G., Tong, A., Boone, C., and Madhani, H. D. (2003). A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* **11**, 261-266.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H. und Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* **4**, 134-9.
- Jelinsky, S. A., Estep, P., Church, G. M. und Samson, L. D. (2000). Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol Cell Biol* **20**, 8157-67.
- Jentsch, S., McGrath, J. P. und Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**, 131-4.
- Joazeiro, C. A. und Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549-52.
- Johnson, E. S., Bartel, B., Seufert, W. und Varshavsky, A. (1992). Ubiquitin as a degradation signal. *Embo J* **11**, 497-505.
- Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M. und Varshavsky, A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**, 17442-56.
- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C. und Reed, S. I. (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**, 303-14.
- Katzmann, D. J., Babst, M. und 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**, 145-55.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. und Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**, 963-72.

- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U. und Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-44.
- Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T. P., Pappin, D., Freemont, P. und Warren, G. (1997). p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* 388, 75-8.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L. und Pickart, C. M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-7.
- Lambertson, D., Chen, L. und 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. und Schekman, R. (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 82, 885-93.
- Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R. T., Walz, T., Ploegh, H. und Finley, D. (2002). Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell* 10, 495-507.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A. Y., Qin, J. und Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648-53.
- McGrath, J. P., Jentsch, S. und Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J* 10, 227-36.
- Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A. und Wolf, D. H. (2004). A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep* 5, 692-7.
- Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D. und Warren, G. (2000). A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *Embo J* 19, 2181-92.
- Meyer, H. H., Wang, Y. und Warren, G. (2002). Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *Embo J* 21, 5645-52.
- Moazed, D. und Johnson, D. (1996). A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell* 86, 667-77.
- Mumberg, D., Muller, R. und Funk, M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* 22, 5767-8.
- Mumberg, D., Muller, R. und Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-22.
- Ogiso, Y., Sugiura, R., Kamo, T., Yanagiya, S., Lu, Y., Okazaki, K., Shuntoh, H. und Kuno, T. (2004). Lub1 participates in ubiquitin homeostasis and stress

response via maintenance of cellular ubiquitin contents in fission yeast. *Mol Cell Biol* 24, 2324-31.

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

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-33.

Rabouille, C., Levine, T. P., Peters, J. M. und Warren, G. (1995). An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell* 82, 905-14.

Rao, H. und 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, 11691-5.

Rao, H., Uhlmann, F., Nasmyth, K. und Varshavsky, A. (2001). Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* 410, 955-9.

Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H. und Jentsch, S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-77.

Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, 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. und Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* 20, 3790.

Robzyk, K., Recht, J. und Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 287, 501-4.

Rubin, D. M., Glickman, M. H., Larsen, C. N., Dhruvakumar, S. und Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *Embo J* 17, 4909-19.

Russell, N. S. und Wilkinson, K. D. (2004). Identification of a novel 29-linked polyubiquitin binding protein, Ufd3, using polyubiquitin chain analogues. *Biochemistry* 43, 4844-54.

Salghetti, S. E., Caudy, A. A., Chenoweth, J. G. und Tansey, W. P. (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 293, 1651-3.

Salghetti, S. E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B. und Tansey, W. P. (2000). Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3118-23.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd edition edn (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W. und Madura, K. (1998). Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature* 391, 715-8.

- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. und Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Scheffner, M., Nuber, U. und Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81-3.
- Schuberth, C. und Buchberger, A. (2005). Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7, 999-1006.
- Schuberth, C., Richly, H., Rumpf, S. und Buchberger, A. (2004). Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. *EMBO Rep* 5, 818-24.
- Seufert, W. und Jentsch, S. (1992). In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *Embo J* 11, 3077-80.
- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J. und Harper, J. W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-19.
- Song, E. J., Yim, S. H., Kim, E., Kim, N. S. und Lee, K. J. (2005). Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* 25, 2511-24.
- Spence, J., Gali, R. R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M. und Finley, D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67-76.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A. L. und Finley, D. (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 15, 1265-73.
- Stukey, J. E., McDonough, V. M. und Martin, C. E. (1989). Isolation and characterization of OLE1, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 264, 16537-44.
- Sudol, M. und Hunter, T. (2000). NeW wrinkles for an old domain. *Cell* 103, 1001-4.
- Sun, Z. W. und Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-8.
- Swaminathan, S., Amerik, A. Y. und Hochstrasser, M. (1999). The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell* 10, 2583-94.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. und Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19, 94-102.
- Uchiyama, K., Jokitalo, E., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., Canas, B., Newman, R., Rabouille, C., Pappin, D., Freemont, P. und Kondo, H. (2002). VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J Cell Biol* 159, 855-66.
- van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. und Vierstra, R. D. (1996). The multiubiquitin-chain-

binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* 16, 6020-8.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V. und Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-5.

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

Wang, Y., Satoh, A., Warren, G. und Meyer, H. H. (2004). VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments. *J Cell Biol* 164, 973-8.

Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D. L., Ma, A., Koonin, E. V. und Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430, 694-9.

Wilkinson, C. R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C. und Gordon, C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 3, 939-43.

Wood, A., Krogan, N. J., Dover, J., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M. A., Dean, K., Golshani, A., Zhang, Y., Greenblatt, J. F., *et al.* (2003). Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* 11, 267-274.

Yao, T. und Cohen, R. E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-7.

Ye, Y., Meyer, H. H. und Rapoport, T. A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-6.

Yuan, X., Shaw, A., Zhang, X., Kondo, H., Lally, J., Freemont, P. S. und Matthews, S. (2001). Solution structure and interaction surface of the C-terminal domain from p47: a major p97-cofactor involved in SNARE disassembly. *J Mol Biol* 311, 255-63.

Zachariae, W. und Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 13, 2039-58.

Zhang, S., Guha, S. und Volkert, F. C. (1995). The *Saccharomyces* SHP1 gene, which encodes a regulator of phosphoprotein phosphatase 1 with differential effects on glycogen metabolism, meiotic differentiation, and mitotic cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 15, 2037-50.

Zhang, S., Skalsky, Y. und 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, 473-83.

Zhang, X., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van

Heel, M. und Freemont, P. S. (2000). Structure of the AAA ATPase p97. Mol Cell 6, 1473-84.

## Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>anaphase promoting complex</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
C-Terminus	Carboxyterminus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierungsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GST	Glutathion-S-Transferase
IgG	Immunglobulin gamma
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kD	kiloDalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
min	Minuten
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NEM	N-Ethylmaleimid
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	RNA-verdauendes Enzym
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

S	Sedimentationkoeffizient (Svedberg)
sec	Sekunden
SCF	Skp/Cullin/F-Box
SDS	Natriumdodecylsulfat
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N',N',-Tetramethylethyldiamid
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UBA	<i>ubiquitin</i>
<i>associated</i>	
UBC	<i>ubiquitin conjugating enzyme</i>
UBL	<i>ubiquitin like</i>
UIM	<i>ubiquitin interaction motif</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Hefeextrakt/Pepton/Glukose (Medium)

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Stefan Jentsch bedanken. Die große Freiheit, die er mir bei der Bearbeitung des Themas ließ sowie seine stete Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen der Arbeit maßgeblich beigetragen.

Bei Professor Dr. Jürgen Soll bedanke ich mich recht herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei allen Mitgliedern der Abteilung Jentsch, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, bedanke ich mich ebenfalls sehr herzlich. An erster Stelle zu nennen ist hier Christian Schuberth, der mir immer ein exzellenter Diskussionspartner war. Dirk Kempe hat mir viel Arbeit abgenommen, und Jochen Rechs Massenspektrometrie-Expertise war unersetzlich. Olaf Stemmann hat mir stets mit guten Tipps geholfen. Allgemein danke ich allen Mitgliedern der Abteilung für die gute Arbeitsatmosphäre.

Dank geht ebenfalls an Thomas Taubner und Alex Schmidt für nette Kaffeepausen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Christine für ihr Verständnis und Beistand auch in schwierigen Situationen.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Geburtsdatum /-ort: 20.04.1975 in Göttingen  
Familienstand: ledig

### Wissenschaftliche Tätigkeiten

Seit 03/2001 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie von Prof. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried)

02/2000-12/2000 Diplomarbeit und wissenschaftliche Mitarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernhard Dobberstein am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) zum Thema „Protein-Protein Interaction Analysis of the 72 Kilodalton Protein of the Signal Recognition Particle“

### Studium und schulische Ausbildung

28.09.2000 Abschluß als Diplombiologe, Universität Heidelberg

10/1995 - 09/2000 Biologiestudium an der Universität Heidelberg,  
Hauptfach: Zellbiologie,  
Nebenfächer: Molekularbiologie, Biochemie

02/1998 - 07/1998 Auslandssemester an der Universität Swansea

10/1997 Vordiplom in Biologie, Universität Heidelberg

09.06.1994 Abitur am Max-Planck-Gymnasium Göttingen

1987-1994 Max-Planck-Gymnasium Göttingen

1985-1987 Orientierungsstufe Lutherschule, Göttingen

1981-1985 Grundschule Herberhausen