

UBX-Domänen-Proteine als neue Familie von Kofaktoren der AAA-ATPase Cdc48

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

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Christian Schuberth

1. Juni 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 1. Juni 2006

Promotionsgesuch eingereicht am 1. Juni 2006

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2006

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Peter Becker

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juli 2001 und Mai 2006 unter Anleitung von Dr. Alexander Buchberger am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

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** (8): 818-24.

Schuberth C and 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** (10): 999-1006.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1. Das Ubiquitin/Proteasom-System	2
2.1.1 Das Ubiquitin-Konjugations-System	2
2.1.2 Das 26S Proteasom	4
2.2. Die AAA-ATPase Cdc48/p97	6
2.2.1 Funktionen von Cdc48 in proteasomalen Abbauwegen	9
2.2.2 Die Rolle von Cdc48/p97 bei der homotypischen Membranfusion	14
2.3. UBX-Domänen-Proteine	16
2.3.1 Die UBX-Domäne	16
2.3.2 Bekannte Funktionen von UBX-Domänen-Proteinen	17
2.4. Zielsetzung der Arbeit	20
3. Ergebnisse	21
3.1. Allgemeine Charakterisierung von UBX-Proteinen	21
3.1.1 Alle UBX-Proteine der Hefe interagieren mit Cdc48	22
3.1.2 Interaktionen von UBX-Proteinen mit anderen Cdc48-Kofaktoren	25
3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von UBX-Proteinen	27
3.1.4 Phänotypen von Δubx Nullmutanten	30
3.2. UBA/UBX-Proteine besitzen Funktionen in Cdc48-vermittelten Proteinabbauwegen	33
3.2.1 UBX-Proteine mit UBA-Domäne	33
3.2.2 Shp1 und Ubx2 sind am Proteinabbau beteiligt	36
3.3. Ubx2 als neue Komponente des ERAD-Proteinabbauweges	40
3.3.1 $\Delta ubx2$ Mutanten zeigen Defekte im ERAD-Proteinabbauweg	40
3.3.2 Ubx2 rekrutiert den Cdc48 ^{Ufd1-Npl4} Komplex an ERAD-Substrate	43
3.3.3 Ubx2 rekrutiert den Cdc48 ^{Ufd1-Npl4} Komplex an Komponenten des ERAD-Systems und an das ER	46
3.3.4 Die Rolle der UBX-Domäne von Ubx2 in ERAD	50
4. Diskussion	54
4.1. UBX-Proteine als Kofaktoren für Cdc48	54
4.2. UBA/UBX-Proteine als Adaptoren in Ubiquitin-abhängigen Prozessen	58
4.3. Der Cdc48 ^{Shp1} Komplex in Proteinabbauwegen	60
4.4. Ubx2 als Rekrutierungsfaktor im ERAD-Proteinabbauweg	61
5. Material und Methoden	65
5.1. Material	65
5.1.1 Computeranalysen	65

5.1.2 Antikörper	66
5.1.3 <i>E. coli</i> -Stämme	66
5.1.4 <i>E. coli</i> -Medium	66
5.1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	67
5.1.6 Hefemedien	68
5.1.7 Plasmide	68
5.2. Molekularbiologische Methoden	70
5.2.1 Restriktionsverdau	70
5.2.2 Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	70
5.2.3 Ligation	70
5.2.4 Sequenzierung	70
5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	71
5.3. Methoden mit <i>E. coli</i>	71
5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	71
5.3.2 Kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	71
5.3.3 Transformation von Bakterienzellen	72
5.4. Methoden mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
5.4.1 Transformation von Hefezellen	73
5.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus Hefezellen	74
5.4.3 Analyse von Hefemutanten	74
5.4.4 Nachweis der Interaktion zweier Proteine im Zwei-Hybrid-System	75
5.5. Proteinbiochemische Methoden	76
5.5.1 SDS-Gelelektrophorese	76
5.5.2 Western Blot	76
5.5.3 Herstellung eines Proteinextraktes	76
5.5.4 Analyse der Proteinwechselwirkung durch Immunpräzipitation	77
5.5.5 Analyse der Proteinlokalisierung	79
5.5.6 Analyse der Proteininstabilität	81
6. Literaturverzeichnis	84

Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

1. Zusammenfassung

Die evolutionär stark konservierte AAA-ATPase Cdc48 aus Hefe (p97 in Säugern) ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, unter anderem an homotypischer Membranfusion und Ubiquitin-vermitteltem Proteinabbau. Verschiedene Adaptoren rekrutieren das hexamere Cdc48 an diverse, meist ubiquitinierte Substrate, die unter ATP-Verbrauch aus Proteinkomplexen oder Membranstrukturen herausgezogen werden. Als bekannte Adaptoren wirken das Heterodimer Ufd1-Npl4 und Shp1, deren Bindung an Cdc48 sich wechselseitig ausschließt. Shp1 gehört zur Familie der UBX ("Ubiquitin regulatory X")-Domänen-Proteine, deren Vertreter bislang weitgehend uncharakterisiert sind. Ziel dieser Arbeit war es, sowohl allgemeine Eigenschaften als auch spezifische zelluläre Funktionen von UBX-Domänen-Proteinen aufzuklären.

Für alle sieben UBX-Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* (Shp1 und Ubx2 bis Ubx7) konnte eine Interaktion mit Cdc48 nachgewiesen werden. Dabei wurde die UBX-Domäne als allgemeines Cdc48-Bindemodul identifiziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass UBX-Proteine, die eine "Ubiquitin-associated" (UBA)-Domäne enthalten, mit ubiquitinierten Proteinen interagieren. Für die UBA/UBX-Proteine Shp1 und Ubx2 wurde außerdem ein Einfluss auf die Degradation eines Modellsubstrats des Ubiquitin/Proteasom-Systems festgestellt.

Darüber hinaus wurde Ubx2 als neue Komponente des ER-assoziierten Proteinabbauweges (ERAD) identifiziert, über den falsch gefaltete Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) abgebaut werden. Bevor ERAD-Substrate ubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert werden können, müssen sie aus dem ER ins Zytosol retrotransloziert werden. An diesem Prozess ist der Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplex entscheidend beteiligt. Das integrale ER-Membranprotein Ubx2 kann gleichzeitig mit Ufd1-Npl4 an Cdc48 binden und rekrutiert Cdc48^{Ufd1-Npl4} an ERAD-Substrate und Komponenten der ERAD-Maschinerie, so dass verschiedene für ERAD benötigte Aktivitäten stabil miteinander verbunden werden.

Ubx2 wirkt somit als Koadaptor für Cdc48^{Ufd1-Npl4} in ERAD und unterstreicht damit die Bedeutung der UBX-Proteine als neue Familie von Kofaktoren im Cdc48-System.

2. Einleitung

Lebende Zellen unterliegen fortlaufend dynamischen Veränderungen, die durch Signale aus der Umgebung oder auch den Zellzyklus hervorgerufen werden können. Um sich an neue Bedingungen anzupassen, stehen Zellen eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung, die Zusammensetzung ihrer Proteine allgemein ("Proteom") oder Aktivitäten von bestimmten Proteinen zu regulieren. Dies kann über die Neusynthese auf Transkriptions- oder Translationsebene geschehen, zusätzlich können einzelne Proteine aber auch durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung oder Glykosylierung in ihrer Funktion beeinflusst werden: es kann sowohl die enzymatische Aktivität verändert werden, als auch die Lokalisation oder die Auswahl der Interaktionspartner des Proteins. Um die Funktion vollständig auszuschalten kann außerdem auch ein gezielter Abbau des Protein erfolgen. In Eukaryonten dient dazu hauptsächlich das Ubiquitin/Proteasom-System, das neben der kontrollierten Änderung des Proteoms auch eine bedeutende Rolle bei der Qualitätskontrolle von intrazellulären Proteinen spielt. Substrate dieses Systems werden durch die kovalente Verknüpfung mit dem Protein Ubiquitin markiert, und durch das 26S Proteasom erkannt und abgebaut.

2.1. Das Ubiquitin/Proteasom-System

2.1.1 Das Ubiquitin-Konjugations-System

Das in eukaryotischen Zellen hochkonservierte, 76 Aminosäurereste umfassende Protein Ubiquitin kann posttranslational kovalent an Substratproteine geknüpft ("konjugiert") werden (Pickart, 2001; Pickart und Eddins, 2004). Diese so genannte Ubiquitinierung (auch Ubiquitylierung oder Ubiquitinylierung) ähnelt den konventionellen Proteinmodifikationen wie Phosphorylierung oder Acetylierung und ist wie diese reversibel. Die Modifikation erfolgt durch die Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest von Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe eines

Lysinrestes im Substratprotein. Die Verknüpfungsreaktion wird durch eine Enzymkaskade katalysiert, die sich aus einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) und einer Ubiquitin-Ligase (E3) zusammensetzt (Abb. 1). Der erste Schritt wird in *Saccharomyces cerevisiae* wie im Menschen von einem einzigen E1-Enzym katalysiert (Uba1), das unter ATP-Verbrauch einen energiereichen Thioester zwischen einem konserviertes Cystein im aktiven Zentrum und dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins ausbildet. Durch eine Umesterungsreaktion wird anschließend das aktivierte Ubiquitin auf einen Cysteinrest in der Ubiquitin-konjugierenden (UBC) Domäne eines E2-Enzyms weitergegeben. In der Hefe existieren elf verschiedene E2-Proteine. Die Übertragung auf das Substrat erfolgt schließlich mit Hilfe einer der zahlreichen E3 Ubiquitin-Ligasen, die letztlich die Substratspezifität vermitteln.

Dabei werden zwei Klassen von Ubiquitin-Ligasen unterschieden. RING (**R**eally interesting **n**ew **g**ene) und U-box Ligasen wirken als Rekrutierungsfaktoren für ein E2-Enzym, welches das Substrat direkt ubiquitiniert. HECT (**H**omologous to **E**6-AP **C**-terminus) E3-Enzyme bilden dagegen in einer weiteren Umesterungsreaktion selbst eine Thioesterbindung mit Ubiquitin aus und werden durch das E2 beladen. Anschließend übertragen sie das Ubiquitin auf das Substrat (Abb. 1).

Das mit einem Ubiquitinrest verknüpfte (mono-ubiquitinierte) Substrat kann durch erneutes Ablaufen der Reaktion weiter modifiziert werden, wobei (meist) interne Lysinreste des angehängten Ubiquitins als Akzeptoren für die weitere Konjugation dienen. Dadurch können lange Ubiquitinketten auf dem Substrat entstehen (Multi-Ubiquitinierung), für deren Ausbildung in manchen Fällen auch ein zusätzliches Enzym (E4) zur Kettenverlängerung notwendig ist (Koege *et al.*, 1999). Ein konjugiertes Ubiquitin bzw. eine Ubiquitinkette kann durch spezielle Enzyme vom Substrat wieder abgespalten werden, den Ubiquitin-Hydrolasen (auch als Deubiquitinierungsenzyme, DUB, bezeichnet) (Amerik und Hochstrasser, 2004).

Durch die Länge und Art der Verknüpfung der Ubiquitinkette kann das Schicksal eines Substratproteins beeinflusst werden. Die Konjugation eines

einzelnen Ubiquitins (Mono-Ubiquitinierung) an ein Protein führt in der Regel nicht zu dessen proteasomalen Abbau, sondern erfüllt andere Funktionen wie beispielsweise als Signal für die Endozytose eines Plasmamembranrezeptors (Hicke und Dunn, 2003) oder bei der DNA-Reparatur (Hoege *et al.*, 2002). Bei letzterer spielen auch Ubiquitinketten eine Rolle, die über den Ubiquitin-internen Lysinrest K63 verknüpft sind.

Dagegen markieren Ubiquitinketten, die über den Lysinrest K48 von Ubiquitin ausgebildet wurden, ein Protein normalerweise für den Abbau durch das 26S Proteasom (Chau *et al.*, 1989; Thrower *et al.*, 2000). Dies scheint die wichtigste Aufgabe von Ubiquitin in der Zelle zu sein, da im Gegensatz zu den weiteren Lysinen im Ubiquitin nur eine Mutation des K48-Restes zum Verlust der Lebensfähigkeit von Hefezellen führt (Finley *et al.*, 1994; Spence *et al.*, 1995).

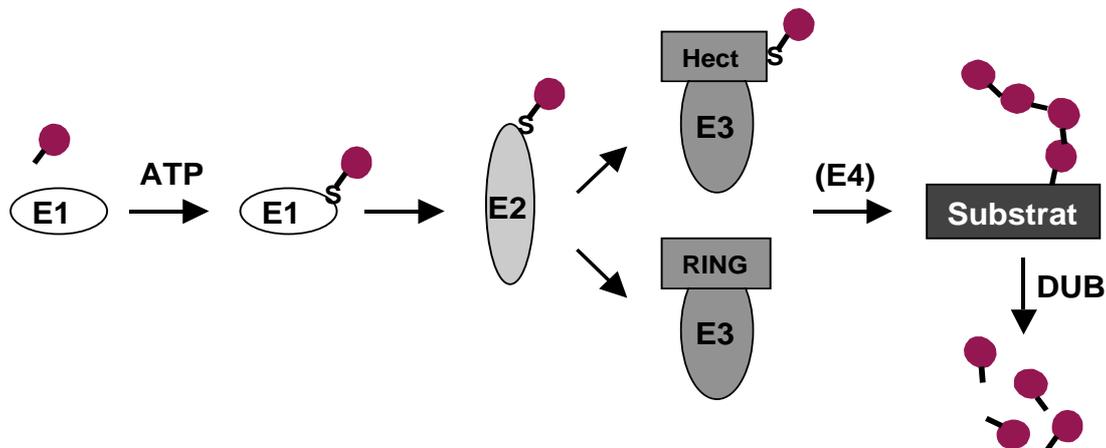


Abb. 1: Das Ubiquitin-Konjugations-System. Nach der Translation wird das initiale Ubiquitin zuerst durch Ubiquitin-Hydrolasen prozessiert und anschließend unter ATP-Verbrauch durch das E1-Enzym aktiviert. Über die konjugierenden E2-Enzyme und Substratspezifität-vermittelnde E3-Ligasen wird das Ubiquitin schließlich auf ein Substrat übertragen und oft selbst modifiziert, so dass sich Ubiquitinketten ausbilden. In einigen Fällen wird zur Kettenverlängerung ein E4-Enzym benötigt. Durch Ubiquitin-Hydrolasen (Deubiquitinierungsenzyme, DUB) können die verknüpften Ubiquitinreste wieder abgespalten werden.

2.1.2 Das 26S Proteasom

Das 26S Proteasom ist ein ca. 2 MDa großes, proteolytisches Enzym, das aus mehreren Proteinkomplexen besteht (Pickart und Cohen, 2004;

Dahlmann, 2005). Es setzt sich zusammen aus ein oder zwei regulatorischen 19S Kappen und einem 20S Partikel, einer Art Hohlzylinder, der die Protease-Funktion übernimmt (Abb. 2). Das 20S Proteasom besteht aus vier Ringen aus je sieben verschiedenen α - und β -Untereinheiten, die in der Abfolge $\alpha\beta\beta\alpha$ übereinander angeordnet sind. Dabei sind jeweils drei β -Untereinheiten katalytisch aktiv und spalten die in den Hohlraum des Zylinders eingeschleusten Proteine, während die α -Untereinheiten im Zusammenspiel mit der/den 19S Kappe(n) den Zugang der Substrate in die Proteasekammer regulieren. Als Substrate werden in der Regel multi-ubiquitinierte Proteine erkannt, die mindestens vier Ubiquitinreste enthalten, und deren Ubiquitinketten über das Lysin K48 verknüpft sind (Thrower *et al.*, 2000). Als Rezeptoren zur Erkennung der modifizierten Substrate dienen Proteine, die Ubiquitin-bindende Domänen enthalten und entweder feste Bestandteile des 26S Proteasoms selbst sind, oder als lösliche Substratadaptoren vorübergehend mit dem Proteasekomplex assoziieren (Schmidt *et al.*, 2005).

So wurde die Untereinheit Rpn10/S5a¹ der 19S Kappe als Ubiquitinketten-Interaktor identifiziert (Deveraux *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1998). Sie enthält ein (S5a: zwei) "**Ubiquitin-interacting motif**" (UIM), eine Abfolge von ungefähr 20 Aminosäuren die eine α -Helix ausbilden, welche neben Ubiquitinketten auch Ubiquitin-ähnliche Domänen binden kann (Walters *et al.*, 2002). Interessanterweise sind diese **Ubiquitin-ähnliche Domänen** (UBD) auch am N-Terminus der zwei löslichen Substratrezeptoren Rad23 und Dsk2 zu finden, die über diese Domänen ans Proteasom binden können (Elsasser *et al.*, 2002; Funakoshi *et al.*, 2002). Für die humanen Rad23-Homologen hHR23A/B wurde die Bindung an S5a gezeigt (Hiyama *et al.*, 1999), in Hefe interagieren Rad23 und Dsk2 dagegen mit der proteasomalen Untereinheit Rpn1 (Elsasser *et al.*, 2002). In Rad23 wurden zwei, in Dsk2 eine "**Ubiquitin-associated**" (UBA)-Domäne identifiziert (Hofmann und Bucher, 1996), die am C-Terminus der Proteine zu finden sind und Ubiquitin binden können (Bertolaet *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001). Über die UBA-Domänen

¹Bei orthologen Proteinen werden zuerst die Hefenamen angegeben

können Rad23 und Dsk2 ubiquitinierte Proteine als Abbausubstrate zum Proteasom rekrutieren (Rao und Sastry, 2002; Verma *et al.*, 2004).

Nach der Erkennung und vor der Degradation des Substrats werden die konjugierten Ubiquitinreste durch Proteasom-assoziierte Ubiquitin-Hydrolasen wieder abgespalten und können erneut zur Verknüpfung verwendet werden (Abb. 2). In der 19S Kappe sind außerdem Proteine der AAA-ATPase Familie (siehe unten) zu finden, die eine Chaperon-ähnliche Aktivität besitzen und die Energie aus der ATP-Hydrolyse nutzen, um Substrate zu entfalten und in den Hohlzylinder einzuschleusen (Glickman *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 1999). Interessanterweise ist an bestimmten Degradationsprozessen auch ein weiteres Protein der AAA-Familie beteiligt, Cdc48, dessen Aktivität allerdings bereits vor der Bindung des Substrats an das Proteasom benötigt wird.

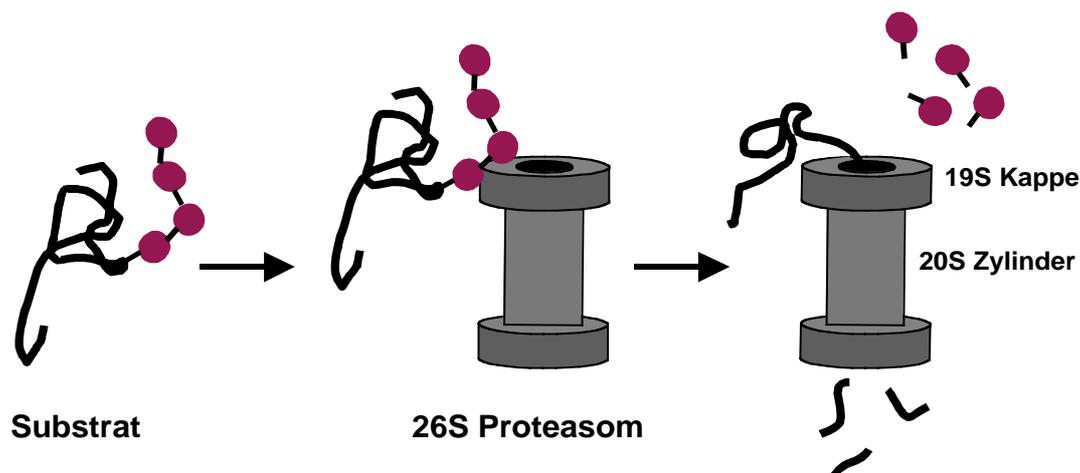


Abb. 2: Proteinabbau durch das 26S Proteasom. Multi-ubiquitinierte Proteine werden durch Substratrezeptoren erkannt und an der 19S Kappe des Proteasoms gebunden. Proteasom-assoziierte Ubiquitin-Hydrolasen spalten die Ubiquitinreste vom Substrat ab, bevor dieses unter ATP-Verbrauch entfaltet und in den 20S Zylinder eingeschleust wird. Die katalytischen β -Untereinheiten des 20S Partikels spalten das Protein in 10-12 Aminosäurereste umfassende Peptide.

2.2. Die AAA-ATPase Cdc48/p97

Proteine aus der Familie der AAA-ATPasen ("ATPasen associated with diverse cellular activities") haben Funktionen in verschiedenen zellulären Prozessen wie Zellteilung, Proteolyse, Vesikeltransport oder Biogenese von

Endosomen und Peroxysomen (Lupas und Martin, 2002; Hanson und Whiteheart, 2005). Gekennzeichnet sind sie durch eine konservierte ATPase-Domäne von etwa 240 Aminosäuren, die neben den klassischen Walker A- und Walker B-Motiven einen weiteren stark konservierten Abschnitt aufweist, die "**Second Region of Homology**" (SRH, Abb. 3a). AAA-ATPasen enthalten ein oder zwei dieser AAA-Domänen (mit D1 und D2 bezeichnet) sowie oft einen variablen Bereich von ungefähr 200 Aminosäuren am N-Terminus, die so genannte N-Domäne, welche die Substrat- und Kofaktorbindung vermittelt.

Trotz der Unterschiedlichkeit der Prozesse, in denen AAA-Proteine wirken, lassen sich einige Gemeinsamkeiten bei der Funktionsweise feststellen. AAA-ATPasen bilden Oligomere - meist Hexamere -, die im Falle der Typ II-ATPasen (zwei D-Domänen) stabile Einheiten darstellen, sich bei Typ I (eine D-Domäne) aber auch abhängig von der Substrat- oder Nukleotidbindung ausbilden können (Lupas und Martin, 2002). Diese Komplexe nutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse zur Entwindung von Proteinkomplexen, zur Extraktion von Substraten aus Membranstrukturen oder zur kompletten Entfaltung von Proteinen (Hanson und Whiteheart, 2005). Sec18/NSF (**N**-ethylmaleimide-**sensitive factor**) beispielsweise löst SNARE ("**S**oluble **NSF** attachment protein **r**eceptor")-Komplexe nach der Fusion von Vesikeln mit einer Organellenmembran auf, um die einzelnen SNARE-Proteine für weitere Fusionszyklen bereitzustellen (Whiteheart und Matveeva, 2004). Dagegen sorgen die AAA-Proteine Rpt1 bis Rpt6 der proteasomalen 19S Kappe für eine Entfaltung der für den Abbau vorgesehenen Proteine (Rubin *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 1999).

Die Vielfältigkeit der von AAA-ATPasen übernommenen Aufgaben spiegelt sich besonders beim Vertreter Cdc48 aus Hefe bzw. p97 oder VCP ("**V**alysin-**c**ontaining **p**rotein") aus Säugern wider. *CDC48* wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* als essentielles Gen mit Funktionen im Zellzyklus (Mutante des "**C**ell **d**ivision **c**ycle") beschrieben und isoliert (Moir *et al.*, 1982; Frohlich *et al.*, 1991). Später wurde Cdc48/p97 als Faktor für die Fusion homotypischer Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates identifiziert (Latterich *et al.*, 1995; Rabouille *et al.*, 1995).

Cdc48 ist eine Typ II-AAA-ATPase (Abb. 3a) und liegt in Zellen als ringförmig angeordnetes Hexamer vor (Abb. 3b) (Peters *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1992; Frohlich *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1997).

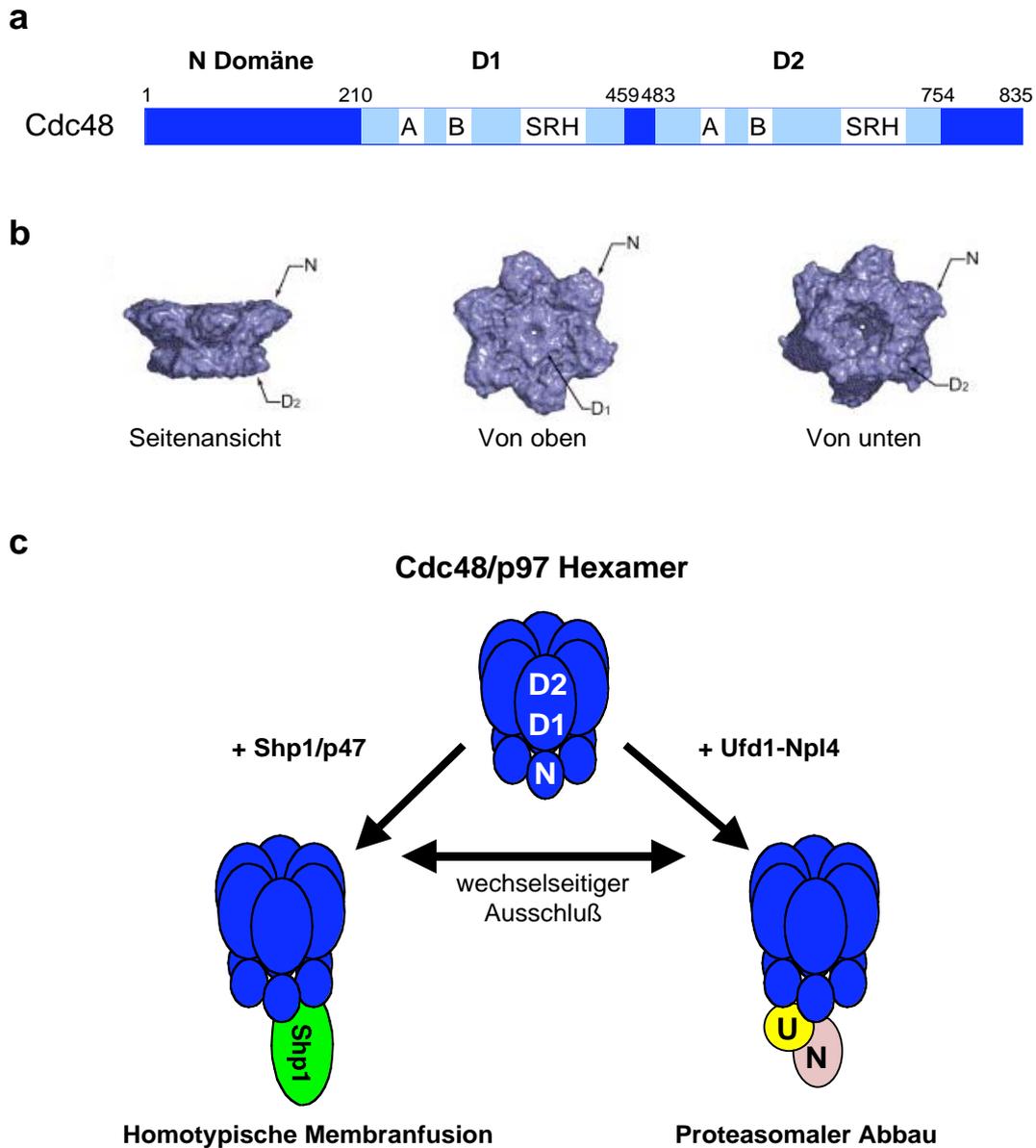


Abb. 3: Die AAA-ATPase Cdc48. **a.** Schematische Darstellung von Cdc48 aus *Saccharomyces cerevisiae*. In den beiden AAA-Domänen (D1 und D2) sind die ATPase-Motive Walker A und Walker B eingezeichnet (A bzw. B), sowie die charakteristische "Second Region of Homology" (SRH). Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäurereste. **b.** Dreidimensionale Struktur von murinem p97 (Davies *et al.*, 2005) aus mehreren Perspektiven. Die einzelnen Domänen sind durch Pfeile angezeigt. **c.** Schematische Darstellung von Cdc48- bzw. p97-Adaptorenkomplexen und den ihnen hauptsächlich zugeschriebenen Funktionen. U: Ufd1, N: Npl4. Das weiße N bezeichnet die N-Domäne, D1 und D2 die beiden AAA-Domänen in Cdc48.

In weiteren Studien wurde Cdc48 als Komponente von Proteinabbauwegen wie des “**Ubiquitin-Fusion-Degradation**” (UFD)- und des “**ER-associated degradation**” (ERAD)-Abbauweges beschrieben (siehe 2.2.1), außerdem wurden Funktionen für Cdc48 bei der Mobilisierung eines in der ER-Membran lokalisierten Transkriptionsfaktors (Rape *et al.*, 2001) und der Disassemblierung der mitotischen Spindel gefunden (Cao *et al.*, 2003).

Die Spezifität dieser unterschiedlichen Cdc48-Aktivitäten wird durch eine sich wechselseitig ausschließende Bindung von zwei Adaptorproteinen vermittelt (Abb. 3c), dem stabilen Heterodimer Ufd1-Npl4 und Shp1/p47 (Kondo *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 2000), die von Hefe bis Mensch konserviert sind. Dem Cdc48^{Shp1} Komplex wurden Funktionen bei der Membranfusion zugeordnet (siehe 2.2.2), während Cdc48^{Ufd1-Npl4} hauptsächlich als Komponente von proteasomalen Abbauwegen charakterisiert wurde.

2.2.1 Funktionen von Cdc48 in proteasomalen Abbauwegen

Cdc48 im UFD-Abbauweg

Der erste Hinweis auf Funktionen von Cdc48 beim Proteinabbau kam durch Studien zum “**Ubiquitin fusion degradation**” (UFD)-Proteinabbauweg. Substrate dieses Abbauweges entstehen durch eine stabile, das heißt nicht durch Ubiquitin-Hydrolasen abspaltbare, lineare Fusion eines Ubiquitinrestes an den N-Terminus eines Proteins (Bachmair *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1992). Der Ubiquitinrest des Fusionsproteins wird an seinen Lysinresten K29 und K48 weiter ubiquitiniert, und das multi-ubiquitinierte Protein schließlich durch das 26S Proteasom degradiert. In einem genetischen Screen wurden unter anderem *UFD1*, *UFD2* und *UFD3* als essentielle Gene für diesen Abbauweg isoliert (Johnson *et al.*, 1995), deren korrespondierende Proteine alle als Bindungspartner von Cdc48 identifiziert wurden (Ghislain *et al.*, 1996; Koegl *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wurden auch Cdc48 selbst sowie der Ufd1-Interaktionspartner Npl4 als Komponenten des UFD-Abbauweges beschrieben (Ghislain *et al.*, 1996; Rape *et al.*, 2001). Cdc48 spielt also zusammen mit den genannten Kofaktoren eine zentrale Rolle in diesem Abbauweg. Die molekulare Wirkungsweise von Cdc48, vor

allem in Bezug auf seine Protein-Entfaltungsaktivität, ist für den UFD-Prozess allerdings unklar.

Die Verbindung von Cdc48 zum Ubiquitin/Proteasom-System wurde im Folgenden eingehender untersucht und insbesondere die Bedeutung des Ufd1-Npl4 Heterodimers als Substratadaptor für ubiquitinierte Proteine aufgezeigt (Meyer *et al.*, 2000; Rape *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002; Richly *et al.*, 2005). Sowohl mono- als auch multi-ubiquitinierte Proteine werden durch den Cdc48^{Ufd1-Npl4}-Komplex erkannt und umgesetzt, das heißt in vielen Fällen dem Abbau zugeführt. Ufd2 und Ufd3 dienen dagegen als Substratprozessierende Kofaktoren (Richly *et al.*, 2005; Rumpf und Jentsch, 2006), wobei Ufd2 als E4-Enzym die Ubiquitinkettenverlängerung katalysiert (Koegele *et al.*, 1999) und somit den Abbau von Cdc48-Substraten unterstützt. Ufd3 hingegen agiert als Gegenspieler von Ufd2 und kann im Zusammenspiel mit dem Deubiquitinierungsenzym Otu1 Proteine vor dem Abbau bewahren (Rumpf und Jentsch, 2006).

Der "OLE Pathway"

Tiefere Einblicke in das Ubiquitin-abhängige Cdc48-System gewährten die Studien zur Regulation der *OLE1* Transkription ("OLE Pathway"). Der ER-membranständige Transkriptionsfaktor Spt23 wird nach einer Prozessierung (limitierten Proteolyse) durch das 26S Proteasom als mono-ubiquitiniertes Protein von Cdc48^{Ufd1-Npl4} erkannt und vom ER losgelöst (Hoppe *et al.*, 2000; Rape *et al.*, 2001). Die ATP-konsumierende Funktion von Cdc48 ist hierbei die Mobilisierung des Transkriptionsfaktors, der aus einem dimeren, mit seinem in der Membran verankerten, inaktiven Vorläufer gebildeten Komplex herausgezogen wird, um anschließend in den Zellkern transportiert werden zu können. Diese "Segregase"-Aktivität des Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes ist auch in weiteren Prozessen zu beobachten (ERAD, siehe unten) und scheint die allgemeine Wirkungsweise der Cdc48 AAA-ATPase darzustellen. Nach Aktivierung der *OLE1* Transkription im Zellkern wird Spt23 durch Ufd2 multi-ubiquitiniert, über die Substratrezeptoren Rad23 und Dsk2 an das Proteasom rekrutiert und degradiert (Richly *et al.*, 2005). Die Interaktion der

Komponenten Cdc48^{Ufd1-Npl4}, Ufd2 und Rad23 miteinander, sowie deren unterschiedliche Affinität für die verschiedenen Stadien der Ubiquitin-modifikation von Spt23 lassen eine lineare Abfolge der Ereignisse vermuten. Das Substrat wird also nach seiner Erkennung durch Cdc48^{Ufd1-Npl4} von einer Komponente zur nächsten weitergereicht und bis zum 26S Proteasom eskortiert, durch welches es schließlich degradiert wird (“escort pathway” (Richly *et al.*, 2005)). Eine weitere Eigenschaft von Cdc48 ist also die stabile Verbindung der Rekrutierung, Prozessierung und Weiterleitung von ubiquitinierten Substratproteinen.

Cdc48 im ERAD-System

Eine zum “OLE Pathway” ähnliche Funktion übernimmt Cdc48 auch im “**E**ndoplasmic reticulum-**a**ssociated **d**egradation” (ERAD)-Proteinabbauweg (Abb. 4). Über dieses System werden falsch gefaltete Proteine aus dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) oder aus der ER-Membran entfernt (Meusser *et al.*, 2005; Romisch, 2005). Neu synthetisierte Proteine des ERs sowie für den sekretorischen Weg vorgesehene Proteine werden entweder ko- oder posttranslational durch einen Sec61 enthaltenden Membrankanal in das ER eingeschleust und falten sich erst während oder nach dieser Translokation. Verschiedene Komponenten des ER-Lumens, wie das Chaperon Kar2/BiP oder die Disulfidisomerase Pdi1, agieren dabei als Faltungshelfer (Wang und Chang, 1999; Helenius und Aebi, 2001; Hirsch *et al.*, 2004). Weiterhin dienen Enzyme, die den Status der N-Glykosylierung der Proteine verändern und überwachen, als System zur Qualitätskontrolle für die neu gefalteten Proteine. Entsprechen diese nicht den Anforderungen, werden sie als ERAD-Substrate zurück ins Zytosol transportiert (retrotransloziert) und über den Ubiquitin/Proteasom-Weg abgebaut (Ellgaard und Helenius, 2003).

Für diesen Prozess werden mehrere Komponenten benötigt. Der für den retrograden Transport der Substrate notwendige Membrankanal (Pore) ist noch nicht eindeutig identifiziert. Als Kandidaten kommen sowohl Proteinkomplexe der Translokon-Untereinheit Sec61 in Frage, als auch Proteine der Derlin-Familie, dessen Vertreter Der1 aus Hefe bereits seit

längerem als ERAD-Komponente zur Degradation luminaler Substrate beschrieben ist (Knop *et al.*, 1996). Allerdings scheint Der1 für den Abbau von membranständigen Substraten nicht benötigt zu werden (Vashist und Ng, 2004; Kreft *et al.*, 2005). Kürzlich wurde auch eine Funktion für das humane Der1-Homologe Derlin-1 in ERAD gefunden und dieses Protein als Porenbestandteil vorgeschlagen (Lilley und Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004). Proteine der Derlin-Familie besitzen mehrere Transmembrandurchgänge und könnten durch die Ausbildung homo- oder hetero-oligomerer Strukturen einen Membrankanal formen. Zudem interagiert Derlin-1 mit p97 (Cdc48), das in ERAD eine zentrale Rolle einnimmt.

In mehreren Studien wurde die Beteiligung des Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes am ERAD-Prozess gezeigt (Bays *et al.*, 2001b; Ye *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002). Dabei wird die ATPase-abhängige "Segregase"-Aktivität wahrscheinlich sowohl für die retrograde Translokation von Substraten durch die Membranpore als auch für die Loslösung multi-ubiquitinerter Substrate von der ER-Membran benötigt (Jarosch *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2003; Elkabetz *et al.*, 2004). Somit ist das Wirken des Cdc48-Komplexes möglicherweise eng mit der im Zytosol stattfindenden Ubiquitinierung der ERAD-Substrate verbunden, da diese die Retrotranslokation der Proteine unterstützt (Flierman *et al.*, 2003). Cdc48^{Ufd1-Npl4} könnte dabei auch zwischen einzelnen Ubiquitinierungsschritten agieren.

In Hefe sind hauptsächlich drei Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2), Ubc1, Ubc6 und Ubc7, sowie zwei Ubiquitin-Ligasen (E3) der RING-Familie für die Ubiquitinierung von ERAD-Substraten verantwortlich. Das E3 Hrd1 arbeitet mit den E2s Ubc1 und Ubc7 zusammen (Bays *et al.*, 2001a) und ist für den Abbau von lumenal erkannten ERAD-Substraten wichtig (ERAD-L Weg). Diese können sowohl lösliche Proteine des ER-Lumens als auch ER-Membranproteine mit luminaler Domäne sein (Vashist *et al.*, 2001; Taxis *et al.*, 2002; Vashist und Ng, 2004). Die Ubiquitin-Ligase Doa10 (Swanson *et al.*, 2001) wird für die Degradation von ER-membranständigen Proteinen benötigt, deren Missfaltung in einer Domäne auf der zytoplasmatischen Seite der ER-

Membran liegt. Diese Substrate werden durch das ERAD-C Kontrollsystem erkannt und deutlich schneller abgebaut als ERAD-L Substrate (Vashist und Ng, 2004).

Rad23 und Dsk2 wirken auch in ERAD als lösliche Substratrezeptoren des Proteasoms, die Degradation von Proteinen über den ERAD-Proteinabbauweg verläuft also ebenfalls über ein Eskortierungs-System (Medicherla *et al.*, 2004; Richly *et al.*, 2005).

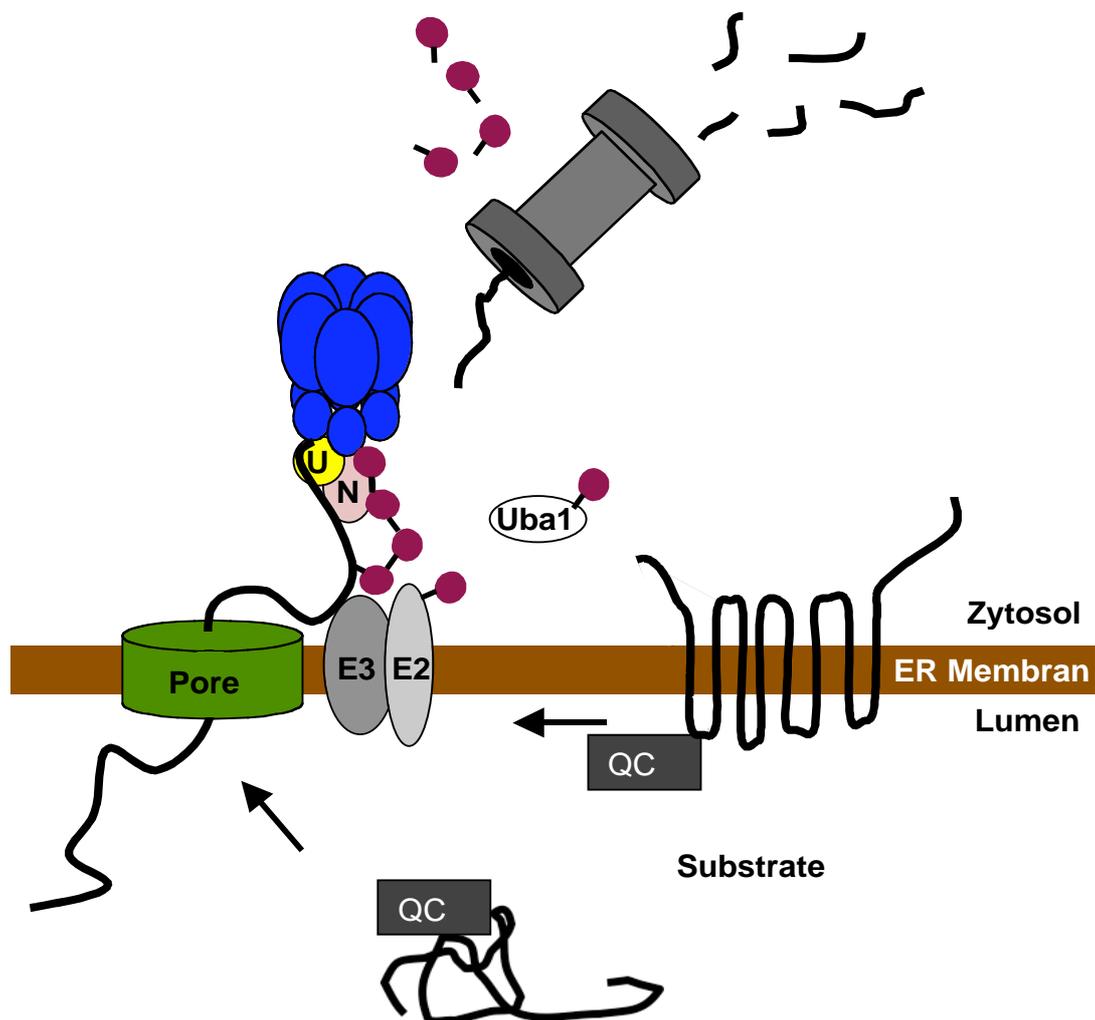


Abb. 4: Der ERAD-Proteinabbauweg. Falsch gefaltete Proteine der ER-Membran oder des ER-Lumens werden durch ERAD-Komponenten erkannt, zurück ins Zytosol gezogen und über das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut. Für weitere Erklärungen siehe Text. Cdc48 ist in blau abgebildet. U: Ufd1; N: Npl4; Uba1: Hefe E1-Enzym; E2: ERAD E2-Enzyme Ubc6 und Ubc7, die selbst (Ubc6) oder über einen Bindungspartner (Cue1 bei Ubc7) in der ER-Membran verankert sind. Das ERAD-E2 Ubc1 ist allerdings löslich; E3: ERAD-E3-Enzyme Hrd1 und Doa10; QC: Faltungshelfer und Komponenten des Qualitätskontroll-Systems im ER-Lumen, zu denen unter anderem das Chaperon Kar2/BiP, Disulfidisomerasen (Pdi1, Eps1) und Lektine (Htm1/EDEM, Yos9) gehören.

Cdc48 im Zellzyklus

Weitere Funktionen im Proteinabbau besitzt Cdc48 bei der Regulation des Zellzyklus. Depletiert man Cdc48 aus Hefezellen durch induzierten Abbau, führt dies zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase, da der G1-CDK ("Cyclin dependent kinase")-Inhibitor Far1 nicht mehr degradiert wird (Fu *et al.*, 2003). Allerdings steht dieser Befund der initialen Charakterisierung des *CDC48*-Gens entgegen, bei der *cdc48-1* Mutanten einen Stopp am G2/M-Übergang zeigten (Moir *et al.*, 1982). Eine Verbindung zum Zellzyklus wurde außerdem in einer Studie zum Einfluss von Cdc48^{Ufd1-Npl4} auf die Auflösung der Spindel nach der Mitose gefunden (Cao *et al.*, 2003). Dabei wurden als Substrate für die Cdc48-vermittelte Degradation ein Mikrotubuli-bindendes Protein, Ase1, sowie die Polo-ähnlichen Kinase Cdc5 identifiziert. Die Beteiligung von Ufd1-Npl4 am Abbau dieser Substrate wurde allerdings nicht direkt gezeigt.

2.2.2 Die Rolle von Cdc48/p97 bei der homotypischen Membranfusion

Die Fusion von Membranen des gleichen Organellen-Typs wird im allgemeinen als homotypische Membranfusion bezeichnet. Sie ist sowohl für den Erhalt als auch die Neuorganisation eines Organells, beispielsweise nach der Mitose, verantwortlich. Für Cdc48/p97 wurde erstmals 1995 eine Beteiligung an Prozessen der homotypischen Membranfusion gezeigt: bei der Fusion von ER-Membranen in Hefe und bei der Reassemblierung von mitotischen Golgi-Fragmenten aus menschlichen Zellen *in vitro* (Acharya *et al.*, 1995; Latterich *et al.*, 1995; Rabouille *et al.*, 1995). In diesen Prozessen wird für Cdc48 eine Aktivität ähnlich zu der der AAA-ATPase Sec18 (NSF) vermutet, welche nach einer erfolgten Membranfusion das Auflösen von SNARE ("Soluble NSF attachment protein receptors")-Komplexen bewirkt, um diese für neue Fusionszyklen bereitzustellen ("Priming") (Whiteheart *et al.*, 2001). NSF wirkt hauptsächlich bei der Fusion von Membranen unterschiedlichen Typs (heterotypische Membranfusion) wie beispielsweise von Vesikeln mit Organellen, konnte allerdings auch die Ausbildung von Golgi-Strukturen aus den mitotischen Fragmenten vermitteln (Rabouille *et al.*,

1995). Der Unterschied zwischen NSF und p97 scheint in der Auswahl der SNARE-Komplexe zu liegen. Während NSF vorwiegend Komplexe auflöst, die durch Zusammenlagerung eines v-SNAREs einer Vesikelmembran mit einem t-SNARE einer Organellenmembran entstanden sind (Whiteheart *et al.*, 2001) wird für p97 die Entwindung reiner t-SNARE Komplexe vermutet: für die Fusion von ER-Membranen in Hefe werden nur das t-SNARE Ufe1 und Cdc48 benötigt, nicht jedoch Sec18 (NSF) (Patel *et al.*, 1998). Außerdem wird die p97-vermittelte Reassemblierung der mitotischen Golgi-Fragmente, im Gegensatz zum Ansatz mit NSF, nicht durch die Zugabe von Antikörpern gegen das v-SNARE Gos28 blockiert (Rabouille *et al.*, 1998).

NSF benötigt für die Interaktion mit den SNARE-Komplexen bestimmte Adaptorproteine, die SNAPs (“**S**oluble **N**SF **a**ttachment **p**rotein”). Ebenso wurde für p97 ein notwendiger Kofaktor für die *in-vitro*-Fusion der mitotischen Golgi-Fragmente identifiziert, p47 (Shp1) (Kondo *et al.*, 1997). Dieses bildet in Zellen einen stabilen Komplex mit p97 und schließt eine gleichzeitige Bindung des heterodimeren Ufd1-Npl4 Adaptorproteins aus (Meyer *et al.*, 2000). p47 kann direkt mit dem t-SNARE Syntaxin5 (Sed5) interagieren und vermittelt dessen Bindung an p97 *in vitro* (Rabouille *et al.*, 1998). Zudem beeinflusst es die ATPase-Aktivität von p97 (Meyer *et al.*, 1998).

Interessanterweise wurde auch für den p97^{p47} (Cdc48^{Shp1}) Komplex eine Verbindung zum Ubiquitin-System gefunden. p47 besitzt an seinem N-Terminus eine funktionale UBA-Domäne, die einzelne Ubiquitin-Einheiten binden kann und für die Funktion bei der *in-vitro*-Fusion der mitotischen Golgi-Fragmente notwendig ist (Meyer *et al.*, 2002). Allerdings spielt bei der Fusionsreaktion weder der Abbau durch das Proteasom noch eine Ubiquitinketten-Ausbildung eine Rolle, vielmehr wurde ein Deubiquitinierungsenzym identifiziert, VCIP135, dessen Aktivität für den Fusionsprozess benötigt wird (Uchiyama *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Das Ubiquitin-System übernimmt in diesem Zusammenhang also eine nicht-proteolytische Markierungsfunktion, möglicherweise wird die Mono-Ubiquitinierung eines noch unbekanntes Substrates als Erkennungssignal für die Rekurierung des p97^{p47} Komplexes. Es ist allerdings anzumerken, dass die

Bindung des t-SNARE-Substrats Syntaxin5 durch p97^{p47} und der Einfluss von VCIP135 auf diese Interaktion *in vitro* ohne eine Ubiquitinierung stattfinden kann (Uchiyama *et al.*, 2002). Insgesamt ist aber festzuhalten, dass die Aktivität von Cdc48/p97 *in vivo* nicht nur in Verbindung mit Ufd1-Npl4, sondern scheinbar allgemein auf Ubiquitin-modifizierte Proteine gerichtet ist.

Für einen weiteren p97-abhängigen Prozess, den Aufbau der Kernmembran aus Vesikeln im *Xenopus*-System, ist der Einfluss des Ubiquitin-Systems zwar unklar, jedoch sind sowohl Ufd1-Npl4 als auch p47 daran beteiligt (Hetzer *et al.*, 2001). Für p97^{Ufd1-Npl4} wurde dabei erstmals eine Funktion in der Membranfusion gezeigt. Dieser Komplex wird für die Ausbildung einer geschlossenen Kernmembran benötigt, während p97^{p47} die entstandene Kernhülle vergrößert.

Der Adaptor p47 interagiert mit p97 über ein C-terminales Fragment, das eine "Ubiquitin regulatory X" (UBX)-Domäne beinhaltet (Yuan *et al.*, 2001). Diese Domäne ist auch in einer Reihe weiterer eukaryotischer Proteine zu finden, deren Funktionen allerdings weitgehend unbekannt sind.

2.3. UBX-Domänen-Proteine

2.3.1 Die UBX-Domäne

Die "Ubiquitin regulatory X" (UBX)-Domäne wurde im Rahmen einer Sequenzstudie zur "Ubiquitin-associated" (UBA)-Domäne zuerst in dem hypothetischen Protein Y33K identifiziert (Hofmann und Bucher, 1996) und später in einer Vielzahl weiterer eukaryotischer Proteine gefunden (Buchberger *et al.*, 2001; Carim-Todd *et al.*, 2001). Die Domäne umfasst ungefähr 80 Aminosäuren mit entfernter Sequenzähnlichkeit zu Ubiquitin (ca. 25%) und ist meist am C-Terminus der Proteine zu finden. Interessanterweise sind die dreidimensionalen Strukturen von Ubiquitin und der UBX-Domäne nahezu identisch (Abb. 5), wie die Strukturanalysen der UBX-Domänen von FAF1 ("Fas-associated factor 1") und p47 ergaben (Buchberger *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2001). Die Organisation der Sekundärstrukturen ist eine Abfolge von α -Helizes und β -Faltblättern in der Reihenfolge β - β - α - β - β - α - β , die einen

charakteristischen “Ubiquitin-fold” ausbilden, welcher auch von anderen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen wie beispielsweise SUMO-1 angenommen wird. Im Gegensatz zu Ubiquitin und anderen Ubiquitin-ähnlichen Modifikationsproteinen besitzt die UBX-Domäne kein Doppelglycinmotiv am C-Terminus, so dass UBX-Proteine nicht an andere Proteine konjugiert werden können.

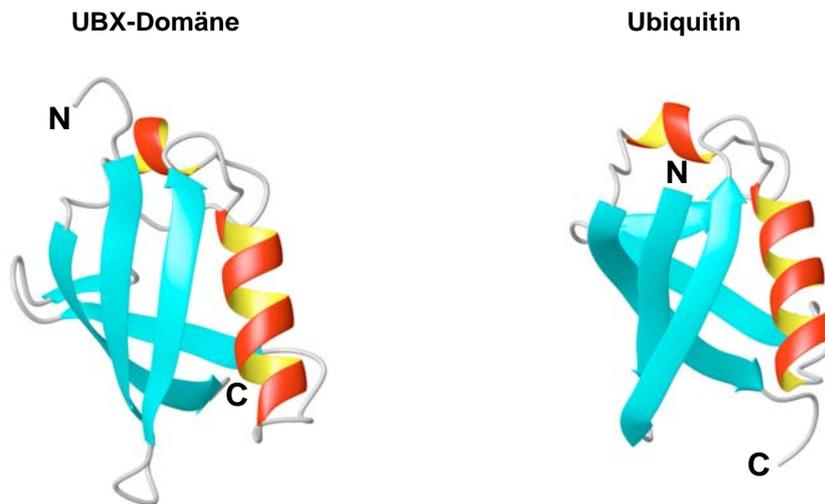


Abb. 5: Dreidimensionale Struktur einer UBX-Domäne im Vergleich zu Ubiquitin. Gezeigt sind Strukturmodelle der UBX-Domäne von FAF1 (Buchberger *et al.*, 2001) und humanem Ubiquitin. Die Amino- bzw. Carboxytermini sind jeweils mit N bzw. C markiert.

Die neue Familie der UBX-Proteine konnte aufgrund von Sequenzvergleichen außerhalb der UBX-Domänen in 5 Untergruppen zusammengefasst werden, die evolutionär konserviert sind (Buchberger *et al.*, 2001). Neben der Unterfamilie von Y33K und dem bereits oben beschriebenen p47 sind dies die Gruppen von FAF1 und Rep-8, sowie den anderweitig nicht zuzuordnenden UBX-Proteinen.

2.3.2 Bekannte Funktionen von UBX-Domänen-Proteinen

Obwohl die Anzahl von Proteinen mit einer UBX-Domäne relativ groß ist, wurden bislang nur wenige UBX-Proteine charakterisiert, am ausführlichsten der p97-Adaptor p47 (siehe 2.2.2). Interessanterweise enthält das ebenfalls in der homotypischen Membranfusion involvierte Deubiquitinierungsenzym VCIP135 auch eine UBX-Domäne (Uchiyama *et al.*, 2002).

Weiterhin wurden Studien zu den p47-homologen Proteinen “**e**yes closed” (*eyc*) aus *Drosophila* und *Shp1* aus Hefe durchgeführt. Phänotypisch ist *eyc* nötig für die Ausbildung von Photorezeptoren in der Fliege, auf zellulärer Ebene kann man auch Effekte auf Membranfusions-Prozesse beobachten. Die Überexpression von *eyc* führt zu einer Ausdehnung des ERs und eine Mutation verhindert den Wiederaufbau der Kernmembran (Sang und Ready, 2002). *SHP1* (“**S**uppressor of **h**igh copy **p**hosphatase”) aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde hingegen in einem genetischen Screen für Mutanten isoliert, die eine erhöhte Phosphatase-Aktivität von Glc7 supprimierten. Weiterhin zeigen *shp1*-Mutanten ein verlangsamtes Wachstum und Defekte bei der Speicherung von Glykogen (Zhang *et al.*, 1995). Eine Verbindung zu homotypischer Membranfusion wurde bisher nur in Bezug auf die Vakuole gefunden (S. Thoms 2002, Dissertation an der Universität Witten/Herdecke; (Seeley *et al.*, 2002).

Neben p47 sind in einer Reihe von weiteren UBX-Proteinen UBA-Domänen identifiziert worden, beispielsweise in FAF1 und Y33K/SAKS1 (Suyama *et al.*, 2000; Buchberger *et al.*, 2001). Möglicherweise könnte deren zelluläre Funktionen ebenfalls in Verbindung mit dem Ubiquitin-System stehen.

Zu Beginn dieser Arbeit existierten außerdem vereinzelte Studien zu folgenden UBX-Proteinen:

FAF1 bindet an den Fas-Rezeptor und ist Bestandteil des “Death-inducing Signaling Complex” (Chu *et al.*, 1995; Frohlich *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 1999; Ryu *et al.*, 2003). Es wurde als Verstärkungsfaktor für die Fas-induzierte Apoptose von Zellen beschrieben, eine Überexpression von FAF1 scheint allerdings auch ohne extrinsisches Signal zur Apoptose führen zu können (Ryu und Kim, 2001). Weiterhin wurden Funktionen von FAF1 im NF- κ B-Signalweg und bei der Regulation der Aktivität von Chaperonen der Hsp70 Familie beschrieben (Park *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005).

Y33K wurde als ein Interaktor der Peptid:N-Glykanase gefunden (Park *et al.*, 2001).

Die Rep-8 Proteine sind nur in Säugern zu finden und könnten eine Rolle bei der Fortpflanzung spielen (Yamabe *et al.*, 1997; Yamabe *et al.*, 1999).

Das UBX-Protein Socius aus der Ratte wurde als Interaktor von Rho-GTPasen identifiziert und könnte Aufgaben bei der Organisation des Aktin-Zytoskeletts besitzen (Katoh *et al.*, 2002).

Das murine TUG bindet an den GLUT4 Glukose-Transporter und beeinflusst dessen Lokalisation an der Plasmamembran (Bogan *et al.*, 2003).

Insgesamt ist die Bedeutung der UBX-Proteine für die eukaryotische Zelle aber weitgehend unklar, und gerade die Unterschiedlichkeit der aufgezählten Hinweise macht auch die Frage nach Gemeinsamkeiten von UBX-Proteinen interessant.

2.4. Zielsetzung der Arbeit

Bislang sind nur wenige Vertreter aus der neu beschriebenen Familie der UBX-Domänen-Proteine charakterisiert worden, bei vielen handelt es sich um hypothetische Proteine. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, sowohl allgemeine Eigenschaften als auch spezifische zelluläre Funktionen von UBX-Proteinen im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* aufzuklären.

Da das UBX-Protein p47 ein Interaktor der AAA-ATPase Cdc48/p97 ist, sollte zunächst getestet werden, ob die Bindung an Cdc48 eine allgemeine Eigenschaft von UBX-Proteinen darstellt und welche Rolle die UBX-Domäne dabei spielt.

Weiterhin wurde aufgrund der Existenz von Ubiquitin-bindenden Domänen vermutet, dass einige UBX-Proteine Komponenten von Ubiquitin-vermittelten Prozessen sein könnten. Diese UBA/UBX-Proteine sollten daher auf eine Beteiligung am Abbau zellulärer Proteine untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Charakterisierung von UBX-Proteinen

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt sieben Proteine mit einer UBX-Domäne, die vier der fünf Unterfamilien von UBX-Proteinen zugeordnet werden können (Abb. 6). Abgesehen von der nur in Säugern vorkommenden Rep-8 Familie konnten also Vertreter aus allen UBX-Untergruppen untersucht werden. Sechs UBX-Proteine waren bislang nur als offene Leserahmen annotiert und wurden mit Ubx2 bis Ubx7 bezeichnet (Abb. 6). Bereits beschrieben war das p47-Orthologe Shp1 (**S**uppressor of **h**igh-copy **p**hosphatase“), bei einem genetischen Screen führten Mutationen im *SHP1*-Gen zur Suppression einer letal erhöhten Phosphatase-Aktivität von Glc7 (Zhang *et al.*, 1995). Zudem wurde auch die Bindung von Shp1 an Cdc48, das p97 Orthologe der Hefe, bestätigt (Braun *et al.*, 2002; R. Albang, A. Buchberger, persönliche Mitteilung).

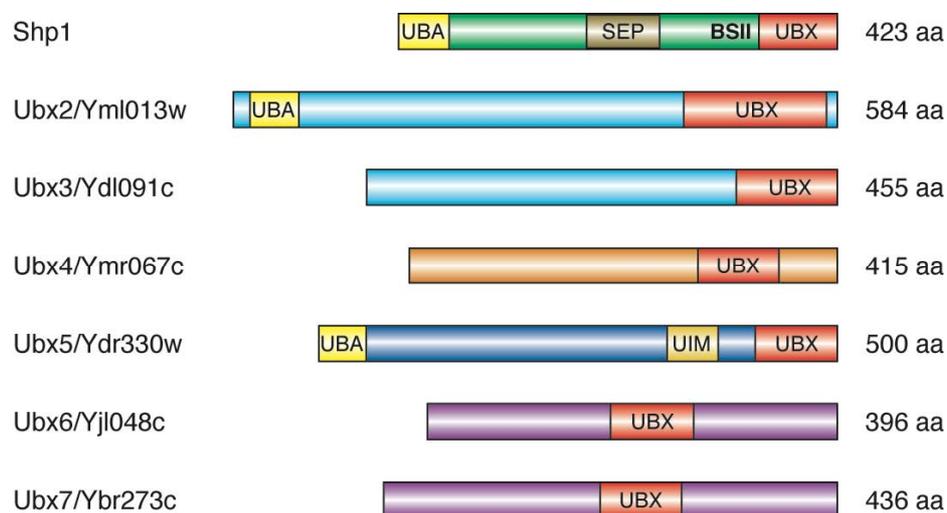


Abb. 6: UBX-Proteine der Hefe. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt Vertreter aus 4 der 5 Unterfamilien von UBX-Proteinen (Buchberger *et al.*, 2001). Homologien außerhalb der UBX-Domäne sind durch eine ähnliche Farbgebung markiert. Grün: p47-Gruppe; Blau: FAF1-Gruppe; Orange: Rest-Gruppe; Lila: Y33K-Gruppe. Identifizierte bzw. vorhergesagte Domänen für die UBX-Proteine: UBA, **U**biquitin-associated-Domäne; UIM, **U**biquitin-interacting **m**otif“; UBX, **U**biquitin regulatory **X**“-Domäne; SEP, **S**hp1 **e**yc **p**47“-Domäne. Eine zweite Cdc48-Bindestelle in Shp1 (siehe auch 3.1.1) ist mit BSII bezeichnet.

3.1.1 Alle UBX-Proteine der Hefe interagieren mit Cdc48

Ausgehend von der bekannten Interaktion des UBX-Proteins p47 mit p97, die über ein die UBX-Domäne enthaltendes, C-terminales Fragment von p47 erfolgte (Yuan *et al.*, 2001), stellte sich zunächst die Frage, ob UBX-Proteine allgemein Bindungspartner von Cdc48/p97 sein könnten. Dazu wurden die UBX-Proteine der Hefe in gerichteten Hefe-Zwei-Hybrid Experimenten auf die Interaktion mit Cdc48 und weiteren AAA-ATPasen getestet. Alle sieben Proteine interagierten mit Cdc48 (Abb. 7a), nicht jedoch mit den AAA-ATPasen Sec18 (NSF), Afg2, Pex6 oder Vps4 (Daten nicht gezeigt).

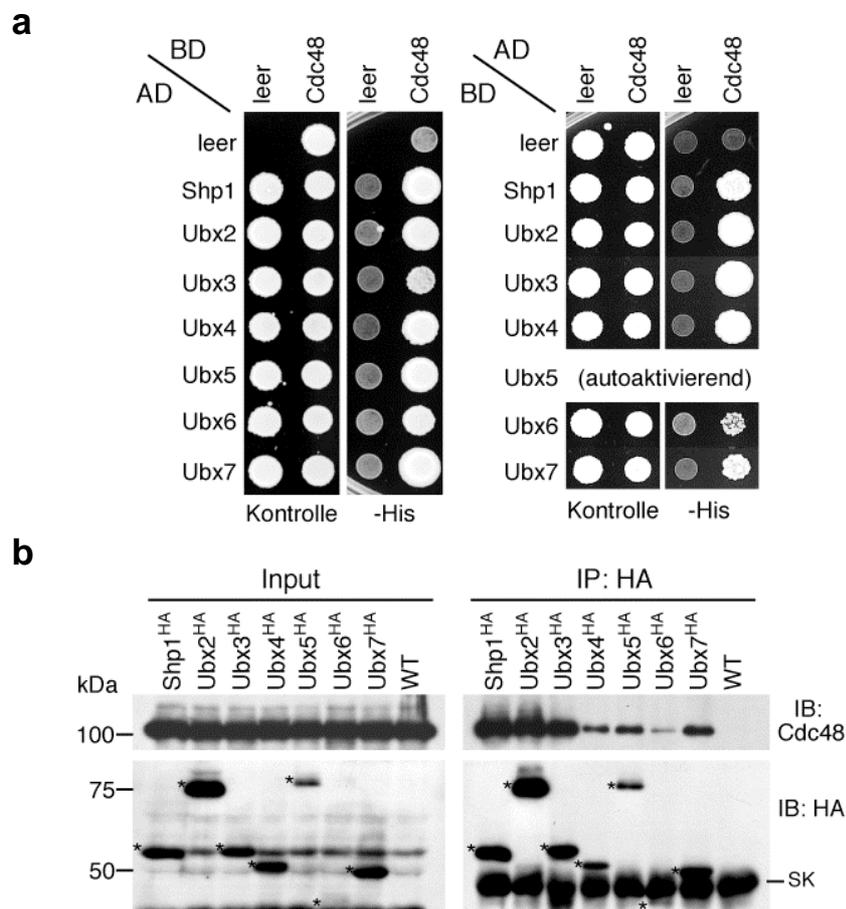


Abb. 7: Alle UBX-Proteine der Hefe interagieren mit Cdc48. **a.** Hefe-Zwei-Hybrid Experimente mit Kombinationen von Fusionsproteinen bestehend aus der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) oder -Bindedomäne (BD) fusioniert an Cdc48 bzw. die angegebenen UBX-Proteine. Wachstum auf der Selektionsplatte SC-Leu-Trp-His (-His) zeigt eine Interaktion der getesteten Proteine an. **b.** Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit chromosomal 3HA-epitopmarkierten UBX-Proteinen. Die UBX-Proteine wurden durch anti-HA Antikörper aus Lysaten der entsprechenden Hefestämme gefällt und die Präzipitate im anti-HA und anti-Cdc48 Immunoblot (IB) analysiert. Der Input zeigt 1% der eingesetzten Proteinmenge, SK markiert die Schwereketten des Antikörpers. Die Sternchen kennzeichnen die sieben Ubx^{HA} Proteine.

Um die Bindung an Cdc48 zu verifizieren, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit chromosomal 3HA-epitopmarkierten UBX-Proteinen durchgeführt. In allen Ansätzen mit den gefällten UBX-Proteinen konnte Cdc48 im Immunblot nachgewiesen werden und somit die Bindung an Cdc48 bestätigt werden (Abb. 7b). Zusammengenommen wurden damit UBX-Proteine als neue Familie von Cdc48-Kofaktoren identifiziert.

Um die Rolle der UBX-Domäne bei der Interaktion genauer zu untersuchen, sollten verschiedene Proteinkonstrukte auf eine Bindung von Cdc48 überprüft werden. Zur Deletion der UBX-Domäne wurden UBX-Proteine mit Lokalisation der Domäne am extremen C-Terminus gewählt, da bei diesen das Entfernen den geringsten Einfluss auf die Proteinstruktur haben sollte. Es wurden C-terminal verkürzte Versionen von Shp1, Ubx2, Ubx3 und Ubx5 hergestellt und in Hefe-Zwei-Hybrid Experimenten auf die Interaktion mit Cdc48 getestet. In allen Fällen führte das Fehlen der UBX-Domäne zu einem Verlust des Signals auf der SC-Ade-Selektionsplatte, auf der weniger stringente SC-His-Platte war ein Wachstum nur bei der Kombination Cdc48-Shp1^{ΔUBX} zu beobachten (Abb. 8a). Für die stabile Bindung an Cdc48 wird die UBX-Domäne also generell benötigt, wenngleich auch Shp1^{ΔUBX} mit Cdc48 zu einem gewissen Grad interagieren konnte (Abb. 8a, b). Verantwortlich dafür ist eine zweite Cdc48-Bindestelle N-terminal von der UBX-Domäne (BSII, siehe auch Abb. 6), die bereits im Shp1-orthologen p47 identifiziert wurde (Yuan *et al.*, 2001; Uchiyama *et al.*, 2002). Die Mutation dieses Motivs in Shp1^{ΔUBX} führte zu einem vollständigen Verlust der Cdc48-Bindung (A. Neves, Master Thesis 2005).

In komplementären Experimenten wurde die Bindung der isolierten UBX-Domänen von Shp1 und Ubx2 bis Ubx7 an Cdc48 untersucht. Für die UBX-Domänen von Shp1, Ubx5 und Ubx7 konnte eine Interaktion mit Cdc48 festgestellt werden (Abb. 8c). Die negativen Ergebnisse bei den restlichen Ansätzen könnten auf eine Instabilität der getesteten UBX-Domänen-Konstrukte zurückzuführen sein, die im Immunblot nur schwach detektierbar waren (Daten nicht gezeigt). In GST-Bindungs-Experimenten *in vitro* konnte

zusätzlich eine Cdc48-Interaktion der UBX-Domäne von Ubx4 gezeigt werden (Schuberth *et al.*, 2004).

Die UBX-Domäne ist also für Ubx2, Ubx3 und Ubx5 notwendig, und im Falle von Shp1, Ubx4, Ubx5 und Ubx7 hinreichend für die Cdc48-Bindung. Sie kann damit als allgemeines Interaktionsmodul für Cdc48 bezeichnet werden. Diese Schlussfolgerung wird durch strukturelle Analysen des p97-p47 Komplexes unterstützt, bei der die wenigen, in UBX-Domänen stark konservierten Aminosäuren (Buchberger *et al.*, 2001) als p97-Kontaktstellen in p47 identifiziert wurden (Dreveny *et al.*, 2004).

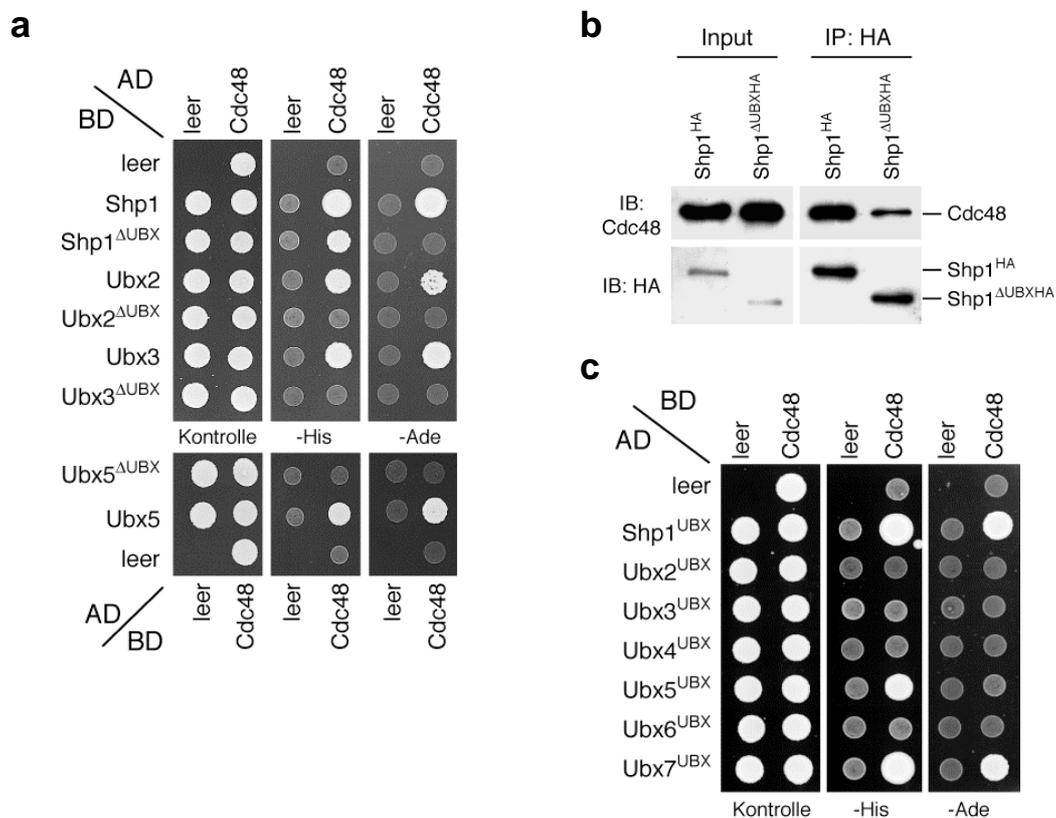


Abb. 8: Die UBX-Domäne vermittelt die Cdc48-Interaktion. **a, b.** Die Deletion der UBX-Domäne führt zum Verlust oder zu verminderter Cdc48-Bindung. **a.** Hefe-Zwei-Hybrid Experimente mit Volllängen und verkürzten UBX-Protein-Konstrukten und Cdc48 **b.** Ko-Immünpräzipitationsexperiment mit Shp1 und Shp1^{ΔUBX}. Chromosomal 3HA-epitopmarkiertes Shp1 bzw. Shp1^{ΔUBX} wurde durch anti-HA Antikörper aus Zelllysaten der entsprechenden Hefestämme gefällt und im Immunblot (IB) auf die Kopräzipitation von Cdc48 untersucht. **c.** Einige UBX-Domänen reichen für eine Interaktion mit Cdc48 aus. Hefe-Zwei-Hybrid Experimente mit isolierten UBX-Domänen und Cdc48 **a, c.** Wachstum auf den Selektionsplatten SC-Leu-Trp-His (-His) und SC-Leu-Trp-Ade (-Ade) zeigt eine Interaktion der getesteten Proteine an. Für die Domänengrenzen der verwendeten Kontrukte siehe 5.1.7.

Da die p47- bzw. Shp1-Interaktion mit der N-Domäne von p97/Cdc48 erfolgt (Uchiyama *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2003; Dreveny *et al.*, 2004; Rumpf und Jentsch, 2006), kann man davon ausgehen, dass diese Domäne auch die Bindestelle für die anderen UBX-Proteine in Cdc48 ist.

3.1.2 Interaktionen von UBX-Proteinen mit anderen Cdc48-Kofaktoren

Aufgrund der hexameren Struktur von Cdc48 wären prinzipiell sechs N-Domänen eines Komplexes zugänglich, um Ufd1-Npl4 oder eines der UBX-Proteine zu binden. Die sich wechselseitig ausschließende Bindung von p47 und Ufd1-Npl4 zeigt jedoch, dass die Bindestellen nicht frei kombinierbar besetzt werden können (Meyer *et al.*, 2000). Die gegenseitige Verdrängung ist dabei möglicherweise auf eine Homo-Oligomerisierung der Adaptoren zurückzuführen, die im Falle von p47/Shp1 über die SEP-Domäne zu erfolgen scheint (Yuan *et al.*, 2004).

Es stellte sich nun die Frage, ob auch die UBX-Proteine Ubx2 bis Ubx7 sich gegenseitig ausschließende Komplexe mit Cdc48 ausbilden, oder ob eine gleichzeitige Bindung mehrerer Adaptoren möglich ist. In Immunpräzipitationsexperimenten zeigte sich, dass Ubx2, Ubx3 und Ubx5 Cdc48-Komplexe kopräzipitierten, die gleichzeitig Ufd1 enthielten (Abb. 9a). Ubx6 und Ubx7 hingegen konnten zusätzlich zu Cdc48 auch Shp1 mitfällern (Abb. 9a). Die Spezifität dieser Interaktionen wird durch interne Kontrollen des Experiments unterstrichen. Bei der Immunpräzipitation von Shp1 wurde wie erwartet kein Ufd1 detektiert, ebenso fehlte das Signal für Ubx2. Auch wurde Shp1 nicht von den Ufd1-Interaktoren Ubx2, Ubx3 und Ubx5 präzipitiert, während in den Ansätzen mit Ubx6 und Ubx7 kein Ufd1 nachweisbar war. Interessanterweise zeigten Ubx3 und Ubx5 auch eine Interaktion mit Ubx2, ein Hinweis, dass manche Cdc48-Komplexe neben Ufd1 sogar mehrere UBX-Proteine binden können. Für Ubx4 wurde keine Bindung an die getesteten Kofaktoren gefunden, eine endgültige Aussage lässt sich allerdings aufgrund der geringen Menge an kopräzipitiertem Cdc48 nicht treffen.

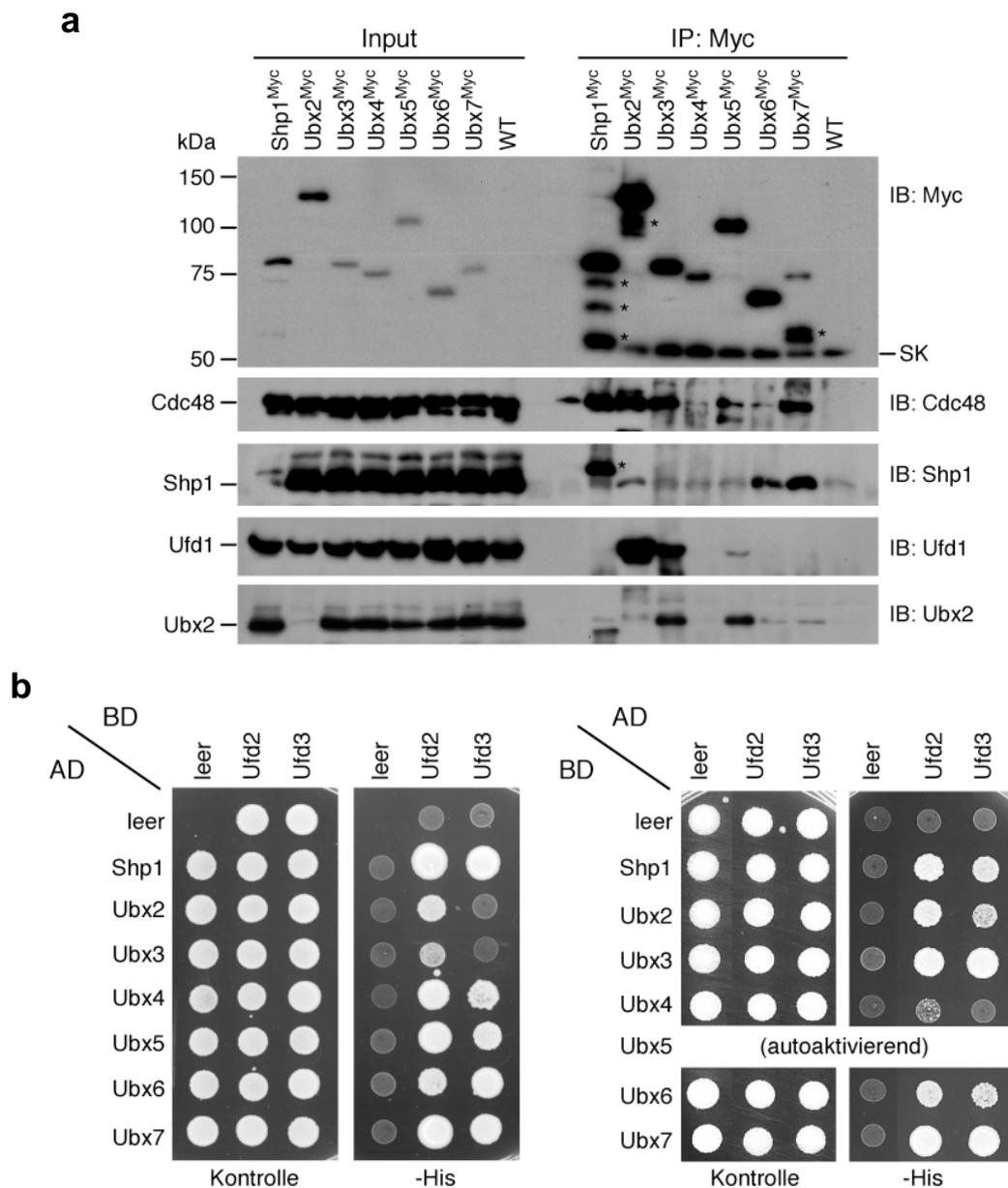


Abb. 9: Interaktion von UBX-Proteinen mit anderen Cdc48-Kofaktoren. **a.** N-terminal bindende Kofaktoren können miteinander interagieren. Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit chromosomal 9Myc-epitopmarkierten UBX-Proteinen. Die Proteine wurden durch anti-Myc Antikörper aus Lysaten der entsprechenden Hefestämme gefällt und die Präzipitate in Immunblots (IB) mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Der Input zeigt 1% der eingesetzten Proteinmenge, SK markiert die Schwereketten des Antikörpers. Die Sternchen kennzeichnen jeweils Abbauprodukte des Myc-markierten UBX-Proteins. **b.** Alle UBX-Proteine interagieren mit Ufd2 und Ufd3. Hefe-Zwei-Hybrid Experimente mit Kombinationen von Fusionsproteinen bestehend aus der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) oder -Bindedomäne (BD) fusioniert an Ufd2 oder Ufd3 bzw. die angegebenen UBX-Proteine. Wachstum auf der Selektionsplatte SC-Leu-Trp-His (-His) zeigt eine Interaktion der getesteten Proteine an.

Die meisten UBX-Proteine sind also in der Lage, zusätzlich zu den sich wechselseitig ausschließenden Adaptoren Shp1 oder Ufd1-Npl4 an Cdc48 zu binden. Die Ausbildung von reinen Cdc48-Komplexen mit nur einem einzelnen der Proteine Ubx2 bis Ubx7 ist damit zwar nicht ausgeschlossen, wahrscheinlicher ist jedoch, dass diese UBX-Proteine als Kofaktoren für Cdc48^{Shp1} oder Cdc48^{Ufd1-Npl4} wirken.

Neben den N-terminal bindenden Kofaktoren wurden zwei Cdc48-Interaktoren identifiziert, die an dessen AAA-Domänen binden, Ufd2 und Ufd3 (Ghislain *et al.*, 1996; Koegl *et al.*, 1999; Richly *et al.*, 2005; Rumpf und Jentsch, 2006). Sie erfüllen keine Adaptorfunktion, sondern sind für die weitere Prozessierung der rekrutierten Substrate wichtig. In Hefe-Zwei-Hybrid Experimenten interagierten alle UBX-Proteine mit Ufd2 und Ufd3 in zumindest einer der getesteten Kombinationen (Abb. 9b). Die gleichzeitige Bindung an endogenes Cdc48, die diesen Interaktionen vermutlich zugrunde liegt, ist aufgrund der unterschiedlichen Bindestellen von UBX-Proteinen (N-Domäne) und Ufd2 bzw. Ufd3 (D1D2-Domäne) ohne gegenseitige Störung möglich.

UBX-Proteine ermöglichen somit die Ausbildung einer Vielzahl von Cdc48-Komplexen, die möglicherweise zur Unterscheidung der diversen Cdc48-Funktionen benötigt werden. Überraschend dabei ist, dass UBX-Proteine wahrscheinlich keine eigenständigen Cdc48^{UBX} Komplexe ausbilden, sondern vielmehr in Kombination mit anderen Kofaktoren den Cdc48-Komplex modellieren.

3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von UBX-Proteinen

Die Interaktionen mit Cdc48 und seinen Kofaktoren lassen schlussfolgern, dass UBX-Proteine an Cdc48-abhängigen Prozessen beteiligt sind. Um die Auswahl an möglichen Funktionen für die einzelnen UBX-Proteine weiter einschränken zu können, wurden sowohl Lokalisationsstudien durchgeführt, als auch Nullmutanten der *UBX*-Gene analysiert (siehe Abschnitt 3.1.4).

Die subzelluläre Lokalisation wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen 9Myc-epitopmarkierte UBX-Proteine bestimmt (Abb. 10a). Als Referenzen wurden der Zellkern mit DAPI angefärbt und das

Endoplasmatisches Retikulum (ER) durch Immunfluoreszenz gegen die Translokon-Untereinheit Sec61 detektiert.

Weiterhin wurden Zellfraktionierungen durchgeführt, die zur Abtrennung der löslichen Proteine von Membran-assoziierten Proteinen führten (Abb. 10b). Das Pellet der 20 000 g Fraktion (P20) enthält dabei größere Membranstrukturen wie das ER oder die Plasmamembran. Zentrifugiert man den erhaltenen Überstand (S20) bei 100 000 g, kann man kleinere Membranstrukturen wie Vesikel von den restlichen löslichen Komponenten abtrennen (P100, S100). Das ER-membranständige Protein Dpm1 diente bei diesen Versuchen als Markerprotein.

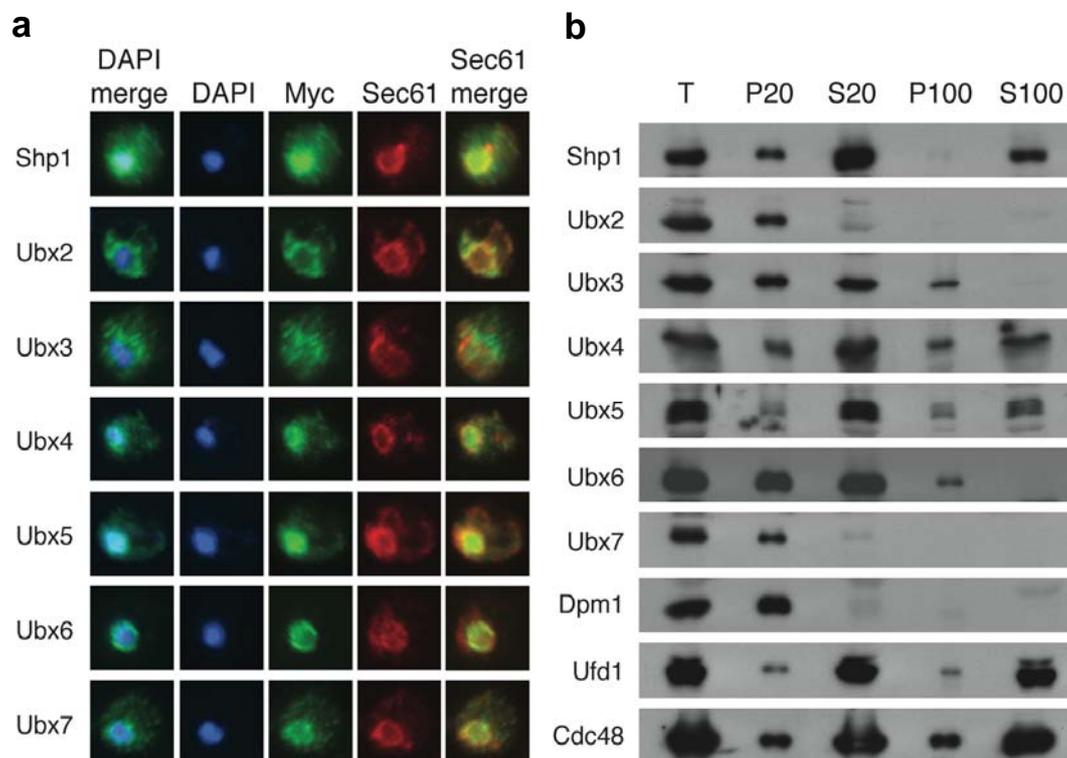


Abb. 10: Subzelluläre Lokalisation der UBX-Proteine **a.** Hefestämme mit 9Myc-epitopmarkierten UBX-Proteinen wurden fixiert und das angegebene Protein durch indirekte anti-Myc Immunfluoreszenz detektiert. Zum Vergleich wurde parallel eine Immunfluoreszenz mit anti-Sec61 Antikörper durchgeführt und die DNA mit DAPI gefärbt. **b.** Membran-Fractionen wurden aus Zelllysaten von Wildtyp oder 9Myc-epitopmarkierten Hefestämmen (Ansätze Ubx3, Ubx6 und Ubx7) isoliert. Das Gesamtlisat (T) wurde durch Zentrifugation bei niedriger Beschleunigung (20 000 g) in eine lösliche (S20) und Membran-assoziierte Fraktion (P20) aufgetrennt. Der lösliche Überstand wurde durch Zentrifugation bei 100 000 g nochmals in eine lösliche und eine Membran-enthaltende Fraktion aufgespalten (S100 und P100). Gleiche Mengen der erhaltenen Fraktionen wurden anschließend im Immunblot auf die angegebenen Proteine hin untersucht.

Ein Zusammenfassung der Ergebnisse für die einzelnen UBX-Proteine gibt Tabelle 1. Shp1 war in der Immunfluoreszenz an der Kernmembran bzw. dem ER und im Zellkern detektierbar. Konsistent mit dieser Lokalisation konnte Shp1 sowohl in den löslichen Fraktionen S20 und S100 (Zellkern), als auch in der P20 Membran-Fraktion (ER) nachgewiesen werden. Ubx2 und Ubx7 waren fast ausschließlich an der Kernmembran/ER lokalisiert und sind wahrscheinlich Membranproteine. Ubx3 war ebenfalls Membran-assoziiert und sowohl in kleineren als auch in größeren Membranstrukturen zu finden. Die Immunfluoreszenz deutete dabei auf Vesikel oder den Golgi-Apparat hin. Ubx6 zeigte eine ähnliche Aufteilung bei der Fraktionierung wie Ubx3, war in der Immunfluoreszenz aber eher der Kernmembran/ER zuzuordnen. Ubx4 konnte in allen Fraktionen detektiert werden, in der Immunfluoreszenz war eine Überlappung mit der DAPI-Färbung und möglicherweise dem Sec61 Signal zu beobachten. Ubx5 war im Gegensatz zu den anderen UBX-Proteinen nur in den löslichen Fraktionen zu finden. Mit den Daten der Immunfluoreszenz ergab sich eine Lokalisation ausschließlich im Zellkern.

Aus diesen Analysen kann man mehrere interessante Schlussfolgerungen ziehen. Erstens scheinen die UBX-Proteine ihre Funktionen an verschiedenen Organellen bzw. Zellstrukturen auszuüben. Zweitens überlappen sich die Lokalisationen der UBX-Proteine - abgesehen möglicherweise von Ubx3 - mit der von Cdc48, welches in Immunfluoreszenzen hauptsächlich an der Kernmembran/ER und im Zellkern gefunden wurde (Latterich *et al.*, 1995; Madeo *et al.*, 1998). Im Unterschied zu Shp1 war Cdc48 jedoch auch mit kleineren Membranstrukturen assoziiert (Abb. 10b), die den punktierten Strukturen des Ubx3-Signals in der Immunfluoreszenz entsprechen könnten. Drittens zeigen die UBX-Proteine mit Ausnahme von Ubx4 eine eingeschränktere Lokalisation im Vergleich zu Cdc48, beispielsweise Ubx2 und Ubx7 nur an der Kernmembran/ER oder Ubx5 im Zellkern. Dies unterstreicht die mögliche Bedeutung der UBX-Proteine als Funktions-spezifizierende Kofaktoren für Cdc48. Ufd1 als Hauptadaptor für den Cdc48-vermittelten Proteinabbau lokalisierte hingegen vollständig überlappend mit Cdc48 im Zellkern und an der Kernmembran

(Rape *et al.*, 2001), und wurde ebenfalls in allen Fraktionen detektiert (Abb. 10b).

3.1.4 Phänotypen von Δubx Nullmutanten

Um die Bedeutung der einzelnen UBX-Proteine für die Hefezellen zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten je eines *UBX*-Gens hergestellt und phänotypisch charakterisiert. Alle sieben Δubx Mutanten sind lebensfähig. Bei Wachstumstests auf YPD-Platten unter verschiedenen Stressbedingungen zeigten $\Delta ubx3$, $\Delta ubx5$, $\Delta ubx6$ und $\Delta ubx7$ Stämme keine Unterschiede zum Wildtyp, für $\Delta shp1$, $\Delta ubx2$ und $\Delta ubx4$ Mutanten waren allerdings Effekte zu beobachten (Abb. 11a). Der $\Delta shp1$ Stamm zeigte ein verlangsamtes Wachstum und die Zellen waren sensitiv gegenüber allen getesteten Stressbedingungen. Für $\Delta ubx2$ Zellen konnte man eine Sensitivität gegenüber Cadmium, Cycloheximid und dem Aminosäureanalog p-Fluorophenylalanin im Medium feststellen, sowie einen leichten ts(temperatur-sensitiven)-Phänotyp. Dieser war besonders bei frisch konstruierten $\Delta ubx2$ Stämmen zu beobachten und wurde von Generation zu Generation schwächer (vgl. auch mit Abb. 14). $\Delta ubx4$ Zellen waren sensitiv gegenüber Cycloheximid. Dieser Defekt hing interessanterweise nicht von der Menge an freiem Ubiquitin ab, wie dies für $\Delta ufd3$ Stämme und Mutanten des Deubiquitinierungsenzyms Ubp6 gefunden wurde (Hanna *et al.*, 2003; Rumpf und Jentsch, 2006). Eine verstärkte, ektopische Ubiquitin-Expression konnte die Sensitivität der $\Delta ubx4$ Mutante nicht retten (Daten nicht gezeigt).

Abgesehen von den direkt an der Stressantwort beteiligten Genen zeigen besonders Mutanten des Ubiquitin/Proteasom-Systems beeinträchtigtes Wachstum bei Bedingungen wie erhöhter Temperatur oder Zugabe von Aminosäure-Analoga zum Medium, die zu einer erhöhten Menge an falsch gefalteten Proteinen führen (Finley *et al.*, 1987; Seufert und Jentsch, 1990). Möglicherweise weisen die beobachteten Sensitivitäten von $\Delta shp1$ und $\Delta ubx2$ Stämmen also auf eine Beteiligung von Shp1 und Ubx2 am Proteinabbau hin.

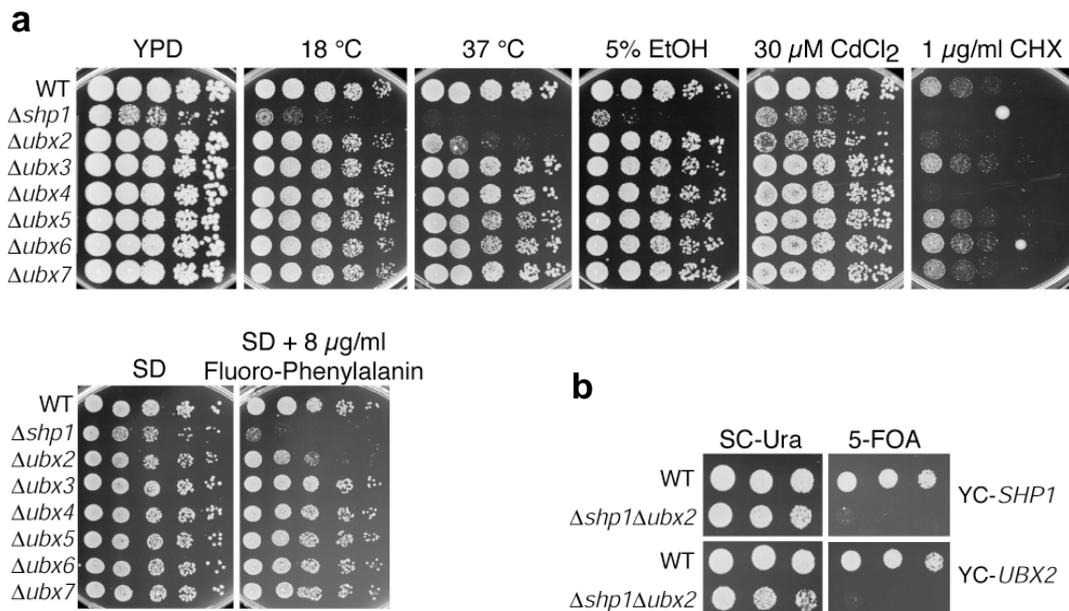


Abb. 11: Phänotypen von Δubx Nullmutanten und genetische Interaktion von *SHP1* und *UBX2*. **a.** Wachstum der Nullmutanten unter Stressbedingungen. Die angegebenen Hefestämme wurden in serieller Verdünnung auf YPD- und SD-Platten mit oder ohne Zusätze ausplattiert und für 3-4 Tage bei 30 °C oder der angegebenen Temperatur inkubiert. **b.** $\Delta shp1\Delta ubx2$ Doppelmutanten sind nicht lebensfähig. Nach einer Kreuzung der Einzelmutanten sind chromosomal deletierte $\Delta shp1\Delta ubx2$ Stämme nur dann lebensfähig, wenn sie ein Shp1 oder Ubx2 exprimierendes Plasmid enthalten. Bei Selektion gegen das Ura-Plasmid auf 5-FOA-Platten können die Zellen nicht mehr wachsen.

Um genetische Interaktionen zu testen, wurden verschiedene Doppelmutanten von *UBX*-Genen hergestellt. Viele der konstruierten Hefestämme waren lebensfähig (Daten nicht gezeigt): alle $\Delta ubx2$ Mutanten in Kombination mit Nullmutanten der Gene *UBX3* bis *UBX7*, sowie die Doppelmutanten $\Delta shp1\Delta ubx6$, $\Delta shp1\Delta ubx7$, $\Delta ubx3\Delta ubx5$, $\Delta ubx3\Delta ubx7$, $\Delta ubx4\Delta ubx5$, $\Delta ubx4\Delta ubx6$, $\Delta ubx4\Delta ubx7$ und $\Delta ubx5\Delta ubx7$.

Die Deletion von *SHP1* in Verbindung mit *UBX2* ist jedoch synthetisch letal. $\Delta shp1\Delta ubx2$ Stämme konnten nur konstruiert werden, wenn Shp1 oder Ubx2 extra-chromosomal von einem Plasmid exprimiert wurde. Bei Selektion gegen das Plasmid auf 5-FOA-Platten war die Doppelmutante nicht mehr lebensfähig (Abb. 11b). Daraus lässt sich folgern, dass Shp1 und Ubx2 in unterschiedlichen Cdc48-abhängigen Prozessen wirken, was auch durch die Interaktionsdaten nahe gelegt wurde (Abschnitt 3.1.2). Zudem scheinen Shp1 und Ubx2, auch aufgrund der Phänotypen der Einzelmutanten, eine größere

Bedeutung für die Lebensfähigkeit der Zellen zu besitzen als andere UBX-Proteine.

Die Daten zur allgemeinen Charakterisierung der UBX-Proteine sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Neben der Cdc48-Interaktion, der Zuordnung zu bestimmten Cdc48-Komplexen und den Analysen zur subzellulären Lokalisation wurden Hinweise für Funktionen von - zumindest einigen - UBX-Proteinen beim Proteinabbau gefunden. Besonders die UBX-Proteine mit einer UBA-Domäne sollten in dieser Hinsicht nun genauer untersucht werden.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Charakterisierung der UBX-Proteine von *Saccharomyces cerevisiae*

	Cdc48^{Shp1} -Bindung	Cdc48^{Ufd1-Npl4} -Bindung	Lokalisation	Nullmutanten- Phänotyp
Shp1	+ ^a	-	Zellkern, Kernmembran/ER; löslich und P20	cs, ts, Cd-, CHX-, EtOH- p-Fluorophe-sensitiv
Ubx2	-	+	Kernmembran/ER; P20	Cd-, CHX-, p-Fluorophe-sensitiv
Ubx3	-	+	Vesikel (?); P20 und P100	kein Phänotyp ^b
Ubx4	-	-	Zellkern, Kernmembran/ER; löslich, P20, P100	CHX-sensitiv
Ubx5	-	+	Zellkern, löslich	kein Phänotyp ^b
Ubx6	+	-	Kernmembran/ER, P20 und P100	kein Phänotyp ^b
Ubx7	+	-	Kernmembran/ER; P20	kein Phänotyp ^b

^a Das Plus bezieht sich auf die beschriebene Homo-Oligomerisierung von p47, sowie für Shp1 auf die Interaktion mit sich selbst im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment (Daten nicht gezeigt).

^b Kein sichtbarer Phänotyp unter den getesteten Bedingungen.

3.2. UBA/UBX-Proteine besitzen Funktionen in Cdc48-vermittelten Proteinabbauwegen

3.2.1 UBX-Proteine mit UBA-Domäne

Als UBX-Proteine mit “Ubiquitin-associated” (UBA)-Domäne waren aus *Saccharomyces cerevisiae* Shp1 und Ubx5 identifiziert worden (Suyama *et al.*, 2000; Buchberger *et al.*, 2001). Eine PSI-BLAST Suche mit der Sequenz der UBA-Domäne von Shp1 ergab, dass auch Ubx2 und dessen Homologe eine N-terminale UBA-Domäne enthalten (Abb. 12). Die abgeleitete Konsensus-Sequenz zeigte im Vergleich zu den UBA-Domänen von Rad23 einige Unterschiede, weswegen die UBA-Domänen der UBX-Proteine in eine Untergruppe der “varianten” UBA-Domänen zusammengefasst wurden.

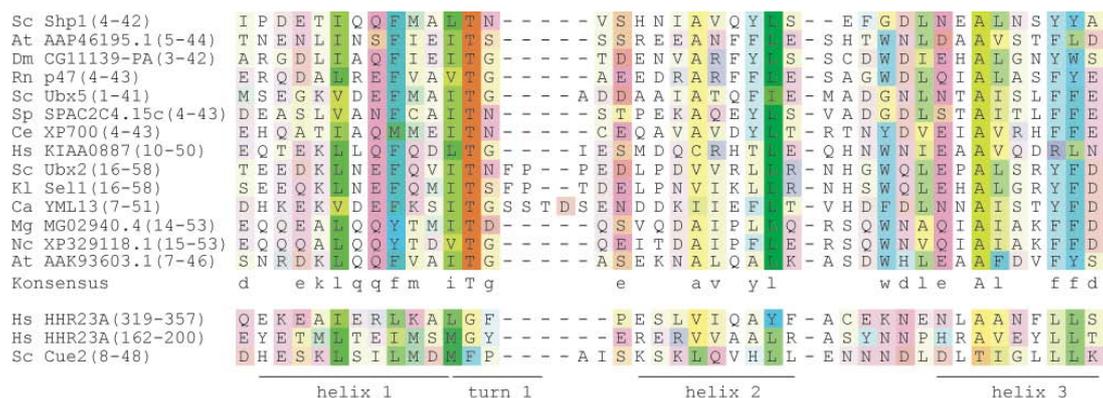


Abb. 12: UBX-Proteine mit einer varianten UBA-Domäne. Der Sequenzvergleich zeigt eine Auswahl an UBA-Domänen aus UBX-Domänen-Proteinen verschiedener Spezies, die bei einer PSI-BLAST Suche mit der UBA-Domäne von Shp1 identifiziert wurden. Zum Vergleich mit der Konsensus-Sequenz der varianten UBA-Domäne sind die Abfolgen der Aminosäurereste der beiden UBA-Domänen von humanem Rad23 (HHR23A und HHR23B) sowie der verwandten CUE-Domäne von Cue2 angegeben. Die Aminosäurereste wurden nach Taylor farbig markiert. Weiterhin sind unterhalb des Sequenzvergleichs die charakteristischen Sekundärstruktur-Elemente aus bereits bekannten UBA-Domänen Strukturen eingezeichnet. Abkürzungen: Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; At, *Arabidopsis thaliana*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Rn, *Rattus norvegicus*; Sp *Schizosaccharomyces pombe*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Hs, *Homo sapiens*; Kl, *Kluyveromyces lactis*; Ca, *Candida albicans*; Mg, *Magnaporthe grisea*; Nc, *Neurospora crassa*.

Für das Shp1-Orthologe p47 wurde die Bindung an Ubiquitin über die UBA-Domäne direkt gezeigt (Meyer *et al.*, 2002). Um die Funktionalität der UBA-Domänen von Shp1, Ubx2 und Ubx5 zu überprüfen, wurden im Hefe-Zwei-Hybrid System Bindungsstudien mit linearen Ubiquitin-Fusions-

konstrukten durchgeführt (Abb. 13a). In allen Fällen war eine Interaktion der jeweiligen UBA-Domäne mit dem 4xUb-Konstrukt zu beobachten, die UBA-Domäne von Ubx2 interagiert auch mit dem kürzeren 2xUb-Konstrukt. Die Bindung der UBA-Domäne von Shp1 an eher längere Ubiquitinketten steht zwar im Widerspruch zu der für p47 vorgeschlagenen Präferenz der Mono-Ubiquitin-Bindung (Meyer *et al.*, 2002), allerdings erschweren die unterschiedlichen Versuchssysteme einen konkreten Vergleich der Ergebnisse. Auf jeden Fall können die UBA-Domänen von Shp1, Ubx2 und Ubx5 aber klar als Ubiquitin-bindend bezeichnet werden.

Um die Vollängen-Proteine auf ihre Fähigkeit zur Bindung ubiquitiniertes Proteine *in vivo* zu testen, wurden Immunpräzipitationsexperimente mit Shp1^{HA}, Ubx2^{HA} und Ubx5^{HA} exprimierenden Stämmen durchgeführt und die Präzipitate anschließend mit einem anti-Ubiquitin Antikörper analysiert. Der in Ansätzen mit Shp1^{HA} und Ubx2^{HA} stark immunreaktive "Schmier" im Bereich der Molekulargewichte von 75 kDa und größer deutete auf eine Bindung von Ubiquitinkonjugaten durch Shp1 und Ubx2 hin (Abb. 13b). Für Ubx5^{HA} war das Signal zwar weniger stark, möglicherweise aufgrund der geringeren Menge an präzipitiertem Ubx5, trotzdem aber spezifisch vorhanden.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem detektierten Ubiquitin-"Schmier" nur um ubiquitinierte Formen der gefällten UBX-Proteine handelte - die allerdings im anti-HA Immunblot nicht zu detektieren gewesen waren (nicht gezeigt) - wurden weitere Experimente mit Stämmen durchgeführt, die zusätzlich N-terminal Myc-epitopmarkiertes Ubiquitin exprimierten. In diesen Ansätzen wurden Ubiquitinkonjugate mittels anti-myc Antikörper aus Zelllysaten immunpräzipitiert und auf die Anwesenheit von Shp1^{HA}, Ubx2^{HA} und Ubx5^{HA} getestet (Abb. 13c-e). Die klare Kopräzipitation der unmodifizierten UBX-Proteine belegt deren Affinität für ubiquitinierte Proteine *in vivo*.

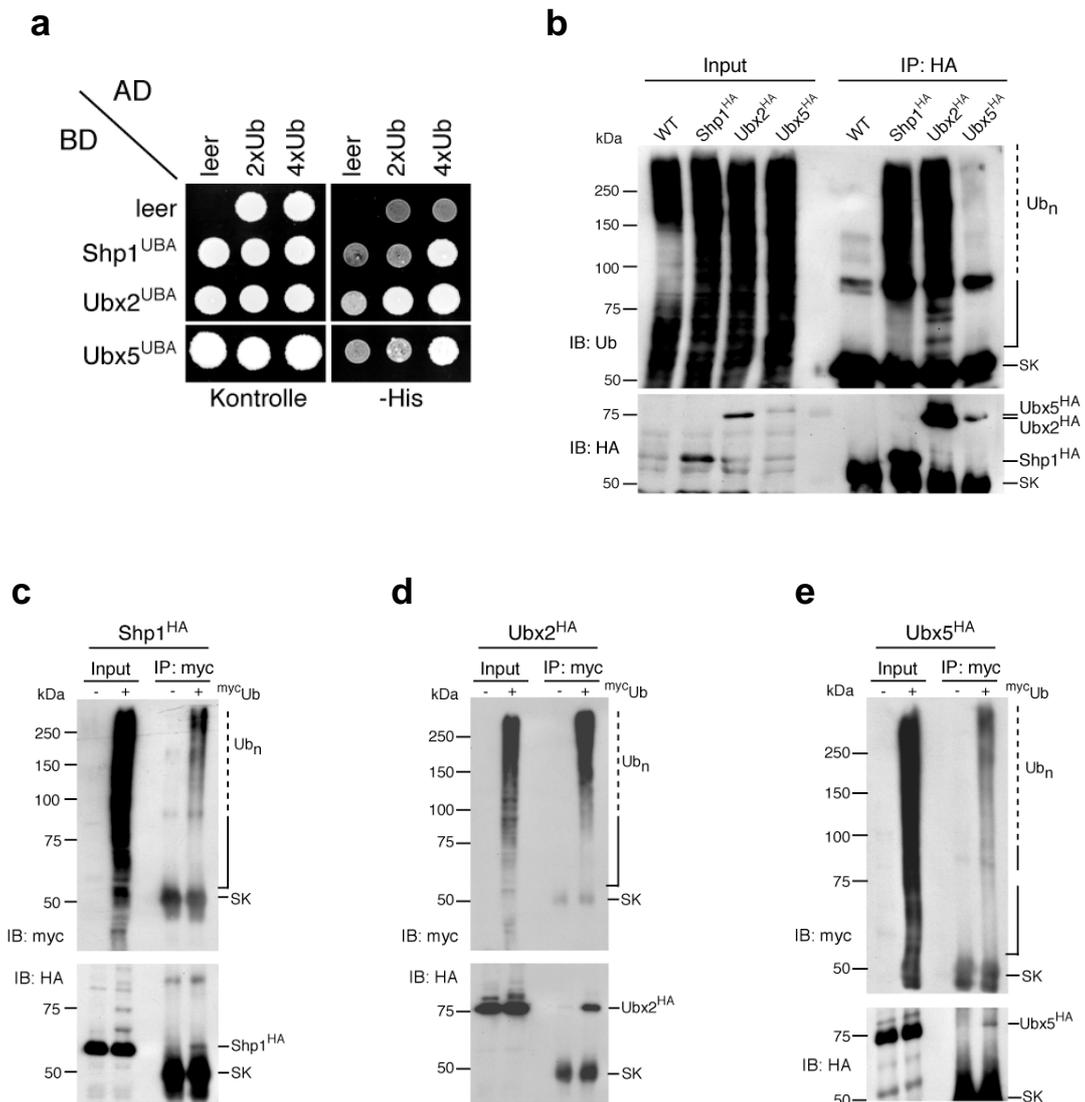


Abb. 13: Ubiquitin-Interaktionen von varianten UBA-Domänen und UBA/UBX-Proteinen.
a. Hefe-Zwei-Hybrid Experimente mit isolierten UBA-Domänen von Shp1, Ubx2 und Ubx5 und Konstrukten mit zwei oder vier linear aneinander fusionierten Ubiquitinresten. In allen Ubiquitin-Einheiten wurden die Lysine K29, K48 und K63 zu Arginin mutiert, sowie die C-terminalen Glycinreste zu Valin mutiert bzw. im letzten Ubiquitinrest deletiert, um die Ausbildung von Ubiquitinketten zu unterbinden. **b.** Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit 3HA-epitopmarkiertem Shp1, Ubx2 und Ubx5. Die UBX-Proteine wurden durch anti-HA Antikörper aus Zelllysaten der entsprechenden Stämme gefällt und die Präzipitate im anti-Ubiquitin Immunblot untersucht. **c-e.** Die in b verwendeten Stämme wurden mit einem Myc-epitopmarkiertem Ubiquitinkonstrukt transformiert und ^{Myc}Ubiquitinkonjugate durch anti-Myc Antikörper aus Lysaten der angegebenen Stämme isoliert. Anschließend wurde die Anwesenheit der UBX-Proteine im anti-HA Immunblot getestet.

3.2.2 Shp1 und Ubx2 sind am Proteinabbau beteiligt

Aufgrund der Molekulargewichte der kopräzipitierten Ubiquitinkonjugate ist von einer Bindung von Shp1 und Ubx2 auch an multi-ubiquitinierte Proteine auszugehen (Abb. 13). Dies lässt eine Beteiligung dieser UBX-Proteine am Proteinabbau vermuten, da längere Ubiquitinketten ein modifiziertes Protein in der Regel für den proteasomalen Abbau markieren. Zudem gab die geringere Toleranz der Nullmutanten gegenüber Stressbedingungen, die zu erhöhten Mengen von falsch gefalteten Proteinen führen, bereits Hinweise auf Funktionen beim Proteinabbau (Abschnitt 3.1.4 und Abb. 14a). $\Delta shp1$ und $\Delta ubx2$ Mutanten zeigten außerdem stark synthetische Phänotypen in Kombination mit Mutanten der proteasomalen Untereinheit Rpn10, welche sowohl für die Assemblierung des 26S Proteasom-Komplexes, als auch für die Rekrutierung von Substraten wichtig ist (Deveraux *et al.*, 1994; Verma *et al.*, 2004). $\Delta shp1\Delta rpn10$ Stämme wuchsen bereits unter normalen Bedingungen äußerst langsam (Abb. 14a, YPD-Platte), $\Delta ubx2\Delta rpn10$ Mutanten tolerierten von den Stressbedingungen nur die erhöhte Temperatur, allerdings deutlich weniger gut als die Einzelmutanten (Abb. 14a). Die genetischen Interaktionen mit *RPN10* deuten ebenfalls auf eine Rolle von *SHP1* und *UBX2* beim proteasomalen Proteinabbau hin.

Um eine direkte Verbindung von Shp1 und Ubx2 zum Proteinabbau zu testen, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit dem Modellsubstrat Ubiquitin-Prolin- β Galaktosidase (Ub-P- β Gal) des "Ubiquitin-Fusion-Degradation" (UFD)-Abbauweges durchgeführt. Dieses Konstrukt besteht aus einer Ubiquitin-Einheit, die linear an den N-Terminus der bakteriellen β Galaktosidase fusioniert wurde (Bachmair *et al.*, 1986). Aufgrund des eingefügten Prolinrestes am C-Terminus kann der normalerweise schnell prozessierte Ubiquitin-Anteil nur langsam durch Ubiquitin-Hydrolasen abgespalten werden. Das exprimierte "mono-ubiquitinierte" Fusionsprotein wird in der Folge rasch multi-ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, wofür neben den UFD-Proteinen auch Cdc48 und Npl4 benötigt werden (Johnson *et al.*, 1995; Ghislain *et al.*, 1996; Rape *et al.*, 2001).

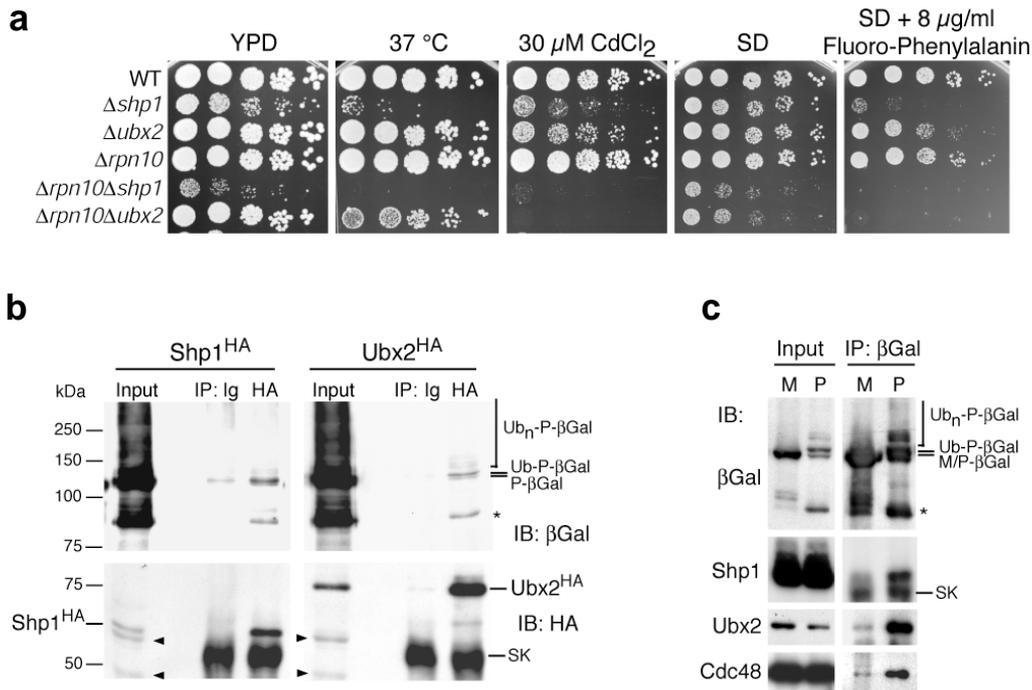


Abb. 14: Shp1 und Ubx2 zeigen Verbindungen zum proteasomalen Abbau. **a.** Genetische Interaktionen von *SHP1* und *UBX2* mit *RPN10*. Serielle Verdünnungen der angegebenen Stämme wurden auf YPD- und SD-Platten mit oder ohne Zusätze ausplattiert und für 3 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. **b.** Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit chromosomal 3HA-epitopmarkiertem Shp1 und Ubx2. Die *UBX*-Proteine wurden durch anti-HA-Antikörper aus Lysaten von Ub-P-βGal exprimierenden Hefestämmen gefällt und die Präzipitate im anti-βGal und anti-HA Immunoblot (IB) analysiert. Ig: Kontroll-Präzipitation mit unspezifischen Antikörpern. Die Pfeilköpfe markieren unspezifische Banden im anti-HA Immunoblot. **c.** Shp1 und Ubx2 interagieren wie Cdc48 nur mit ubiquitiniertem bzw. für den Abbau vorgesehenem βGal. M-βGal bzw. Ub-P-βGal wurden durch anti-βGal Antikörper aus Wildtyp Zelllysaten präzipitiert und auf die Anwesenheit von Shp1, Ubx2 und Cdc48 im entsprechenden Immunoblot untersucht. **b, c.** Der Input zeigt jeweils 1% der eingesetzten Proteinmenge, SK markiert die Schwereketten des Antikörpers. Die Sternchen kennzeichnen ein stabiles, charakteristisches Abbauprodukt von Ub-P-βGal.

In Immunpräzipitationsexperimenten mit HA-epitopmarkiertem Shp1 und Ubx2 konnte Ub-P-βGal im Präzipitat detektiert werden (Abb. 14b), zusätzlich sind schwach multi-ubiquitinierte Spezies zu erkennen. Wurde andererseits mittels anti-βGal Antikörper das Ub-P-βGal Substrat aus Zelllysaten gefällt, konnten sowohl Shp1 als auch Ubx2 kopräzipitiert werden (Abb. 14c). Dabei sind im Immunoblot gegen βGalaktosidase ebenfalls neben dem "Mono-ubiquitinierten" Konstrukt wieder mehrfach Ubiquitin-modifizierte Formen zu erkennen. Das als Negativkontrolle verwendete Ub-M-βGal Konstrukt wird dagegen kotranslational zu stabilem M-βGal prozessiert (Bachmair *et al.*, 1986) und als solches unmodifiziert aus den Lysaten präzipitiert (Abb. 14c). In

diesen Ansätzen war weder Shp1 noch Ubx2 nachweisbar, die Interaktion erfolgte also spezifisch mit dem Ubiquitin-modifizierten β Gal-Konstrukt. Dies zeigt, dass Shp1 und Ubx2 nicht nur generell mit Ubiquitinkonjugaten interagieren können (Abschnitt 3.2.1, Abb. 14), sondern auch an ubiquitinierte Proteine binden, die speziell für den proteasomalen Abbau bestimmt sind.

Um eine mögliche Beteiligung von Shp1 und Ubx2 beim Abbau des Ub-P- β Gal Substrates zu prüfen, wurden "Pulse chase" Experimente durchgeführt: die Menge an ^{35}S -markiertem Ub-P- β Gal wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten in $\Delta shp1$ und $\Delta ubx2$ Nullmutanten analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp war in beiden Stämmen sowohl die Ub-P- β Gal Form als auch die stärker ubiquitinierten Spezies stabilisiert (Abb. 15a). Der Abbau war allerdings im Unterschied zu einer klassischen UFD-Mutante wie *ufd1-2* nicht vollständig blockiert, sondern nur verlangsamt. Es war sowohl die Abnahme der Ub-P- β Gal-Menge als auch das Auftreten eines charakteristischen Abbau-Zwischenproduktes (Abb. 15a, mit Sternchen markiert) zu beobachten. Eine Quantifizierung der Ergebnisse ergab eine Erhöhung der Ub-P- β Gal Halbwertszeit von 9 Minuten auf über 20 Minuten in $\Delta shp1$ und $\Delta ubx2$ Zellen. Um die Spezifität dieser Effekte zu überprüfen, wurden Kontrollexperimente mit einem kurzlebigen Substrat des "N-end rule"-Proteinabbauweges durchgeführt, R- β Gal. Dieses Konstrukt wird ebenfalls als Ub-R- β Gal Fusion exprimiert, dann aber rasch zu R- β Gal prozessiert und mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten über das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut (Bachmair *et al.*, 1986). Im Gegensatz zu Ub-P- β Gal verläuft der Abbau dabei unabhängig von Cdc48 (Ghislain *et al.*, 1996). $\Delta shp1$ und $\Delta ubx2$ Mutanten zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Abbaurate von R- β Gal im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 15b), damit können für diese Stämme allgemeine Defekte beim proteasomalen Abbau ausgeschlossen werden. Die Stabilisierung von Ub-P- β Gal deutet also auf eine spezifische Funktion von Shp1 und Ubx2 im Cdc48-vermittelten Proteinabbau hin.

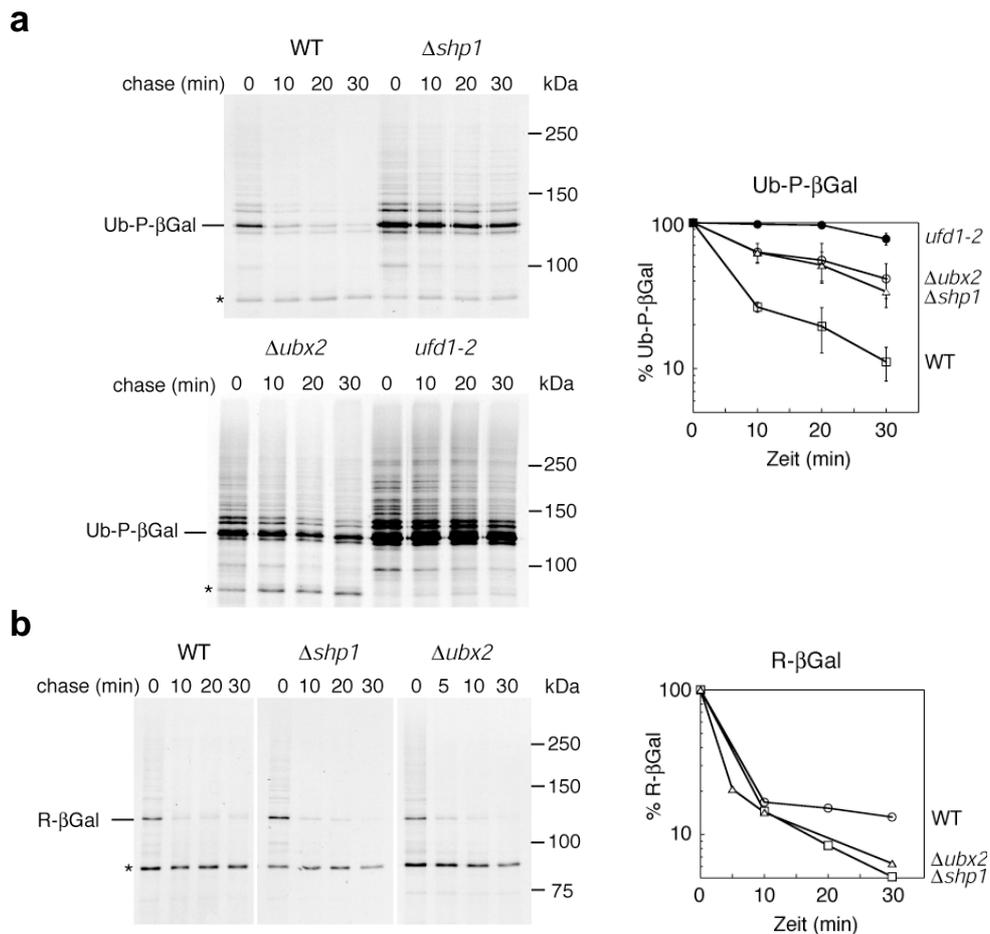


Abb. 15: Shp1 und Ubx2 werden für den effizienten Abbau von Ub-P- β Gal benötigt. **a.** "Pulse chase" Experimente zur Stabilität von Ub-P- β Gal in Wildtyp, $\Delta shp1$, $\Delta ubx2$ und $ufd1-2$ Mutanten. ^{35}S markiertes Ub-P- β Gal wurde nach Zugabe nichtradioaktiven Methionins und dem Translations-Inhibitor Cycloheximid zu verschiedenen Zeitpunkten mittels anti- β Gal Antikörper aus Zelllysaten der angegebenen Stämme gefällt. Nach der denaturierenden Gelelektrophorese wurden die Mengen des präzipitierten Ub-P- β Gal im Autoradiogramm analysiert und mit einem Phospho-Imager quantifiziert. **b.** "Pulse chase" Analysen zur Abbaukinetik des "N-end rule"-Substrates R- β Gal in Wildtyp und $\Delta shp1$ bzw. $\Delta ubx2$ Stämmen wie unter **a** beschrieben. **a, b.** Die Sternchen markieren ein stabiles, für den Abbau von β Galaktosidase charakteristisches Zwischenprodukt.

Durch die Interaktion mit dem Ufd1-enthaltenden Cdc48-Komplex, der eine essentielle Komponente des UFD-Abbauweges darstellt, ist dies für Ubx2 weniger überraschend als für den alternativen Adaptor Shp1, dessen humanes Ortholog p47 bisher nur Prozessen der homotypischen Membranfusion zugeordnet wurde (Kondo *et al.*, 1997; Rabouille *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2002). Zudem lässt die vermutete Präferenz von p47 für Mono-Ubiquitin (Meyer *et al.*, 2002) ebenfalls auf nicht-degradative Funktionen schließen. Die Ergebnisse zeigen aber, dass zumindest in der untersuchten Situation, bei

Überexpression eines künstlichen Substrates, Cdc48^{Shp1} Aufgaben beim Proteinabbau übernehmen kann. Eine strikte Trennung der Cdc48-Komplexe für degradative (Cdc48^{Ufd1-Npl4}) und nicht-degradative Aufgaben (Cdc48^{Shp1}) ist somit nicht möglich.

3.3. Ubx2 als neue Komponente des ERAD-Proteinabbauweges

3.3.1 $\Delta ubx2$ Mutanten zeigen Defekte im ERAD-Proteinabbauweg

Nach den oben gezeigten Effekten von Ubx2 auf den Abbau eines künstlichen Modellsubstrates war nun interessant zu untersuchen, in welchem zellulären, Cdc48-vermittelten Abbauweg Ubx2 eine Funktion ausüben könnte. Folgende Hinweise deuteten dabei auf ER-assoziierte Protein-Degradation ("Endoplasmic reticulum-associated degradation", ERAD) hin: die beschriebene Lokalisation von Ubx2 am ER (Abschnitt 3.1.3) und die Sensitivität der Nullmutante gegenüber Cadmium (Abschnitt 3.1.4), die auch für einige Mutanten des ERAD-Proteinabbauweges (Ubc1, Ubc7, Hrd1, Doa10) gefunden wurde (Jungmann *et al.*, 1993; Swanson *et al.*, 2001). Zudem wird für die Degradation von ERAD-Substraten der Ufd1-Npl4 Adaptor benötigt (Bays *et al.*, 2001b; Ye *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002; Jarosch *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002), mit dem sich eine gleichzeitige Bindung von Ubx2 an Cdc48 nicht ausschließt (Abschnitt 3.1.2).

Um eine Beteiligung von Ubx2 an ERAD zu überprüfen, wurden die Abbau-Kinetiken verschiedener klassischer ERAD-Substrate in Wildtyp und $\Delta ubx2$ Stämmen verglichen. Zunächst wurde der Abbau des lumenalen, löslichen Proteins CPY* untersucht, einer mutierten Form der normalerweise über das ER in die Vakuole sekretierten Carboxypeptidase Y. Das fehl gefaltete CPY* wird hingegen in Abhängigkeit von der Ubiquitin-Ligase Hrd1 über den ERAD-Abbauweg degradiert (Finger *et al.*, 1993; Deak und Wolf, 2001). In "Pulse chase" Experimenten wurde die Abnahme der Menge an CPY* in Wildtyp und $\Delta ubx2$ Mutanten verfolgt (Abb. 16a). Die $\Delta ubx2$ Mutante

zeigte dabei eine deutliche Verzögerung des CPY*-Abbaus, die sich in einer annähernden Verdopplung der Halbwertszeit bemerkbar machte (Abb. 16a).

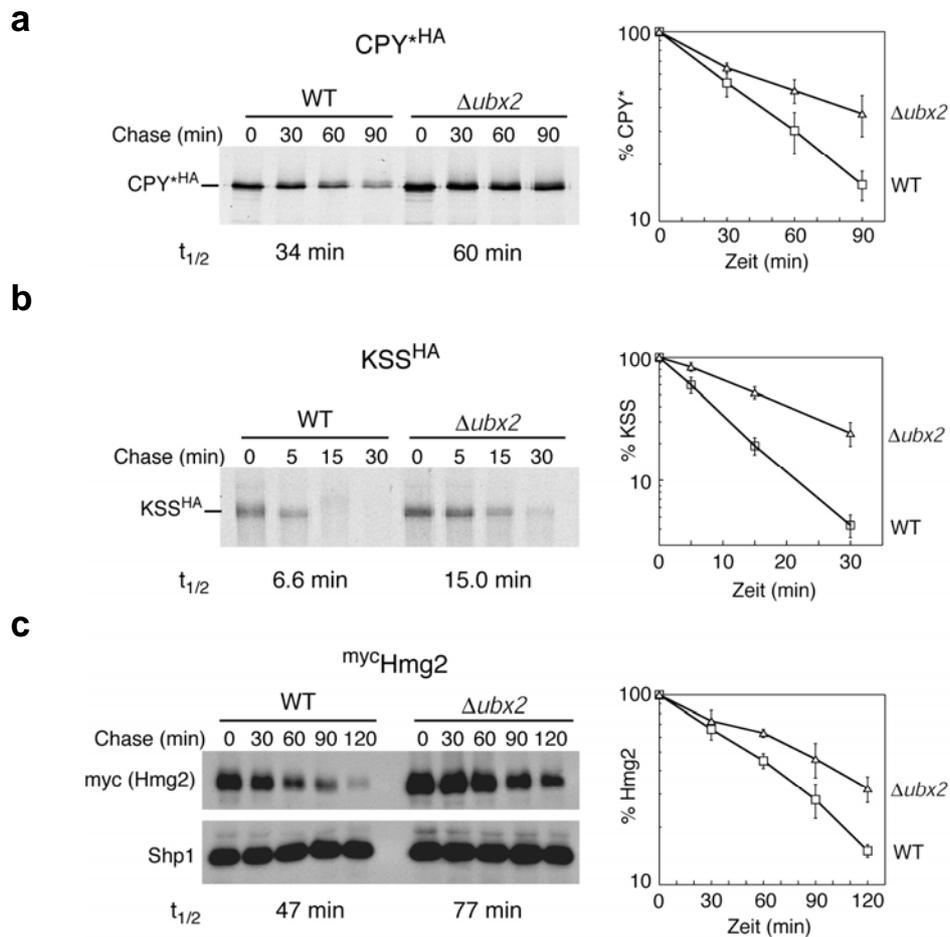


Abb. 16: $\Delta ubx2$ Stämme zeigen Defekte beim Abbau von verschiedenen ERAD-Substraten. a, b. "Pulse chase" Analysen zum Abbau von CPY*^{HA} bzw. KSS^{HA} in Wildtyp und $\Delta ubx2$ Mutanten. Die mit ³⁵S-radioaktiv markierten Substrate wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von unmarkiertem Methionin und Cycloheximid mittels anti-HA Antikörper aus denaturierten Zelllysaten gefällt und im Autoradiogramm analysiert. **c.** "Shut off" Experimente zur Stabilität von mycHmg2. Nach Inhibition der Translation durch Zugabe von Cycloheximid wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gleiche Mengen Hefezellen geerntet und nach Aufschluss im anti-Myc Immunblot analysiert, Shp1 diente als Ladekontrolle. Das Chemilumineszenz-Signal wurde zusätzlich mit Hilfe einer CCD-Kamera quantifiziert. **a-c.** Die Diagramme zeigen die Abnahme der Proteinmenge gemittelt aus drei unabhängigen Experimenten. Die daraus berechneten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) sind unterhalb der Autoradiogramme bzw. des Immunblots angegeben.

Als ERAD-Substrat der Doa10 E3-Ligase wurde das membranständige Protein KSS verwendet, ein Fusionskonstrukt des mutierten α -Faktor Transporters Ste6-166 mit einer zusätzlichen luminalen Domäne, das insgesamt 11 Transmembrandurchgänge besitzt (Vashist und Ng, 2004). Der

Abbau von KSS verlief in Wildtyp Zellen wie erwartet schneller als für CPY*, die $\Delta ubx2$ Zellen zeigten aber wieder eine signifikante Verzögerung bei der Degradation (Abb. 16b). Als drittes ERAD-Substrat wurde der Abbau des Enzyms 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA-Reduktase (Hmg2) analysiert, dessen Menge und damit Aktivität in der Zelle durch ERAD reguliert wird (Hampton und Rine, 1994). Hmg2 ist ebenfalls ein ER-membranständiges Protein, wird aber im Gegensatz zu KSS durch Hrd1 ubiquitiniert. Dem für die "Shut off" Experimente verwendeten Konstrukt fehlt die regulatorische Domäne, es wird daher konstitutiv abgebaut (Hampton *et al.*, 1996). Auch für dieses Substrat zeigten $\Delta ubx2$ Mutanten einen langsameren Abbau als der Wildtyp (Abb. 16c). Ubx2 ist also für den Abbau von Substraten aus unterschiedlichen ERAD-Abbauwegen wichtig und somit eine allgemeine ERAD-Komponente.

Um die Bedeutung von Ubx2 im ERAD-System noch ausgiebiger zu testen, wurden weitere Experimente zum Hmg2-Abbau unter Stressbedingungen durchgeführt. Durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) zum Medium werden erhöhte Mengen an fehl gefalteten Proteinen im ER induziert. Hohe Konzentrationen (2 mM DTT) führen dabei in Wildtypzellen aufgrund einer Überlastung des Systems zur Stabilisierung von ERAD-Substraten (Travers *et al.*, 2000). Dieser Effekt war bei einer Konzentration von 100 μ M DTT im Medium nicht zu beobachten, die Kinetik des Hmg2 Abbaus im Wildtyp glich der unter normalen Bedingungen (Abb. 17a, b). In $\Delta ubx2$ Mutanten führte die Zugabe von DTT allerdings zu einer stärkeren Stabilisierung von Hmg2 im Vergleich zum YPD-Ansatz (Abb. 17a, b). Auch durch die Erhöhung der Temperatur auf 37 °C wurde in $\Delta ubx2$ Zellen eine zusätzliche Verzögerung beim Abbau induziert, während der Wildtyp offensichtlich nicht beeinträchtigt war (Abb. 17a, c). Der beobachtete Effekt in der $\Delta ubx2$ Mutante ist wahrscheinlich auf eine Akkumulation der durch die Stressbedingungen induzierten endogenen Substrate zurückzuführen, welche die ERAD-Maschinerie überlasten und dadurch den Hmg2-Abbau weiter verzögern. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Ubx2 für die Effizienz des ERAD-Systems.

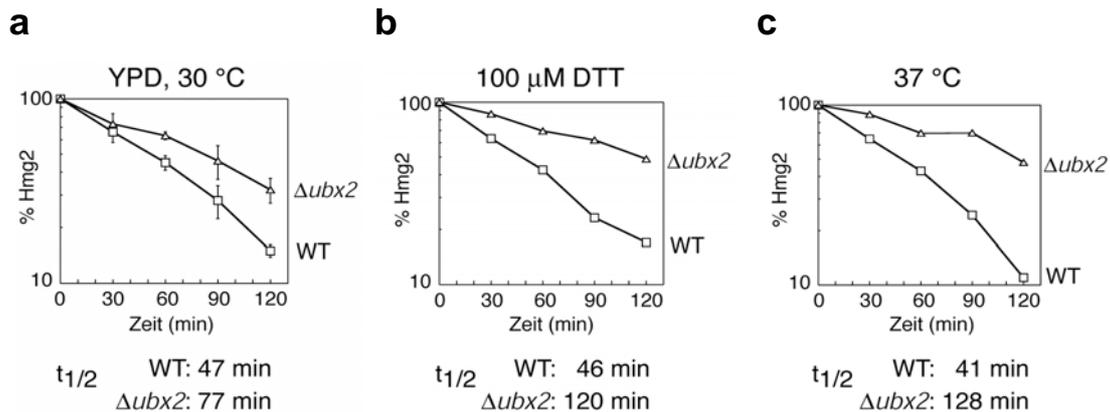


Abb. 17: Verzögerung des Hmg2-Abbaus in $\Delta ubx2$ Stämmen durch ER-Stress. a-c. “Shut off” Analysen zum Abbau von myc Hmg2 in Wildtyp und $\Delta ubx2$ Mutante unter Stressbedingungen. Die Stämme wurden eine Stunde vor Beginn des Experiments in YPD-Medium mit 100 μ M DTT umgeimpft (b) bzw. bei 37 °C (c) inkubiert. Die Proteinmenge von myc Hmg2 zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden im anti-Myc Immunblot analysiert und das Chemilumineszenz-Signal mit Hilfe einer CCD-Kamera quantifiziert. Die aus den Werten berechneten Halbwertszeiten für myc Hmg2 sind unter den Diagrammen angegeben.

3.3.2 Ubx2 rekrutiert den Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplex an ERAD-Substrate

Die Zuordnung von Ubx2 zum ERAD-Abbauweg stellte im Folgenden die Frage nach der molekularen Funktion von Ubx2 in diesem Prozess. Die gezeigte Ko-Immünpräzipitation von Ufd1 in Abschnitt 3.1.2 deutete darauf hin, dass Ubx2 eine weitere Untereinheit des in ERAD wirkenden Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes darstellen könnte. In der Tat kann man durch Immunpräzipitation jeder einzelnen Komponente jeweils den gesamten Cdc48^{Ufd1-Npl4-Ubx2} Komplex stabil aus Zellextrakten isolieren (Abb. 18). Ubx2 wirkt also möglicherweise als Spezifitäts-vermittelnder Kofaktor für Cdc48^{Ufd1-Npl4} in ERAD.

Da für Cdc48^{Ufd1-Npl4} eine Bindung an ERAD-Substrate gezeigt wurde (Ye *et al.*, 2001; Rabinovich *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2003; Elkabetz *et al.*, 2004), ließ sich eine Interaktion von Ubx2 mit ERAD-Substraten vermuten, zumal Ubx2 auch mit dem UFD-Substrat Ub-P- β Gal interagieren konnte (Abschnitt 3.2.2). In Ko-Immünpräzipitationsexperimenten wurden die ERAD-Substrate myc Hmg2 und CPY^{*HA} aus Zelllysaten gefällt und die Präzipitate im Immunblot gegen Ubx2, Cdc48 und Ufd1 untersucht. Sowohl für das membranständige Hmg2 als auch für das lösliche CPY* konnte eine Bindung von Ubx2 nachgewiesen werden (Abb. 19a, b). Wie erwartet, wurden auch Cdc48 und

Ufd1 mit den Substraten kopräzipitiert. Überraschenderweise ging die Bindung von Cdc48 und Ufd1 verloren, wenn die Experimente in $\Delta ubx2$ Stämmen durchgeführt wurden (Abb. 19a, b). Offensichtlich wird Ubx2 für eine stabile Interaktion des Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes mit ERAD-Substraten benötigt.

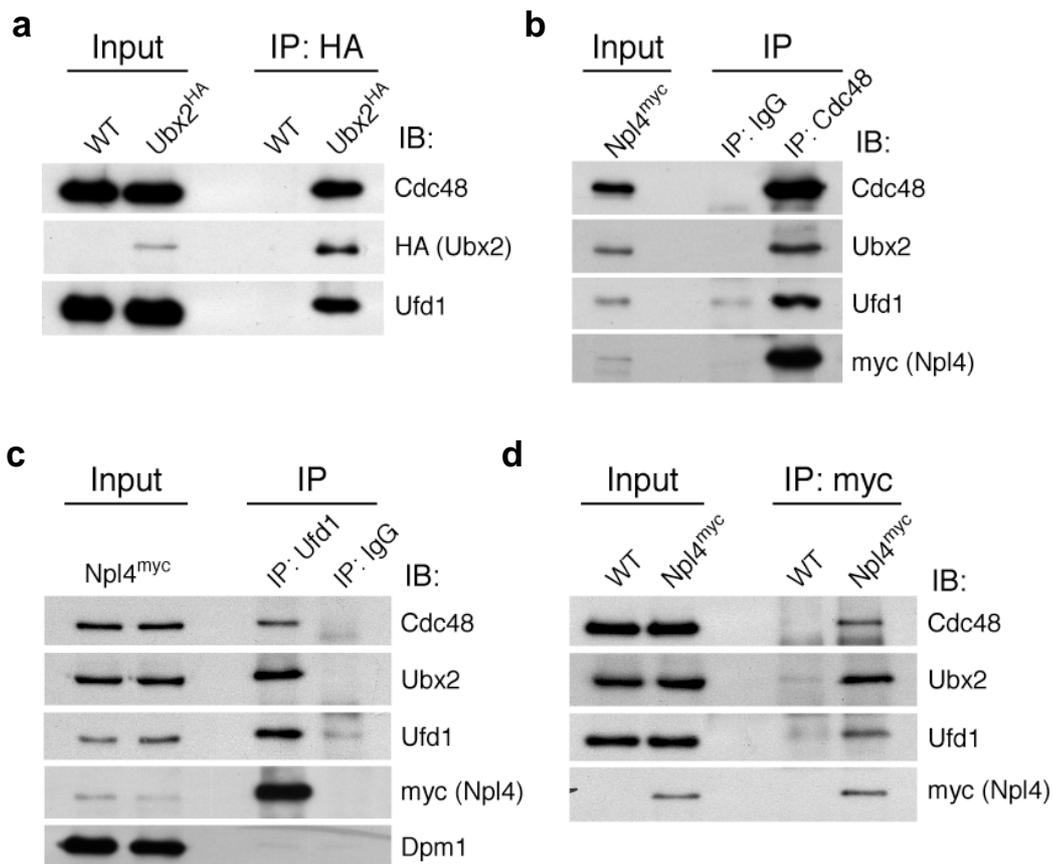


Abb. 18: Ubx2 bildet einen stabilen Komplex mit Cdc48^{Ufd1-Npl4}. a-d. Ko-Immünpräzipitationsexperimente in Hefestämmen mit 3HA-epitopmarkiertem Ubx2 (a) oder 3Myc-epitopmarkiertem Npl4 (b-d). Ubx2^{HA}, Cdc48, Ufd1 oder Npl4^{myc} wurde durch den entsprechenden Antikörper aus Zelllysaten gefällt und das Präzipitat im Immunblot auf die Anwesenheit der einzelnen Komplex-Komponenten untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurde im Npl4^{myc}-Experiment (c) mit einem anti-Dpm1 Antikörper auf die Anwesenheit von Bestandteilen der ER-Membran im Präzipitat getestet.

Um den Einfluss der einzelnen Komponenten auf die Hmg2-Bindung genauer zu untersuchen, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente parallel in Wildtyp, $\Delta ubx2$ Mutanten und den konditionalen Mutanten *ufd1-2* und *cdc48-6* bei nicht-permissiver Temperatur durchgeführt. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde außerdem in einem Ansatz ein stabiles, integrales ER-Membranprotein gefällt (Dpm1), das kein Substrat für den ERAD-Abbauweg

ist. Im Dpm1-Präzipitat war kein Ubx2, Cdc48 oder Ufd1 nachweisbar (Abb. 19c). Im Ansatz mit gefällttem Hmg2 aus Wildtyp Zellen waren hingegen wieder Ubx2, Cdc48 und Ufd1 nachweisbar. Ubx2 interagierte auch in *ufd1-2* Mutanten stabil mit dem Substrat, Cdc48 wurde allerdings nicht kopräzipitiert.

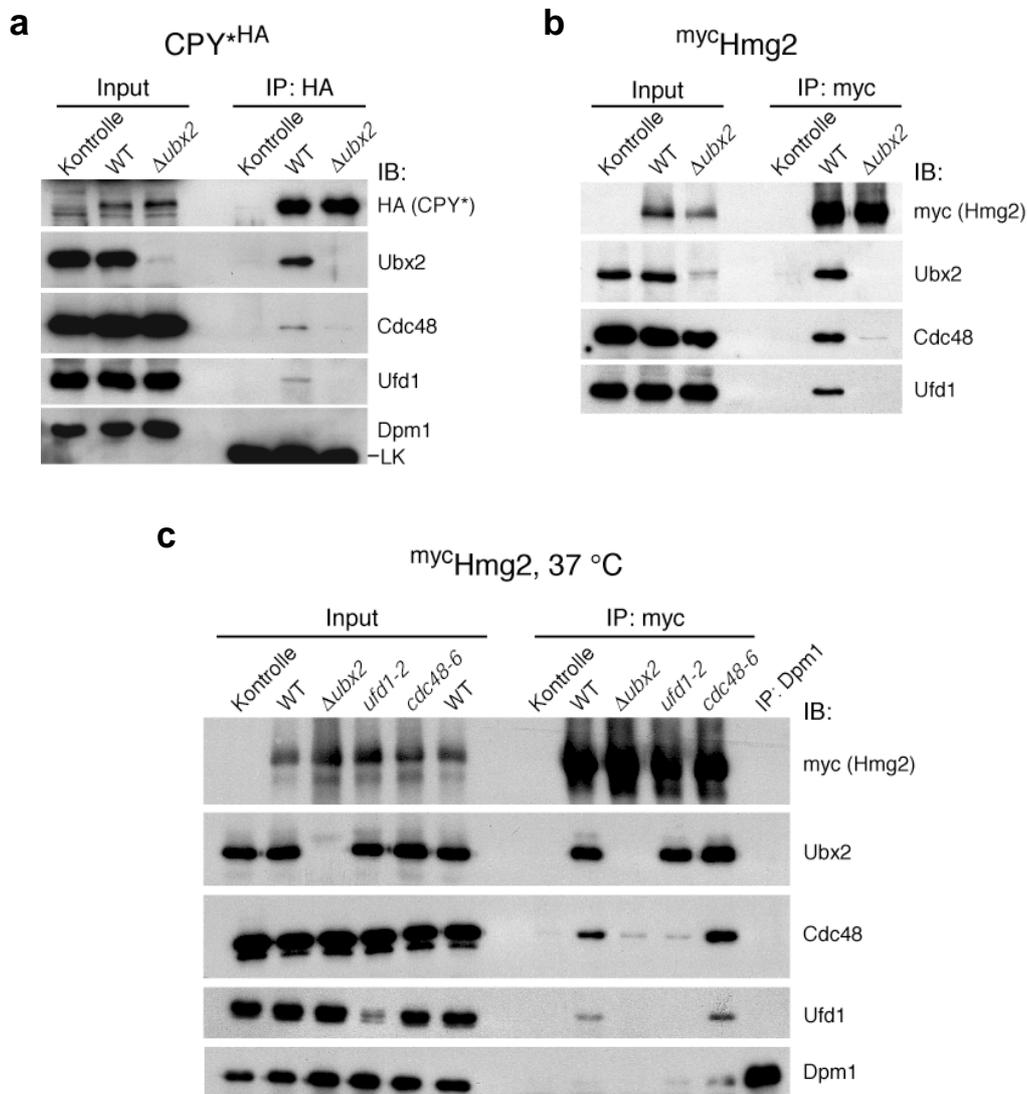


Abb. 19: Ubx2 interagiert mit ERAD-Substraten und rekrutiert den Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplex. a-c. Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit CPY*HA oder mycHmg2 exprimierenden Hefestämmen. a, b. CPY*HA oder mycHmg2 wurden durch anti-HA bzw. anti-Myc Antikörper aus Zelllysaten von Wildtyp oder $\Delta ubx2$ Stämmen gefällt und das Präzipitat im Immunblot auf Ubx2, Cdc48 und Ufd1 getestet. Zur Kontrolle wurde in a mit einem anti-Dpm1 Antikörper überprüft, ob ER-Membranbestandteile mitgefällt wurden. LK zeigt in a die Leichtkette des Antikörpers an c. Nach Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C wurden mycHmg2 exprimierende Wildtyp und Mutanten Stämme lysiert und mittels anti-Myc oder anti-Dpm1 Antikörper das entsprechende Protein aus den Zelllysaten gefällt. Anschließend wurde das Präzipitat im Immunblot auf die Anwesenheit der angegebenen Proteine untersucht.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der essentiellen Funktion des Ufd1-Npl4-Adaptors für die Bindung von Cdc48 an Ubiquitinkonjugate *in vivo* (Richly *et al.*, 2005), Ubx2 alleine reicht für eine Rekrutierung offensichtlich nicht aus. In *cdc48-6* Stämmen war bei der restriktiven Temperatur eine Akkumulation von Ubx2, Ufd1 und Cdc48 an Hmg2 zu beobachten. Mögliche Ursache dafür könnte ein funktionell gestörter ATPase-Zyklus des mutierten Cdc48 sein, der zu einer längeren Verweildauer des gesamten Komplexes am Substrat führt. Insgesamt zeigen diese Daten, dass Ubx2 für eine Bindung von Ufd1 und Cdc48 an Hmg2 notwendig, aber nicht hinreichend ist. Für die Cdc48-Rekrutierung wird neben Ubx2 auch Ufd1 benötigt. Da die Interaktion von Ubx2 mit Hmg2 unabhängig von Ufd1 und Cdc48 erfolgen kann, könnte sie beim ERAD-Prozess bereits vor der Bindung von Cdc48^{Ufd1-Npl4} an das Substrat stattfinden.

3.3.3 Ubx2 rekrutiert den Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplex an Komponenten des ERAD-Systems und an das ER

Die oben gezeigte Bindung an ERAD-Substrate warf die Frage auf, ob Ubx2 und Cdc48^{Ufd1-Npl4} auch mit einigen der Komponenten des ERAD-Systems assoziiert sein könnten. Durch Immunpräzipitation wurden HA-epitopmarkierte Versionen der beiden in ERAD involvierten E3 Ubiquitin-Ligasen, Hrd1 und Doa10, aus Zelllysaten gefällt. Tatsächlich konnten Ubx2, Ufd1 und Cdc48 mit beiden Proteinen koisoliert werden und wiederum waren bei Experimenten mit $\Delta ubx2$ Nullmutanten Cdc48 und Ufd1 in den Präzipitaten nicht bzw. kaum nachweisbar (Abb. 20a, b). Ubx2 ist also auch für eine stabile Interaktion des Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes mit den E3-Ligasen essentiell.

Weiterhin sollte eine Bindung des Cdc48-Komplexes an Bestandteile der für ERAD benötigten ER-Membranpore untersucht werden. Kürzlich wurde das humane Protein Derlin-1 als mögliche Komponente für den retrograden Transport von ERAD-Substraten vorgeschlagen (Lilley und Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004). Das zu Derlin-1 homologe Protein der Hefe, Der1, wurde bereits als ERAD-Faktor für lumenale Substrate beschrieben, die genaue Funktion während des Abbaus ist allerdings noch nicht geklärt (Knop *et al.*, 1996). In

Hefen existiert außerdem ein Der1-ähnliches Protein, Dfm1, das ebenfalls in der ER-Membran lokalisiert (Hitt und Wolf, 2004).

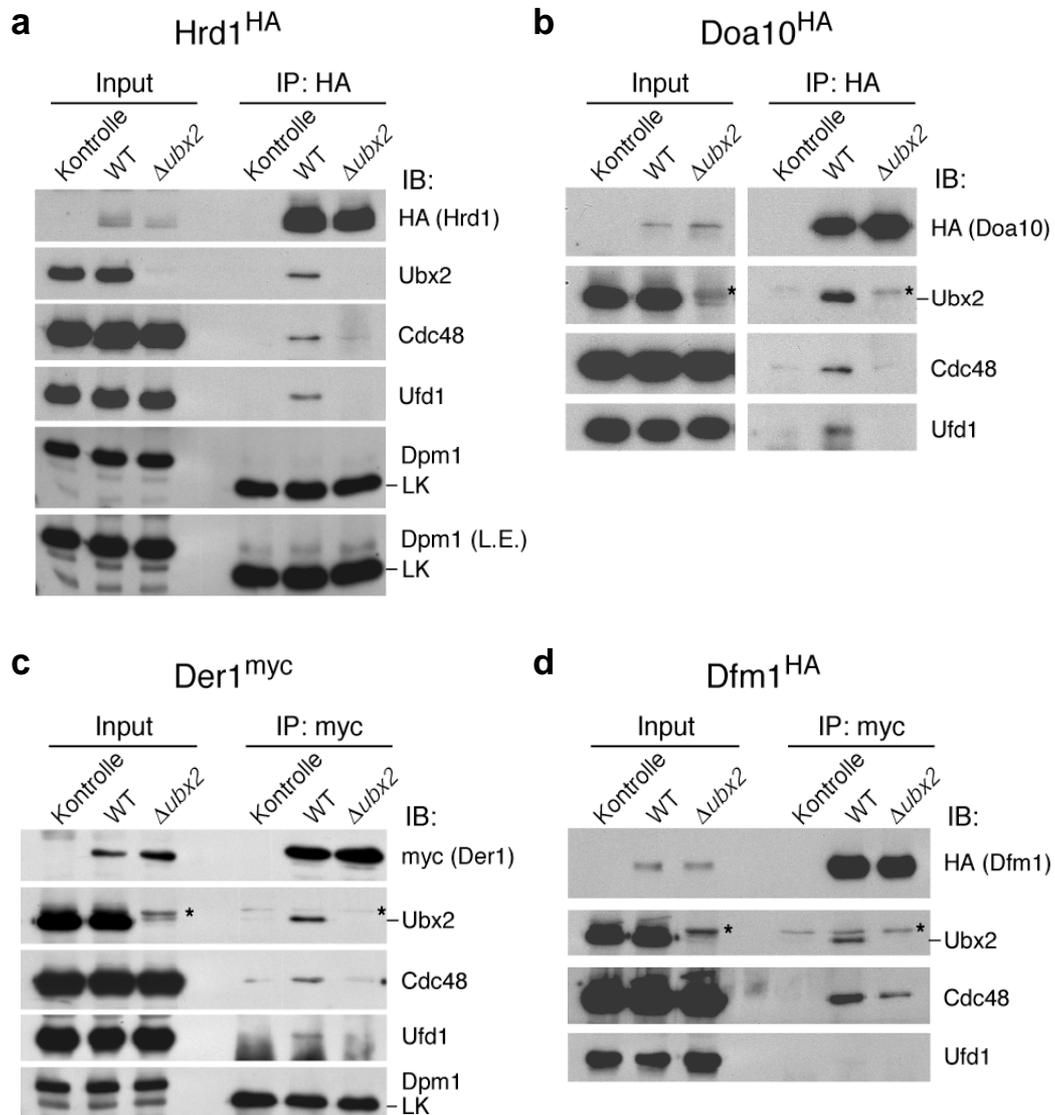


Abb. 20: Ubx2 interagiert mit ERAD E3 Ubiquitin-Ligasen und putativen Bestandteilen der Dislokationspore. a-d. Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit Hrd1^{HA}, Doa10^{HA}, Der1^{myc} oder Dfm1^{HA} exprimierenden Hefestämmen. Die entsprechenden Proteine wurden durch anti-HA bzw. anti-Myc Antikörper aus Zelllysaten von Wildtyp oder Δ ubx2 Stämmen gefällt und das Präzipitat im Immunblot auf Ubx2, Cdc48 und Ufd1 getestet. Zur Kontrolle wurde in a und c mit einem anti-Dpm1 Antikörper überprüft, ob ER-Membranbestandteile mitgefällt wurden. Bei sehr langer Exposition (a) lässt sich ein unspezifisches Signal in allen Ansätzen detektieren. Die Sternchen in b, c und d markieren eine kreuzreaktive Bande des anit-Ubx2 Antikörpers. LK zeigt in a und c die Leichtkette des Antikörpers an.

In Ko-Immunpräzipitationsexperimenten interagierten beide Proteine mit Ubx2 und Cdc48, und Der1 auch mit Ufd1 (Abb. 21c, d). Im Fall von Der1 war außerdem wieder eine Ubx2-Abhängigkeit der Bindung von Cdc48 und Ufd1 zu beobachten. Dfm1 hingegen zeigte keine Bindung von Ufd1, und Cdc48 wurde auch in $\Delta ubx2$ Zellen zu einem gewissen Grad kopräzipitiert. Letzteres ist wahrscheinlich auf ein Aminosäure-Motiv in Dfm1 zurückzuführen, das als Cdc48-Bindestelle in Ufd1 und Shp1 (BSII) identifiziert wurde (Bruderer *et al.*, 2004; Hitt und Wolf, 2004). Die Interaktion mit Cdc48 in $\Delta ubx2$ Mutanten deutet auf die Funktionalität dieses Motivs in Dfm1 hin. Ubx2 rekrutiert also den Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplex nicht nur an ERAD-Substrate, sondern auch an Komponenten der Ubiquitinierungs- und Translokations-Maschinerie, die für den ERAD-Proteinabbauweg benötigt werden.

Weiterhin wurde der Einfluss von Ubx2 auf die ER-Lokalisation von Cdc48 und Ufd1 allgemein untersucht. Bei Fraktionierungs-Experimenten mit Wildtyp Zelllysaten waren ungefähr 5 bis 10% der Gesamtmenge von Cdc48 bzw. Ufd1 in der 20 000 g Pellet-Fraktion zu finden, welche das ER beinhaltet (Abschnitt 3.1.3, Abb. 21a). In $\Delta ubx2$ Mutanten war dieser Anteil signifikant reduziert auf 40% der Menge an Ufd1 bzw. 60% an Cdc48 in der Wildtyp ER-Fraktion (Abb. 21a). Durch Transformation des $\Delta ubx2$ Stammes mit einem Ubx2 exprimierenden Plasmid geringer Kopienzahl konnte der Effekt zumindest für Ufd1 wieder aufgehoben werden (Abb. 21b). Der geringere Einfluss von Ubx2 auf die Lokalisation von Cdc48 im Vergleich zu Ufd1 ist möglicherweise auf die Existenz weiterer Cdc48-bindender ER-Membranproteine wie Dfm1 oder Shp1 zurückzuführen, die für eine größere Variabilität der Menge an ER-assoziiertem Cdc48 sorgen könnten. Bei Überexpression von Ubx2 war dagegen eine verstärkte Membran-Assoziation von sowohl Ufd1 als auch Cdc48 festzustellen (Abb. 21b).

Somit ist Ubx2 ein ER-Membrananker für Cdc48^{Ufd1-Npl4} in der Zelle. Dabei beinhalten die beobachteten Ubx2-Effekte auf die Membranlokalisation des Cdc48-Komplexes wahrscheinlich auch die Rekrutierung von Cdc48^{Ufd1-Npl4} an endogene Komponenten der ERAD-Maschinerie.

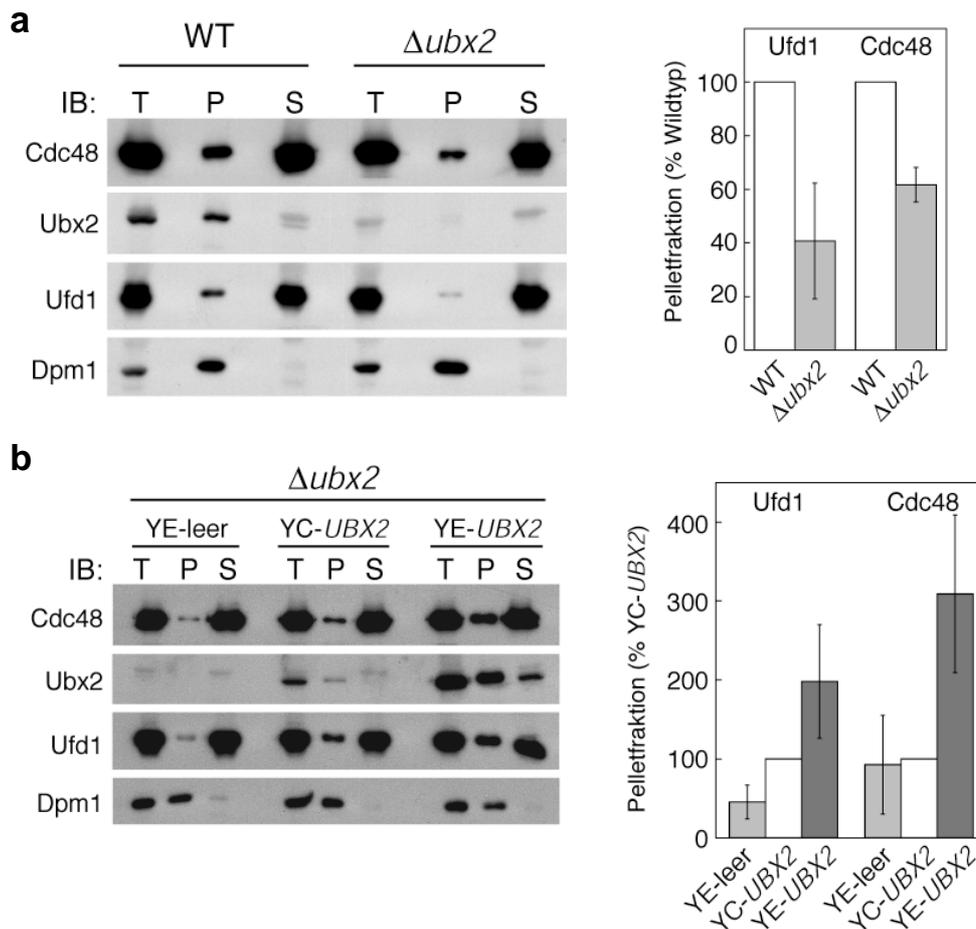


Abb. 21: Ubx2 rekrutiert Cdc48^{Ufd1-Npl4} an die ER-Membran. **a.** Die ER-Membran-Fractionen wurden aus Zelllysaten von Wildtyp und $\Delta ubx2$ Stämmen durch Zentrifugation isoliert. Gleiche Mengen an Gesamtlysat (T), Präzipitat (P) und löslichem Überstand (S) wurden im Immunblot auf die Anteile an Cdc48, Ubx2 und Ufd1 in den Fraktionen getestet. Außerdem wurde mittels anti-Dpm1 Antikörper überprüft, ob die ER-Membran-Fraktion vollständig von der löslichen Fraktion abgetrennt wurde. **b.** Einfluss der Ubx2-Menge auf die Membran-Assoziation von Ufd1 und Cdc48. ER-Membran-Fractionen wurden isoliert aus $\Delta ubx2$ Stämmen, die *UBX2* exprimierende Plasmide in geringer (YC-*UBX2*) oder hoher Kopienzahl (YE-*UBX2*) enthielten, bzw. als Kontrolle mit einem Ausgangsplasmid transformiert worden waren (YE-leer). Zur Verdeutlichung der Unterschiede wurde die doppelte Menge des Präzipitats (P) im Vergleich zu Gesamtlysat (T) und löslichem Überstand (S) im Immunblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. **a, b.** Die Chemilumineszenz-Signale wurden mittels CCD-Kamera quantifiziert und die Mengen von Ufd1 und Cdc48 in den präzipitierten Fraktionen Immunblots im Vergleich zu den Dpm1 Levels bestimmt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Veränderungen der Ufd1- und Cdc48-Mengen in der $\Delta ubx2$ Mutante (a, b: YC-leer) bzw. bei verstärkter Expression von Ubx2 (YE-*UBX2*) im Vergleich zum Wildtyp (a, b: YC-*UBX2*).

3.3.4 Die Rolle der UBX-Domäne von Ubx2 in ERAD

Um weitere Details über die Funktionsweise von Ubx2 in ERAD zu erhalten, wurde dessen Membran-Assoziation genauer untersucht. Die Lokalisation am ER wurde bereits durch die Kofärbung mit anti-Sec61 Antikörpern in der Immunfluoreszenz und der Kofraktionierung mit dem integralen ER-Membranprotein Dpm1 gezeigt (Abschnitt 3.1.3). Zudem ließ die Funktion als Rekrutierungsfaktor für Cdc48 und Ufd1 an Komponenten des ERAD-Abbauweges und das ER allgemein eine stabile Verankerung von Ubx2 in der ER-Membran vermuten.

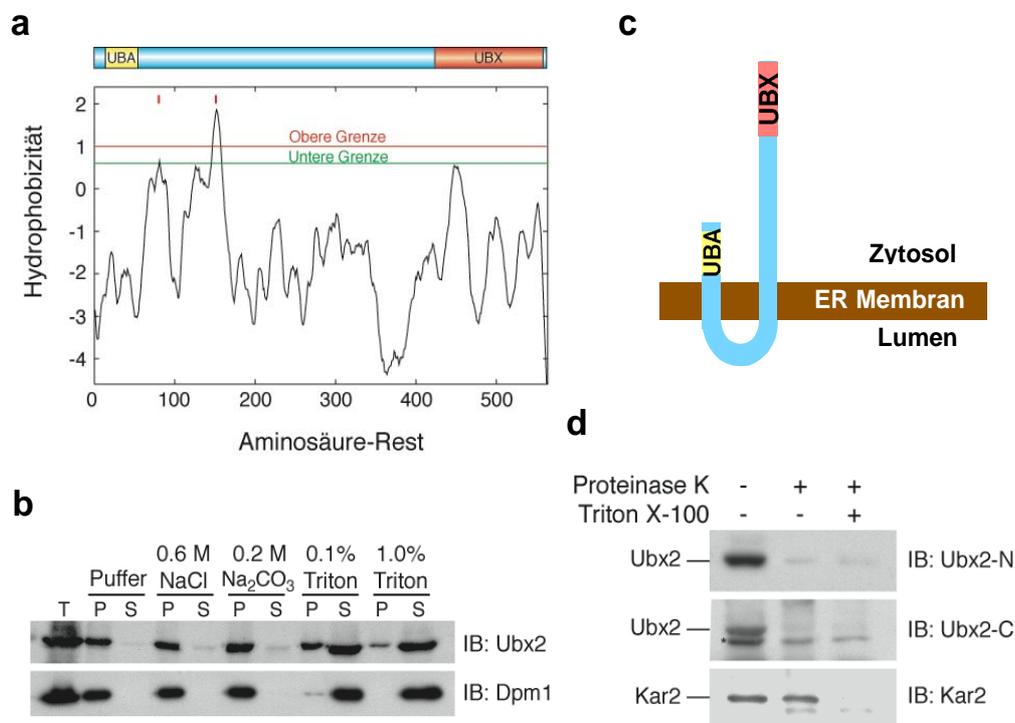


Abb. 22: Ubx2 ist ein integrales Membranprotein, die UBA- und die UBX-Domäne liegen im Zytoplasma. **a.** Hydropathie-Plot und Topologie-Vorhersage für Ubx2. Der Toppred-Algorithmus (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>) gibt zwei mögliche Transmembran-Segmente zwischen den Aminosäureresten 81 und 101 bzw. 152 und 172 mit geringer (Untere Grenze) bzw. hoher Wahrscheinlichkeit (Obere Grenze) an. **b.** Membran-Assoziation von Ubx2 im Vergleich zum integralen ER-Membranprotein Dpm1. Die Membran-Fraktion des 20 000 g Präzipitats wurden mit Lysepuffer, Hochsalzpuffer (0.6 M NaCl), Karbonatpuffer (0.2 M Na₂CO₃) oder Puffer mit unterschiedlicher Detergenz-Konzentrationen (0.1% bzw. 1.0% Triton X-100) resuspendiert und erneut durch Zentrifugation in Pellet (P) und löslichen Überstand (S) aufgetrennt. Anschließend wurden Ubx2 und Dpm1 im Immunblot detektiert. **c.** Schematische Darstellung von Ubx2 in der ER-Membran. **d.** Die UBA- und die UBX-Domäne von Ubx2 sind Protease-sensitiv im "Protease protection" Experiment. Gesamtzelllysat wurde mit Proteinase K in An- oder Abwesenheit von 1.0% Triton X-100 inkubiert und anschließend im Immunblot mit Antikörpern gegen die UBA- (Ubx2-N) bzw. UBX-Domäne von Ubx2 (Ubx2-C), sowie gegen das lumenale ER-Protein Kar2 analysiert.

Tatsächlich sind in der Aminosäureabfolge zwei stark hydrophobe Bereiche in Ubx2 zu finden, die auf mögliche Transmembrandomänen hindeuten (Abb. 22a). Deshalb sollte die Art der Assoziation von Ubx2 mit der Membran-Fraktion des 20 000 g Pellets untersucht werden. Das in der P20-Fraktion angereicherte Ubx2 ließ sich nicht mit Hochsalz- oder Karbonatpuffer von der Membran loslösen, sondern konnte nur durch Detergenz-Behandlung in den S20 Überstand überführt werden (Abb. 22b). Somit ist Ubx2 ein integrales ER-Membranprotein mit wahrscheinlich zwei Transmembrandurchgängen (Abb. 22c). Zur Überprüfung der Topologie in der Membran wurde ein "Protease protection" Experiment durchgeführt, das die vermutete Lokalisation der UBA- und UBX-Domänen auf der zytoplasmatische Seite der ER-Membran verifizierte. Beide Domänen waren im Gegensatz zu dem im ER-Lumen lokalisierten Protein Kar2 Protease-sensitiv (Abb. 22d). Diese Topologie steht auch im Einklang mit den bereits gezeigten zytosolischen Funktionen dieser Ubx2-Domänen: der Ubiquitin-Bindung durch die UBA-Domäne und der Rolle der UBX-Domäne als Modul für die Cdc48 Interaktion.

Um einen Einfluss der UBA- und UBX-Domäne auf die Funktion von Ubx2 in ERAD zu testen, wurden verkürzte Ubx2-Konstrukte hergestellt, in denen jeweils eine der Domänen fehlte. In Membran-Fraktionierungsexperimenten lokalisierten diese Konstrukte wie Vollängen Ubx2 ausschließlich in der P20-Fraktion (nicht gezeigt), die verkürzten Versionen werden also vermutlich wie das Wildtyp-Protein in die ER-Membran integriert. Die zumindest partielle Funktionalität der Deletionskonstrukte konnten weiterhin in Ko-Immünpräzipitationsexperimenten mit dem ERAD-Substrat ^{myc}Hmg2 nachgewiesen werden. Ubx2^{ΔUBA} und Ubx2^{ΔUBX} interagierten beide mit dem Substrat (Abb. 23a), allerdings konnte das Konstrukt ohne UBX-Domäne nicht Cdc48 und Ufd1 rekrutieren (Abb. 23a, b). Die gleichen Effekte waren für Ubx2^{ΔUBX} auch bei Experimenten mit den ERAD-Komponenten Hrd1 und Der1 zu beobachten (Abb. 23c, d).

Dies steht im Einklang mit dem Verlust der Cdc48-Interaktion von Ubx2^{ΔUBX} im Hefe-Zwei-Hybrid System (Abb. 8, Abschnitt 3.1.1) und zeigt

außerdem erneut, dass Ubx2 unabhängig von Cdc48 und Ufd1 mit dem ERAD -System wechselwirken kann.

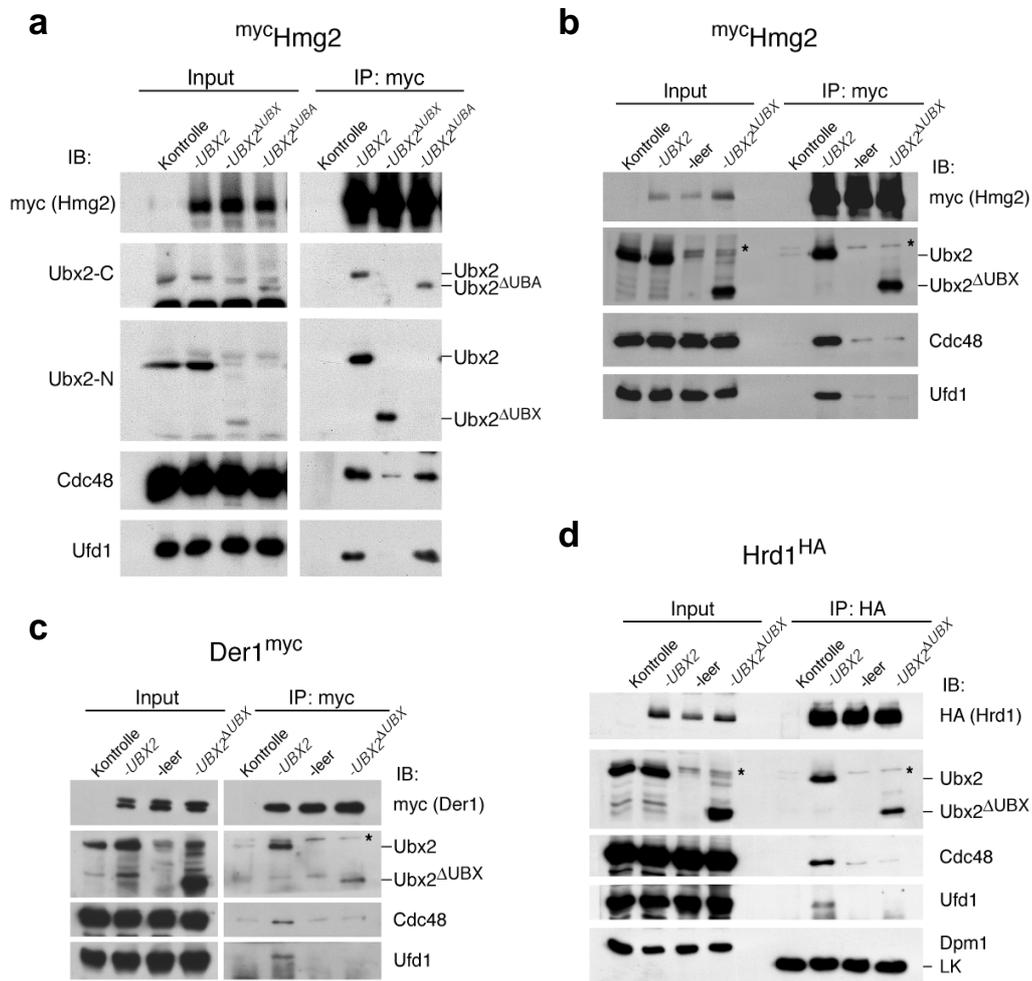


Abb. 23: Die UBX-Domäne von Ubx2 ist essentiell für die Cdc48^{Ufd1-Npl4}-Rekrutierung. **a-d.** Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit ^{myc}Hmg2, Der1^{myc} oder Hrd1^{HA} exprimierenden $\Delta ubx2$ Stämmen, die mit Ubx2 oder UBA- bzw. UBX-Deletionskonstrukten komplementiert wurden. Für den Vergleich mit der Nullmutante wurde ein Leerplasmid transformiert (b-d). Die entsprechenden Proteine wurden durch anti-Myc bzw. anti-HA Antikörper aus den angegebenen Zelllysaten gefällt von und das Präzipitat im Immunblot auf Ubx2 oder Ubx2^{ΔUBA} bzw. Ubx2^{ΔUBX}, Cdc48 und Ufd1 getestet. Zur Kontrolle wurde in d mit einem anti-Dpm1 Antikörper die Abwesenheit von ER-Membranbestandteilen überprüft. LK zeigt in d die Leichtkette des Antikörpers an.

Überprüft man den Einfluss der Domänen deletionen auf die Abbaukinetiken von ERAD-Substraten, so verhalten sich die Konstrukte den Interaktionsergebnissen entsprechend. Hmg2 wurde in Ubx2^{ΔUBA} exprimierenden Zellen ähnlich schnell abgebaut wie bei Expression des Wildtyp Proteins, Ubx2^{ΔUBX} hingegen konnte den Abbaudefekt der $\Delta ubx2$ Mutanten nicht retten (Abb. 24a). Da der Verlust der UBX-Domäne zum gleichen Phänotyp im

Abbau führte wie bei der Nullmutante, scheint die kritische ERAD-Funktion von Ubx2 in der Rekrutierung des Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes zu liegen.

Diese Hypothese wird auch durch die Ergebnisse eines weiteren Experiments unterstützt, in dem der Abbau von Hmg2 in Wildtyp Zellen bei Überexpression des Ubx2^{ΔUBX} Konstrukts untersucht wurde (Abb. 24b). Die beobachtete Stabilisierung von Hmg2 deutet dabei auf einen dominant negativen Effekt von Ubx2^{ΔUBX} hin: das Konstrukt verdrängt endogenes Ubx2 vom Substrat und blockiert die nötige Rekrutierung von Cdc48^{Ufd1-Npl4}, wodurch der Hmg2-Abbau verlangsamt wird. Die Überexpression von Vollängen Ubx2 zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Hmg2-Degradation.

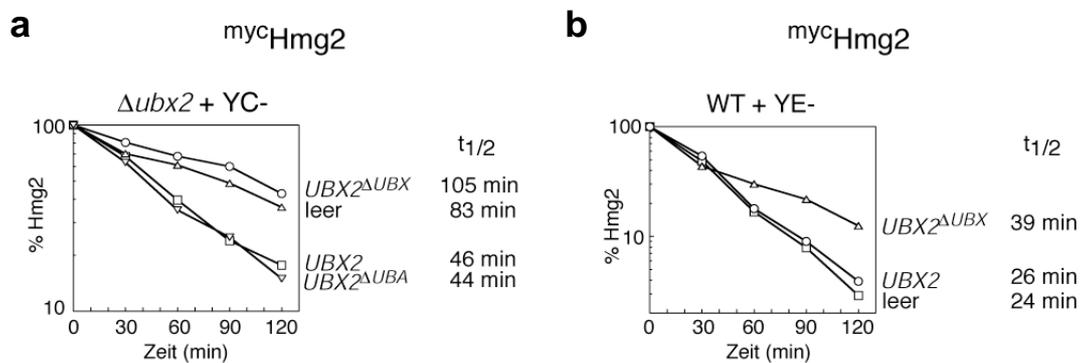


Abb. 24: Das Ubx2^{ΔUBX} Konstrukt kann den Abbaufekt von $\Delta ubx2$ Stämmen nicht komplementieren und wirkt dominant negativ. a, b. "Shut off" Analysen zum Einfluss der UBA- und UBX-Domäne von Ubx2 auf den Abbau von ^{myc}Hmg2. $\Delta ubx2$ (a) oder Wildtyp Stämme (b) wurden mit Plasmiden geringer (YC-) oder hoher Kopienzahl (YE-) transformiert, die für die angegebenen Konstrukte kodierten. Die Proteinlevels von ^{myc}Hmg2 zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden im anti-Myc Immunblot analysiert und das Chemilumineszenz-Signal mit Hilfe einer CCD-Kamera quantifiziert. Die aus den Werten berechneten Halbwertszeiten für ^{myc}Hmg2 sind neben den Diagrammen angegeben. Die kürzeren Halbwertszeiten in b resultieren aus der Verwendung eines anderen Wachstumsmediums (SC-Ura im Unterschied zu YPD).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden UBX-Proteine als neue Familie von Cdc48-Kofaktoren identifiziert, die zur Spezifizierung von Cdc48-Funktionen beitragen. Die UBX-Domäne dient den UBX-Proteinen dabei als Modul für die Cdc48-Interaktion. Durch die Kombination von gleichzeitiger und sich wechselseitig ausschließender Bindung der sieben UBX-Proteine und Ufd-Npl4 mit Cdc48 wird die Ausbildung einer Vielfalt von unterschiedlichen Cdc48-Adaptorkomplexen ermöglicht, die zusammen mit Substrat-prozessierenden Kofaktoren die Cdc48-Funktionen in der Zelle steuern können.

So dient das UBX-Protein Ubx2 als Kofaktor für den Cdc48^{Ufd1-Npl4} Segregase-Komplex im ERAD-Proteinabbauweg. Ubx2 rekrutiert Cdc48^{Ufd1-Npl4} an die ER-Membran, speziell an ERAD-Substrate, E3 Ubiquitin-Ligasen und mögliche Bestandteile der Dislokationspore, und steigert somit die Effizienz der Cdc48^{Ufd1-Npl4}-Aktivität. Dies ist das erste Beispiel für eine weitere Regulation des Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes durch einen Koadaptor. Die UBX-Proteine Ubx3 oder Ubx5 sind ebenfalls mit Cdc48^{Ufd1-Npl4} assoziiert, während Ubx6 und Ubx7 wahrscheinlich zusammen mit Cdc48^{Shp1} wirken.

Neben den bekannten Funktionen in der homotypischen Membranfusion kann Cdc48^{Shp1} auch Aufgaben im UFD-Proteinabbauweg übernehmen, womit die enge Verbindung von Cdc48 zum Ubiquitin/Proteasom-System einmal mehr unterstrichen wird. Außerdem wird dadurch die bisherige Einteilung der Funktionen von Cdc48^{Ufd1-Npl4} für degradative und Cdc48^{Shp1} für nicht-degradative Prozesse in Frage gestellt.

4.1. UBX-Proteine als Kofaktoren für Cdc48

Die Vielzahl und Verschiedenartigkeit der zellulären Prozesse, in denen Cdc48 eine Rolle spielt, verlangen eine Spezifizierung der Cdc48-Aktivitäten. Diese wird vermutlich hauptsächlich durch die sich wechselseitig ausschließenden Adaptorproteine Shp1 und Ufd1-Npl4 gewährleistet, doch

auch die Adaptorenkomplexe übernehmen unterschiedliche Aufgaben. Cdc48^{Ufd1-Npl4} besitzt zwar vorwiegend Funktionen beim Proteinabbau, wie beispielsweise im UFD- und ERAD-Abbauweg (Ghislain *et al.*, 1996; Rape *et al.*, 2001; Braun *et al.*, 2002), bei der Mobilisierung des Transkriptionsfaktors Spt23 aus dem Dimerkomplex an der ER-Membran ist jedoch gerade der Schutz des bereits ubiquitinierten Substrates vor der Degradation gefordert. Unklar ist außerdem die Rolle des p97^{Ufd1-Npl4} Komplexes beim Wiederaufbau der Kernmembran nach der Mitose (Hetzer *et al.*, 2001), die möglicherweise auch nicht mit dem Abbau von Proteinen verknüpft ist. Durch die UBX-Proteine als neue Familie von Cdc48-Kofaktoren wird eine weitere Funktions-Spezifizierung ermöglicht, da einige UBX-Proteine wie Ubx2 als Koadaptoren in bestimmten Prozessen agieren können (Abb. 25).

Die Regulierung der Zusammensetzung von Cdc48-Komplexen ist allerdings weitgehend ungeklärt. Für den wechselseitigen Ausschluss der Bindung von Shp1 und Ufd1-Npl4 an das Cdc48-Hexamere könnte folgende Erklärung dienen: Die Interaktion mit der N-Domäne von Cdc48 kann einerseits über die UBX-Domäne oder einer UBX-ähnlichen Domäne, wie in Npl4 oder Otu1 identifiziert, erfolgen (Yuan *et al.*, 2001; Uchiyama *et al.*, 2002; Bruderer *et al.*, 2004; Decottignies *et al.*, 2004; Hartmann-Petersen *et al.*, 2004; Rumpf und Jentsch, 2006). Andererseits enthalten p47/Shp1 und Ufd1 ein weiteres Cdc48-Bindemotiv (BSII), das mit einem anderen Abschnitt der N-Domäne interagieren kann (Meyer *et al.*, 2000; Uchiyama *et al.*, 2002; Bruderer *et al.*, 2004; Hitt und Wolf, 2004). Shp1/p47 homo-oligomerisiert über die SEP-Domäne und bindet Cdc48/p97 höchstwahrscheinlich als Trimer (Yuan *et al.*, 2004; Beuron *et al.*, 2006). Die daraus resultierende Abdeckung der N-Domäne könnte derart erfolgen, dass keine geeignete Kombination von freien UBX- und BSII-Bindestellen mehr vorhanden ist, die das stabile Ufd1-Npl4 Heterodimer für die Cdc48-Interaktion benötigt. Umgekehrt würde der Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplex dann auch die gleichzeitige Bindung eines Shp1-Oligomers nicht erlauben. Ubx6 und Ubx7 hingegen könnten problemlos mit einzelnen freien UBX-Bindestellen im Cdc48^{Shp1} Komplex interagieren, ebenso

wie der kürzlich identifizierte Cdc48-Interaktor mit UBX-ähnlicher Domäne, Otu1 (Rumpf und Jentsch, 2006).

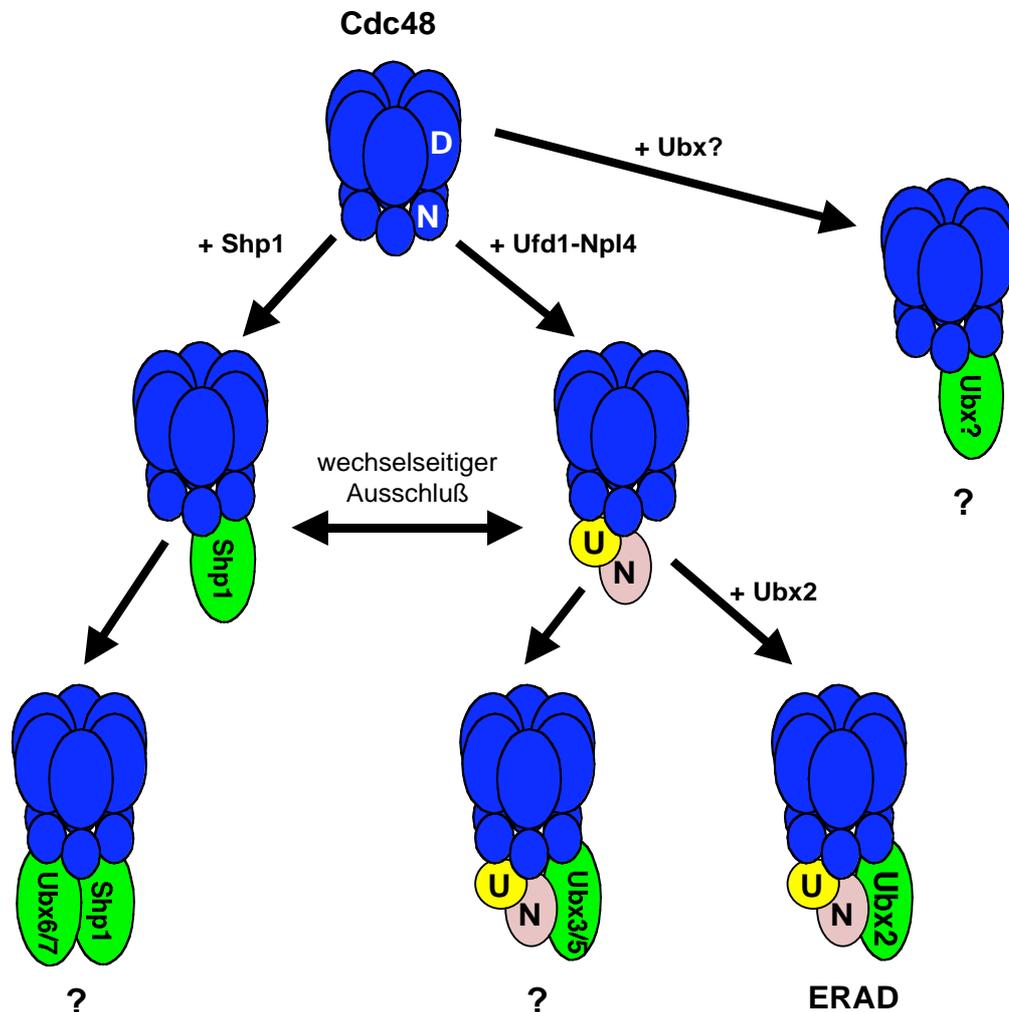


Abb. 25: Zusammensetzung von Cdc48-Komplexen in Hefe. Schematische Darstellung von Cdc48-Adaptorenkomplexen mit möglichen Kombinationen von UBX-Proteinen. Nicht berücksichtigt sind die an die D-Domäne bindenden Kofaktoren Ufd2 und Ufd3, sowie das Substrat-prozessierende Deubiquitinierungsenzym Otu1. U: Ufd1; N: Npl4; ERAD: "ER-assoziierte Protein-Degradation". Das weiße N bezeichnet die N-Domäne, D die beiden AAA-Domänen von Cdc48.

Möglicherweise wird *in vivo* die Interaktion bestimmter Koadaptoren mit Cdc48 durch Shp1 oder Ufd1-Npl4 unterstützt. Dies würde im Fall von Ubx2 nicht nur den Verlust der Rekrutierungsfunktion in *ufd1-2* Mutanten erklären, sondern auch, warum in Ko-Immünpräzipitationsexperimenten keine gleichzeitige Bindung von Ubx2 und Shp1 an Cdc48 beobachtet werden konnte. Für die Ufd1-Koadaptoren Ubx3 und Ubx5 gilt vermutlich ähnliches. Dagegen ist Ubx4 möglicherweise kein Adaptor, sondern spielt eine Rolle bei

der Disassemblierung des Cdc48-Hexameres, wie für das Pflanzen Ubx4-Homologe Pux1 gezeigt wurde (Rancour *et al.*, 2004). Zu Ubx4 wurde außerdem eine zu dieser Arbeit parallele Studie durchgeführt, in der es ebenfalls als Cdc48-Interaktor identifiziert wurde (Decottignies *et al.*, 2004). Dabei wurde auch die Cdc48-Bindung von Ubx6 und Ubx7 gezeigt. Die Analyse von diploiden, homozygoten $\Delta ubx4$ Mutanten ergab einen Defekt in der Sporulation dieser Stämme, der in $\Delta ubx4\Delta ubx6\Delta ubx7$ Dreifachmutanten noch ausgeprägter war. Die genaue Rolle für die korrespondierenden UBX-Proteine bei der Tetraden-Ausbildung bleibt zunächst unklar. Allerdings könnte der beobachtete Phänotyp auf Funktionen bei Membranfusionsprozessen hindeuten, die besonders für Ubx6 und Ubx7 aufgrund ihrer Interaktion mit dem Cdc48^{Shp1} Komplex nicht unerwartet wären.

Weitere Informationen über die Zuordnung von UBX-Proteinen zum Cdc48-Adaptor-System können durch genetische Analysen erhalten werden. Die Gene für die Hauptadaptoren sind entweder essentiell (*UFD1* und *NPL4*) oder führen bei Deletion zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums (*SHP1*). Die Nullmutanten der weiteren *UBX*-Gene zeigen dagegen milde oder keine Phänotypen, allenfalls unter Stressbedingungen. Dies könnte ihrer vorgeschlagenen Aufgabe als Koadaptoren entsprechen, die nur für einzelne Unterfunktionen des Cdc48^{Shp1} oder Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes benötigt werden, wie für Ubx2 im Zusammenhang mit der Funktion von Cdc48^{Ufd1-Npl4} in ERAD gezeigt wurde. Interessanterweise sind alle Doppelmutanten von *UBX2* und weiteren *UBX*-Genen lebensfähig, bis auf die gleichzeitige Deletion von *SHP1*. Der Ausfall zweier Koadaptoren beeinträchtigt die Cdc48-Funktionen also nicht allzu stark. Die synthetische Letalität der Mutanten von *SHP1* und *UBX2* hingegen unterstreicht deren Bedeutung als wichtige Komponenten von distinkten Cdc48-Komplexen.

4.2. UBA/UBX-Proteine als Adaptoren in Ubiquitin-abhängigen Prozessen

Die humanen UBX-Proteine FAF1, p47 und Y33K, sowie deren Orthologe (mit Ausnahme des Y33K-orthologen YDFB aus *S. pombe*) und weitere Vertreter aus den zugehörigen Unterfamilien enthalten UBA-Domänen (Hofmann und Bucher, 1996; Suyama *et al.*, 2000; Buchberger *et al.*, 2001; Hartmann-Petersen *et al.*, 2003). Dabei ist der strukturelle Aufbau mit der UBA-Domäne am N-Terminus konserviert. Im Cdc48-System scheinen die UBA/UBX-Proteine als Kofaktoren für ubiquitinierte Proteine zu wirken: Für die UBX-Proteine Shp1, Ubx2 und Ubx5 konnte die Bindung an ubiquitinierte Proteine gezeigt werden, sowie Funktionen für Shp1 und Ubx2 in Cdc48-vermittelten Proteinabbauwegen. Besonders deutlich wurde dabei die Rolle von Ubx2 als Koadaptor für Cdc48^{Ufd1-Npl4} in ERAD.

In mehreren Studien zu UBA/UBX-Proteinen aus anderen Organismen konnten ähnliche Ergebnisse wie für die Vertreter aus *S. cerevisiae* erhalten werden. Die Ubiquitin-Bindung wurde für die Shp1- und Ubx5-orthologen Proteine aus *Schizosaccharomyces pombe*, Ubx3 bzw. Ubx2, gezeigt und auch Defekte von $\Delta ubx3$ (Shp1) Stämmen bei der Degradation des CDK-Inhibitors Rum1 beschrieben (Hartmann-Petersen *et al.*, 2004). Für Ubx5 (*S.p.* Ubx2) bleibt eine Beteiligung am Proteinabbau allerdings ungeklärt. Für die Säugerproteine FAF1 und SAKS1 (Y33K/2B28) wurden auch Funktionen als p97-Adaptoren für Ubiquitinkonjugate im Proteinabbau gezeigt (McNeill *et al.*, 2004; Ishibashi *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005).

Die UBA/UBX-Proteine erinnern als Adaptoren für ubiquitinierte Proteine stark an die löslichen Substrat-Rezeptoren des Proteasoms, Rad23 und Dsk2. Diese enthalten ebenfalls eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (UBD) sowie eine bzw. zwei UBA-Domänen, über die sie ubiquitinierte Proteine zum Proteasom rekrutieren (Bertolaet *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001; Rao und Sastry, 2002; Elsasser *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2004). Die UBD-Domäne ist dabei für die Interaktion mit dem Proteasom verantwortlich (Hiyama *et al.*, 1999; Elsasser *et al.*, 2002; Funakoshi *et al.*, 2002). Der modulare Aufbau aus

Ubiquitin-ähnlicher- und Ubiquitin-bindender-Domäne scheint für Proteine aus dem Umfeld des Ubiquitin/Proteasom-Systems allgemein charakteristisch zu sein.

Die Bedeutung der UBA-Domäne für die zelluläre Funktion der UBX-Proteine ist allerdings unklar. Denn obwohl die isolierte UBA-Domäne für die Ubiquitin-Interaktion zumindest im Hefe-Zwei-Hybrid-System bzw. *in vitro* ausreichend ist (Abschnitt 3.2.1), sind die UBA-Domänen von Shp1 und Ubx2 *in vivo* für die Kopräzipitation mit Ubiquitinkonjugaten nicht notwendig (Daten nicht gezeigt). Außerdem interagierte Ubx2^{ΔUBA} mit dem ERAD-Substrat Hmg2 genauso gut wie das Vollängenprotein (Abschnitt 3.3.4, Abb. 23a) und Shp1^{ΔUBA} ebenso gut wie Shp1 mit dem Modellsubstrat Ub-P-βGal (Daten nicht gezeigt). Auch in Bezug auf die Phänotypen zeigen Deletionen von UBA-Domänen keine Auswirkung. Der Abbau von ERAD-Substraten verläuft in Ubx2^{ΔUBA} exprimierenden Stämmen so effizient wie im Wildtyp (Abschnitt 3.3.4), und die Wachstumsphänotypen der $\Delta shp1$ Nullmutante werden durch die Expression von Shp1 und Shp^{ΔUBA} gleichermaßen gerettet (Daten nicht gezeigt). Die UBA-Domäne ist also für die zelluläre Funktion der entsprechenden UBX-Proteinen nicht kritisch. Für Ubx2 scheint dies im Widerspruch zu den Schlussfolgerungen einer parallelen Studie zu stehen, in der Ubx2 ebenfalls als Komponente des ERAD-Proteinabbauweges identifiziert wurde (Neuber *et al.*, 2005). In dieser Studie zeigten Stämme mit N-terminal HA-epitopmarkiertem Ubx2 Defekte bei der Degradation der ERAD-Substrate CPY* und Ubc6, allerdings nicht beim Abbau des löslichen Substrats Deg1-GFP. Die Interpretation der Ergebnisse, wonach möglicherweise die Epitopmarkierung zu einer Beeinträchtigung der UBA-Domänen-Funktion führen könnte, und dies in einem spezifischen Defekt für den ERAD-Abbauweg resultiert, ist aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Daten zu Ubx2^{ΔUBA} eindeutig falsch.

Es stellt sich also die Frage nach der Bedeutung der UBA-Domäne für UBA/UBX-Proteine. Bei Endozytose-regulierenden Proteinen kontrollieren Ubiquitin-bindende Domänen wie UIM oder CUE die eigene Mono-Ubiquitinierung, wobei der angehängte Ubiquitinrest dann von der Domäne

gebunden werden kann (Polo *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2003). Eine Ubiquitin-Modifikation ist auch für Shp1, Ubx2 und Ubx5 zu beobachten (Abb. 13c-e und Daten nicht gezeigt), allerdings ist unklar, ob die UBA-Domänen eine Rolle bei dieser Ubiquitinierung spielen. Wahrscheinlicher ist, dass sie als Ubiquitin-bindende Elemente die Interaktion der UBA/UBX-Proteine mit modifizierten Substraten unterstützen, die vermutlich noch über weitere Bindestellen im UBX-Protein erkannt werden. *In vivo* könnten zur Substrat-Bindung außerdem noch die weiteren Komponenten des entsprechenden Cdc48-Komplexes beitragen, so dass die Interaktion des UBX^{ΔUBA}-Proteins mit dem Substrat ähnlich stabil wie die des Wildtyp Proteins ist und seine zelluläre Funktion deshalb nicht beeinträchtigt wird. Klarheit über die physiologische Bedeutung der UBA-Domäne in UBA/UBX-Proteinen kann allerdings nur durch weitere Experimente erhalten werden.

4.3. Der Cdc48^{Shp1} Komplex in Proteinabbauwegen

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass der Cdc48^{Shp1} Komplex auch eine Rolle beim Proteinabbau spielen kann. Eine Verbindung zum Ubiquitin-System wurde zwar bereits im Verlauf der Studien zum Shp1-orthologen p47 hergestellt: die UBA-Domäne von p47 bindet Ubiquitin und ist nötig für die homotypische Membranfusion von Golgi-Vesikeln (Meyer *et al.*, 2002). Allerdings wurde eine Funktion des Proteasoms oder von Ubiquitinketten, die über den Lysinrest K48 verknüpft sind, in diesem *in-vitro*-System ausgeschlossen (Wang *et al.*, 2004). Stattdessen wurde das Deubiquitinierungsenzym VCIP135 als essentieller Kofaktor von p97^{p47} für die Fusion der Golgi-Fragmente identifiziert (Uchiyama *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004), wodurch eine Verbindung von p97^{p47} zum Proteinabbau, zumindest in diesem Kontext, noch unwahrscheinlicher wird. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen hingegen, dass der Cdc48^{Shp1} Komplex an der Degradation des Modellsubstrates Ub-P-βGal beteiligt ist, da das Substrat in $\Delta shp1$ Mutanten klar stabilisiert war, Shp1 mit Ub-P-βGal interagierte (Abschnitt 3.2.2) und einen Anteil von Cdc48 an das Substrat rekrutieren konnte (Daten nicht gezeigt).

Allerdings könnte die Beteiligung von Cdc48^{Shp1} am Abbau von Ub-P-βGal aufgrund der Überexpression des Substrats und der daraus möglicherweise resultierenden Überlastung des Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes zustande kommen. Ob Cdc48^{Shp1} auch für den Abbau endogener Substrate benötigt wird, bleibt zu klären; eine Funktion im ERAD-Abbauweg wurde jedenfalls nicht gefunden (Braun *et al.*, 2002). Für eine Beteiligung von Cdc48^{Shp1} am Proteinabbau sprechen die genetische Interaktion von *SHP1* mit dem Gen für die proteasomale Untereinheit *RPN10*, sowie die Ergebnisse zum Shp1-orthologen Ubx3 aus *S. pombe*, das am Abbau des CDK-Inhibitors Rum1 mitzuwirken scheint (Hartmann-Petersen *et al.*, 2004). Außerdem wurde in HeLa-Zellen bei einem “Knock down” von p47 durch RNA-Interferenz (RNAi) eine Akkumulation von multi-ubiquitinierten Proteinen, also putativen Abbau-Substraten, beobachtet (Wojcik *et al.*, 2004). Ein wichtiger Aspekt für weitere Studien ist auf jeden Fall die Identifizierung endogener Cdc48^{Shp1}-Substrate.

4.4. Ubx2 als Rekrutierungsfaktor im ERAD-Proteinabbauweg

Im Gegensatz zu Shp1 ist die Rolle von Ubx2 in Bezug auf den Proteinabbau klar. Ubx2 kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit eindeutig dem ERAD-Proteinabbauweg zugeordnet werden, und wurde auch in einer parallelen Studie als neue ERAD-Komponente identifiziert (Neuber *et al.*, 2005). Die drei unterschiedlichen ERAD-Substrate CPY*, Hmg2 und KSS waren in Δ ubx2 Stämmen stabilisiert, und die Verstärkung der Abbaufekte unter Stressbedingungen weist darauf hin, dass auch endogene ERAD-Substrate in Abhängigkeit von Ubx2 degradiert werden. Ubx2 ist also eine Komponente eines physiologisch relevanten Proteinabbauweges.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass Ubx2 als Teil des ERAD-Systems und integrales Membranprotein auch einen Einfluss auf den Abbau zytosolischer Proteine wie Ub-P-βGal (diese Arbeit) und Deg1-GFP (Neuber *et al.*, 2005) zeigt. Möglicherweise könnte Ubx2, ähnlich wie die in ERAD involvierte, membranständige Ubiquitin-Ligase Doa10, auch am Abbau von löslichen Substraten mitwirken. Allerdings wurde für die Degradation der

löslichen Doa10-Substrate keine Beteiligung von Cdc48 gefunden (Ravid *et al.*, 2006). Es ist aber durchaus vorstellbar, dass das stark überexprimierte Ub-P-βGal auch zum Teil über den Cdc48^{Ufd1-Npl4-Ubx2} Komplex an der ER-Membran abgebaut wird.

Der Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplex wird in ERAD für den Export von Substraten aus dem ER bzw. von der ER-Membran benötigt. Möglicherweise interagiert Cdc48 dabei bereits mit unmodifizierten Substraten, die durch die Pore ins Zytosol zurück geschleust werden sollen (Ye *et al.*, 2003; Elkabetz *et al.*, 2004), obwohl der Ufd1-Npl4 Adaptor als Rekrutierungsfaktor für ubiquitinierte Proteine eine Interaktion erst nach der Modifikation der Substrate nahe legt (Rape *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002; Richly *et al.*, 2005). Zumindest scheint Cdc48 sowohl für die Retrotranslokation der Proteine aus dem ER-Lumen, als auch für die Solubilisierung der ubiquitinierten Substrate von der zytoplasmatische Seite der ER-Membran notwendig zu sein, bevor diese letztendlich durch das Proteasom abgebaut werden können (Bays *et al.*, 2001b; Jarosch *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2003; Elkabetz *et al.*, 2004). Eine Verknüpfung der Cdc48-Aktivität mit der Ubiquitinierungs-Maschinerie war also zu vermuten. Folgerichtig konnte in dieser Arbeit, sowie in mehreren weiteren Studien (Zhong *et al.*, 2004; Lilley und Ploegh, 2005; Neuber *et al.*, 2005; Schulze *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2005), eine Interaktion von Cdc48 bzw. p97 mit Ubiquitin-Ligasen des ERAD-Systems gezeigt werden. Besonders interessant ist hierbei die Rolle von Ubx2 als Koadaptor für Cdc48^{Ufd1-Npl4}, das für die stabile Bindung des "Segregase"-Komplexes an die E3-Ligasen verantwortlich ist. Die Rekrutierungs-Funktion von Ubx2 für Cdc48^{Ufd1-Npl4} erstreckt sich außerdem auf ERAD-Substrate und putative Komponenten der Dislokationspore (Abb. 26), für die eine Cdc48-Interaktion ebenfalls teilweise schon beschrieben worden war (Rabinovich *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2003; Lilley und Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004). In Bezug auf die Substrate könnte Ubx2 zudem als stabilisierendes Bindeglied fungieren, um eine mögliche Dissoziation des Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplexes vom ERAD-Substrat im Laufe des ATPase-Zyklus zu verhindern. Dadurch würde das mehrfache Einwirken von Cdc48 auf das gleiche Substrat erleichtert und beschleunigt. Eine transiente

Interaktion von Cdc48^{Ufd1-Npl4} mit den ERAD-Substraten und -Komponenten kann hingegen vermutlich auch in $\Delta ubx2$ Stämmen noch stattfinden, da in diesen kein vollständiger Block des ERAD-Abbaus zu beobachten war.

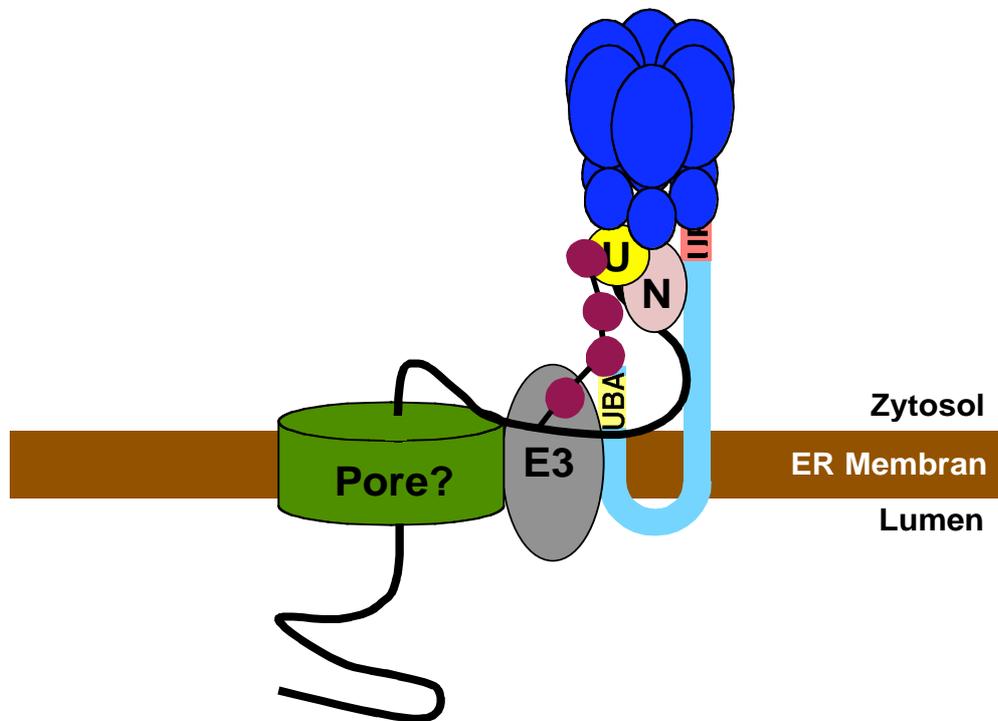


Abb. 26: Ubx2 verbindet stabil verschiedene Komponenten im ERAD-Prozess. Schematische Darstellung der Interaktionen von Ubx2 mit einem ERAD-Substrat (schwarz) und E3 Ubiquitin-Ligasen, sowie möglicherweise indirekt mit Bestandteilen der Retrotranslokationspore. Cdc48 ist in blau abgebildet. U: Ufd1, N: Npl4. Die UBX-Domäne dient als Interaktionsmodul für den Cdc48^{Ufd1-Npl4} Komplex, der durch Ubx2 an das Substrat bzw. Komponenten der ERAD Maschinerie rekrutiert wird. Die UBA-Domäne von Ubx2 interagiert vermutlich mit der auf dem Substrat ausgebildeten Ubiquitinkette, wird allerdings für die stabile Substrat-Interaktion *in vivo* nicht benötigt.

Auf jeden Fall kann Ubx2 als zentrale Komponente in den Mittelpunkt des ERAD-Systems gestellt werden, da es eine dauerhafte Verknüpfung zwischen der "Segregase"-Aktivität von Cdc48 und der Ubiquitinierungsmaschinerie herstellt, mit (möglicherweise indirektem) Kontakt zur Retrotranslokationspore (Abb. 26). Durch diese stabile Verbindung wird eine hohe Effizienz des ERAD-Systems gewährleistet, deren Verlust sich besonders unter Stressbedingungen bemerkbar macht.

Dem Modell entsprechend kann Ubx2 auch als neue "Upstream"-Komponente in den Cdc48-"escort pathway" (Richly *et al.*, 2005) eingeordnet

werden, da es als am weitesten vorgeschalteter Faktor des Cdc48-Systems die Eskortierung des Substrates zum Proteasom einleitet. Nicht nur in diesem Zusammenhang wird es interessant sein, die mechanistischen Details der Ubx2-Funktion in ERAD noch eingehender zu untersuchen.

5. Material und Methoden

Die angewandten mikrobiologischen, molekularbiologischen und biochemischen Methoden richteten sich im Wesentlichen nach Standardprotokollen (Ausubel, 2001; Sambrook, 2001).

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Amersham-Pharmacia, Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Difco, Fluka, Invitrogen, Kodak, Merck, New England Biolabs, Promega, Roth, Roche, Riedel de Haen, Serva und Sigma verwendet. In nahezu allen der unten beschriebenen Methoden wurden sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt.

5.1. Material

5.1.1 Computeranalysen

Datenbank-Recherchen wurden mit Hilfe folgender Internetdienste durchgeführt: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), SwissProt (<http://www.expasy.ch>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Als Informationsdatenbanken für Hefegene wurden sowohl die "Saccharomyces Genome Database" (SGD, <http://www.yeastgenome.org>) als auch "Yeast Proteome Database" (YPD, <http://www.proteome.com>) benutzt.

Für Sequenzanalysen wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA-Star Inc.) oder DNA Strider 1.3 verwendet. Röntgenfilme und Gele wurden mit einem AGFA-Scanner (AGFA Arcus II) oder mit einer CCD-Kamera und mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) digitalisiert. Graphiken, Abbildungen und Texte wurden mit Adobe Illustrator oder Programmen des Microsoft Office Paketes (Microsoft Corp.) erstellt.

5.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft	Immunblot	IP ^a	IF ^b
anti-HA F-7, monoklonal	Santa Cruz	1 : 5 000	1-1,5 µg	
anti-HA Y-11, polyklonal	Santa Cruz	1 : 2 000		
anti-Myc 9E10, monoklonal	Santa Cruz	1 : 2 500	1-1,5 µg	1 : 80
anti-Myc A-14, polyklonal	Santa Cruz	1 : 1 000	1-1,5 µg	
anti-Dpm1, monoklonal	Molecular Probes	1 : 1 000	2 µg	
anti-Ubiquitin, P4D1 monoklonal	Santa Cruz	1 : 2 000	-	
anti-βGal, monoklonal	Promega	1 : 5 000	2 µg	
Rabbit anti-Cdc48	Stefan Jentsch	1 : 5 000	ca. 2 µg	
Rabbit anti-Ufd1	Stefan Jentsch	1 : 1 000	ca. 1 µg	
Rabbit anti-Shp1	Stefan Jentsch	1 : 5 000	-	
Rabbit anti-Ubx2-N	AK gegen die UBA-Domäne von Ubx2	1 : 5 000	-	
Rabbit anti-Ubx2-C	AK gegen die UBX-Domäne von Ubx2	1 : 3 000	-	
Rabbit anti-Ubx4	AK gegen die UBX-Domäne von Ubx4	1 : 3 000	-	
Rabbit anti-Ubx5	AK gegen die UBA-Domäne von Ubx5	1 : 5 000	-	
Rabbit anti-Sec61	Thomas Sommer	-	-	1 : 50 bis 1 : 200
Rabbit anti-Kar2	Matthias Seedorf	1 : 20 000	-	-
Peroxidase-gekoppelter Goat anti-Mouse	Dianova	1 : 5 000	-	-
Peroxidase-gekoppelter Goat anti-Rabbit	Dianova	1 : 5 000	-	-
Fluorescein-gekoppelter Horse anti-Mouse	Vector Laboratories	-	-	1 : 200
Texas Red-gekoppelter Goat anti-Rabbit	Vector Laboratories	-	-	1 : 100

^aIP: Immunpräzipitation; ^bIF: Immunfluoreszenz

5.1.3 *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)]*

5.1.4 *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.

5.1.5 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tabelle 3: Verwendete Hefestämme

Name	Genotyp	Referenz
DF5	Mata oder Mata α ; <i>trp1-1, ura3-52, his3Δ200, leu2-3,211, lys2-801</i>	(Finley <i>et al.</i> , 1987)
PJ69-4A	Mata, <i>trp1-901, leu2-3,-112, ura3-52, his3Δ200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1-HIS3, met2::GAL7-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)
YPH499	Mata, <i>ura3-52, lys2-801amber, ade2-101ochre, trp1Δ63, his3Δ200, leu2Δ1</i>	(Sikorski und Hieter, 1989)
Shp1 ^{HA} /YCS168	YPH499; <i>SHP1-3HA::kanMX6</i>	diese Arbeit
Ubx2 ^{HA} /YCS178	YPH499; <i>YML013w-3HA::kanMX6</i>	diese Arbeit
Ubx3 ^{HA} /YCS056	YPH499; <i>YDL091c-3HA::kanMX6</i>	diese Arbeit
Ubx4 ^{HA} /YCS186	YPH499; <i>YMR067c-3HA::kanMX6</i>	diese Arbeit
Ubx5 ^{HA} /YCS106	YPH499; <i>YDR330w-3HA::kanMX6</i>	diese Arbeit
Ubx6 ^{HA} /YCS285	YPH499; <i>YJL048c-3HA::kanMX6</i>	diese Arbeit
Ubx7 ^{HA} /YCS292	YPH499; <i>YBR273c-3HA::kanMX6</i>	diese Arbeit
Shp1 ^{Myc} /YCS160	YPH499; <i>SHP1-9MYC::kITRP1</i>	diese Arbeit
Ubx2 ^{Myc} /YCS162	YPH499; <i>YML013w-9MYC::kITRP1</i>	diese Arbeit
Ubx3 ^{Myc} /YCS064	YPH499; <i>YDL091c-9MYC::kITRP1</i>	diese Arbeit
Ubx4 ^{Myc} /YCS163	YPH499; <i>YMR067c-9MYC::kITRP1</i>	diese Arbeit
Ubx5 ^{Myc} /YCS081	YPH499; <i>YDR330w-9MYC::kITRP1</i>	diese Arbeit
Ubx6 ^{Myc} /YCS097	YPH499; <i>YJL048c-9MYC::kITRP1</i>	diese Arbeit
Ubx7 ^{Myc} /YCS104	YPH499; <i>YBR273c-9MYC::kITRP1</i>	diese Arbeit
Δ shp1/Y0843	DF5 α ; <i>Δshp1::kanMX6</i>	(Braun <i>et al.</i> , 2002)
<i>ufd1-2</i> /Y0472	DF5 α ; <i>ufd1-2</i>	(Rape <i>et al.</i> , 2001)
Δ ubx2/YCS299	DF5 α ; <i>Δyml013w::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx2/YCS297	DF5 α ; <i>Δyml013w::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx2/YCS301	DF5 α ; <i>Δyml013w::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx2/YCS305	DF5 α ; <i>Δyml013w::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx3/YCS260	DF5 α ; <i>Δyd1091c::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx3/YCS262	DF5 α ; <i>Δyd1091c::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx4/Y0845	DF5 α ; <i>Δymr067c::HIS3MX6</i>	R. Albang und S. Jentsch, unpubliziert
Δ ubx4/Y0846	DF5 α ; <i>Δymr067c::HIS3MX6</i>	R. Albang und S. Jentsch, unpubliziert
Δ ubx5/YCS274	DF5 α ; <i>Δydr330w::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx5/YCS275	DF5 α ; <i>Δydr330w::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx6/YCS093	DF5 α ; <i>Δyjl048c::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx6/YCS095	DF5 α ; <i>Δyjl048c::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx7/YCS269	DF5 α ; <i>Δybr273c::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx7/YCS268	DF5 α ; <i>Δybr273c::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ rpn10/Y0581	DF5 α ; <i>Δrpn10::HIS3</i>	(Koegl <i>et al.</i> , 1999)
Δ rpn10 Δ shp1/YCS326	DF5 α ; <i>Δrpn10::HIS3, Δshp1::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ rpn10 Δ ubx2/YCS323	DF5 α ; <i>Δrpn10::HIS3, Δubx2::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ shp1 Δ ubx4/Y0871	DF5 α ; <i>Δshp1::KanMX6, Δubx4::HIS3MX6</i>	R. Albang und S. Jentsch, unpubliziert
Δ shp1 Δ ubx2 shuffle1/YAB291	DF5 α ; <i>Δshp1::KanMX6, Δubx2::HIS3MX6 pYC33-SHP1</i>	diese Arbeit
Δ shp1 Δ ubx2 shuffle2/YAB286	DF5 α ; <i>Δshp1::KanMX6, Δubx2::HIS3MX6 pYC33-UBX2</i>	diese Arbeit
Δ ubx2 Δ ubx3/YAB471	DF5 α ; <i>Δubx2::HIS3MX6, Δubx3::KanMX6</i>	diese Arbeit
Δ ubx2 Δ ubx4/YCS417	DF5; <i>Δubx2::KanMX6, Δubx4::HIS3MX6</i>	diese Arbeit

$\Delta ubx2\Delta ubx5/YCS424$	DF5; $\Delta ubx2::HIS3MX6$, $\Delta ubx5::KanMX6$	diese Arbeit
$\Delta ubx2\Delta ubx6/YCS440$	DF5; $\Delta ubx2::HIS3MX6$, $\Delta ubx6::KanMX6$	diese Arbeit
$\Delta ubx2\Delta ubx7/YCS337$	DF5 α ; $\Delta ubx2::HIS3MX6$, $\Delta ubx7::KanMX6$	diese Arbeit
RHY400/Y0624	Mata; <i>ade2-101</i> , <i>met2</i> , <i>lys2-801</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>ura3-52</i> , <i>pGAPDH-6MYC-</i> <i>HMG2::URA3</i> , <i>hmg1::LYS2</i> , <i>hmg2::HIS3</i>	(Hampton <i>et al.</i> , 1996)
RHY $\Delta ubx2/YCS389$	RHY400; $\Delta ubx2::KanMX6$	diese Arbeit

5.1.6 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).

SD-Medium: 2% Glukose

0,67% Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco)

ergänzt mit 20 μ g/ml Uracil sowie den auxotrophen Aminosäuren

30 μ g/ml L-Lysin, 60 μ g/ml L-Leucin, 20 μ g/ml L-Histidin und

40 μ g/ml L-Tryptophan

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)

YPD- und SC-Platten mit Zusätzen: Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf unter 50 °C wurden Cycloheximid, CdCl₂, Ethanol, 5-Fluoroorotat (5-FOA), p-Fluoro-L-Phenylalanin in den angegebenen Mengen zugegeben und die Platten gegossen.

5.1.7 Plasmide

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung/Referenz
pYCplac33, pYCplac111, pYEplac181, pYEplac195	(Gietz und Sugino, 1988)
pGAD-C1, -C2, -C3	(James <i>et al.</i> , 1996)

pGBD-C1, -C2, -C3	(James <i>et al.</i> , 1996)
pGBT9-CDC48	(Braun <i>et al.</i> , 2001)
pGAD424-CDC48	(Koegl <i>et al.</i> , 1999)
pGBT9-SHP1	S. Thoms und S. Jentsch, unpubliziert
pGAD424-SHP1	(Braun <i>et al.</i> , 2001)
pGBD-UBX2	<i>YML013w</i> Volllänge fusioniert an GAL4-BD
pGAD-UBX2	<i>YML013w</i> Volllänge fusioniert an GAL4-AD
pGBD-UBX3	<i>YDL091c</i> Volllänge fusioniert an GAL4-BD
pGAD-UBX3	<i>YDL091c</i> Volllänge fusioniert an GAL4-AD
pGBD-UBX4	<i>YMR067c</i> Volllänge fusioniert an GAL4-BD
pGAD-UBX4	<i>YMR067c</i> Volllänge fusioniert an GAL4-AD
pGBD-UBX5	<i>YDR330w</i> Volllänge fusioniert an GAL4-BD
pGAD-UBX5	<i>YDR330w</i> Volllänge fusioniert an GAL4-AD
pGBD-UBX6	<i>YJL048c</i> Volllänge fusioniert an GAL4-BD
pGAD-UBX6	<i>YJL048c</i> Volllänge fusioniert an GAL4-AD
pGBD-UBX7	<i>YBR273c</i> Volllänge fusioniert an GAL4-BD
pGAD-UBX7	<i>YBR273c</i> Volllänge fusioniert an GAL4-AD
pGBD-SHP1 ^{ΔUBX}	AS 1-348 von Shp1 fusioniert an GAL4-BD
pGBD-UBX2 ^{ΔUBX}	AS 1-430 von Ubx2 fusioniert an GAL4-BD
pGBD-UBX3 ^{ΔUBX}	AS 1-359 von Ubx3 fusioniert an GAL4-BD
pGAD-UBX5 ^{ΔUBX}	AS 1-419 von Ubx4 fusioniert an GAL4-AD
pGAD-SHP1 ^{UBX}	AS 341-423 von Shp1 fusioniert an GAL4-AD
pGAD-UBX2 ^{UBX}	AS 429-581 von Ubx2 fusioniert an GAL4-AD
pGAD-UBX3 ^{UBX}	AS 353-455 von Ubx3 fusioniert an GAL4-AD
pGAD-UBX4 ^{UBX}	AS 278-358 von Ubx4 fusioniert an GAL4-AD
pGAD-UBX5 ^{UBX}	AS 417-500 von Ubx5 fusioniert an GAL4-AD
pGAD-UBX6 ^{UBX}	AS 180-273 von Ubx6 fusioniert an GAL4-AD
pGAD-UBX7 ^{UBX}	AS 207-295 von Ubx7 fusioniert an GAL4-AD
pGBD-SHP1 ^{UBA}	AS 1-47 von Shp1 fusioniert an GAL4-BD
pGBD-UBX2 ^{UBA}	AS 13-60 von Ubx2 fusioniert an GAL4-BD
pGBD-UBX5 ^{UBA}	AS 1-43 von Ubx5 fusioniert an GAL4-BD
pGAD424-2xUb	N. Colomina und S. Jentsch, unpubliziert
pGAD424-4xUb	N. Colomina und S. Jentsch, unpubliziert
pUb ^{myc}	(Seufert und Jentsch, 1991)
pUb-Pro-βGal	(Bachmair <i>et al.</i> , 1986)
pUb-Met-βGal	(Bachmair <i>et al.</i> , 1986)
pUb-Arg-βGal	(Bachmair <i>et al.</i> , 1986)
pYC-SHP1	Ein genomisches Fragment, ca. -500 bp bis 200 bp nach Stop von <i>SHP1</i> wurde in pYCplac33 kloniert
pYC-UBX2	Ein genomisches Fragment, ca. -500 bp bis 200 bp nach Stop von <i>UBX2</i> wurde in pYCplac33 kloniert
pYCL-UBX2	Ein genomisches Fragment, ca. -500 bp bis 200 bp nach Stop von <i>UBX2</i> wurde in pYCplac111 kloniert
pYE-UBX2	Ein genomisches Fragment, ca. -500 bp bis 200 bp nach Stop von <i>UBX2</i> wurde in pYEplac195 kloniert
pYC-UBX2 ^{ΔUBX}	AS 1-431 von Ubx2 mit <i>UBX2</i> -Promotor und -Terminator wurden in pYCplac33 kloniert
pYCL-UBX2 ^{ΔUBX}	AS 1-431 von Ubx2 mit <i>UBX2</i> -Promotor und -Terminator wurden in pYCplac111 kloniert
pYE-UBX2 ^{ΔUBX}	AS 1-431 von Ubx2 mit <i>UBX2</i> -Promotor und -Terminator wurden in pYEplac195 kloniert
pYC-UBX2 ^{ΔUBA}	Im genomischen Fragment von <i>UBX2</i> in pYCplac33 wurden die AS 14-58 durch eine <i>Bam HI</i> -Schnittstelle ersetzt
pYCL-UBX2 ^{ΔUBA}	Im genomischen Fragment von <i>UBX2</i> in pYCplac111 wurden die AS 14-58 durch eine <i>Bam HI</i> -Schnittstelle ersetzt

pCT51	Plasmid zur Expression von CPY* ^{3HA} (Jarosch <i>et al.</i> , 2002)
pRH244	Integratives Plasmid zur Expression von ^{6myc} Hmg2 (Hampton <i>et al.</i> , 1996)
pSM114	Plasmid zur Expression von KSS ^{3HA} (Vashist und Ng, 2004)

5.2. Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Restriktionsverdau

Puffer- und Verdaubedingungen richteten sich nach den Anweisungen der Enzym-Hersteller (New England Biolabs).

5.2.2 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 detektiert 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.

5.2.3 Ligation

Insert und Vektor wurden in einem Massenverhältnis 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.

5.2.4 Sequenzierung

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

5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für Plasmid-PCR oder PCR von genomischer DNA aus Hefe wurde Pfu-Turbo Polymerase (Stratagene) verwendet, bei langen Primern (ab ca. 45 Basen) wurde auch Taq Polymerase zugesetzt. Das Reaktionsprofil wurde jeweils dem Primer-Schmelzpunkt 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 das folgende Programm:

- 94 °C, 4 min
- 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 plus 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.

5.3. Methoden mit *E. coli*

5.3.1 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.

5.3.2 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 OD₆₀₀ 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. Anschließend wurden die Zellen erneut 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 erneut abzentrifugiert, in 250 ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen und weitere 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml 10% Glycerin gewaschen, in 1,5 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert, aliquotiert und in Flüssigstickstoff eingefroren.

5.3.3 Transformation von Bakterienzellen

Die kompetenten Zellen wurden kurz vor der Transformation auf Eis aufgetaut. Bei chemisch-kompetenten Zellen wurden 1 μ l einer Plasmid-Minipreplösung oder 5-10 μ l Ligationsansatz mit 50 μ l kompetenten Zellen gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach 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 Selektionsplatten ausgestrichen.

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

5.4. Methoden mit *Saccharomyces cerevisiae*

5.4.1 Transformation von Hefezellen

Herstellung kompetenter Hefezellen (Knop et al., 1999)

Eine Übernachtskultur im entsprechenden Selektionsmedium wurde im Verhältnis 1:20 verdünnt und bei Raumtemperatur bis zu einer OD_{600} von 0,7 geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2000 rpm, 23 °C, 5 min) und im 0,5-fachen Volumen an sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Hefepellet im 0,1-fachen Volumen SORB (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mM Lithiumacetat; 1 M Sorbitol) aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde das überstehende SORB komplett abgenommen. Die Zellen wurden in je 360 µl SORB pro 50 ml ursprünglichen Kulturvolumens resuspendiert. Nach Zugabe von 40 µl denaturierter Einzelstrang-DNA wurde die Suspension á 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Transformation kompetenter Hefezellen (Knop et al., 1999)

Für eine Transformation mit gereinigter Plasmid-DNA wurden 10 µl, für die Transformation mit PCR-Produkt 50 µl kompetenter Hefezellen eingesetzt. Die DNA wurde zu den Zellen gegeben und mit dem 6-fachen Volumen TE/PEG versetzt (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mM Lithiumacetat; 40% PEG3350). Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde 1/9-Volumen an DMSO zugegeben. Nach einem Hitzeimpuls (15 min, 42 °C) wurden die Hefen zentrifugiert, in ddH₂O resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Bei Kanamycin-Resistenz wurden die Hefezellen in 3 ml YPD-Medium resuspendiert, 2 bis 3 Stunden bei 30 °C geschüttelt und nach Zentrifugation und Aufnahme in ddH₂O auf YPD-G418-Platten ausplattiert.

Integrative Transformation über homologe Rekombination

Integrative Plasmide (Ylp) enthalten nur einen Selektionsmarker, aber keine autonomen Replikationselemente. Sie können nur nach Integration in das

Hefegenom über homologe Rekombination stabil vererbt werden. Das integrative Plasmid pRH244 wurde zunächst durch die Restriktions-Endonuklease *Stu I* im Markergen linearisiert und anschließend wie oben beschrieben transformiert.

5.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus Hefezellen

2 ml einer Übernachtskultur in YPD oder entsprechendem Selektionsmedium wurde abzentrifugiert und in 400 µl Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2% Triton X-100; 1% SDS) resuspendiert. Zu der Suspension wurden 400 µl Phenol/Cholorphorm/Isoamylalkohol (25/24/1) sowie Glasperlen gegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur etwa 5 min auf dem Vortex-Schüttler geschüttelt, 200 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) zugegeben und erneut für 1 min geschüttelt. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge (14 000 rpm, 10 min, 23 °C) wurde der wässrige Überstand abgenommen und die DNA durch Zugabe von 1 ml 100% Ethanol gefällt. Die DNA wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, 15 min bei 37 °C getrocknet und anschließend in 50 µl TE/RNase (100 µg/ml RNase) für 30 min bei 50 °C resuspendiert.

5.4.3 Analyse von Hefemutanten

Kreuzung von Hefestämmen

Übernachtskulturen zweier Hefestämmen unterschiedlichen Paarungstyps (alpha und a) wurden im Verhältnis 1:20 verdünnt und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 geschüttelt. Je 10 µl Hefesuspension wurden übereinander auf eine YPD-Platte getropft und diese drei Stunden bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss konnten fusionierte Hefezellen entweder aufgrund kombinierter Markerselektion oder aufgrund ihrer typischen Morphologie ("Sombrero", "Mercedes-Stern") identifiziert und isoliert werden.

Tetradenanalyse

500 µl einer stationären, diploiden Hefekultur wurden für 2 min bei 3500 rpm, Raumtemperatur, abzentrifugiert. Das Hefepellet wurde zweimal mit 1 ml

ddH₂O gewaschen und die Zellen anschließend in 5 ml Sporulationsmedium (2% Kaliumacetatlösung) aufgenommen. Nach 3 bis 4 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 µl dieser Kultur mit 10 µl Zymolyase-Lösung (Seikaguko, 0,5 mg/ml in SP-Puffer: 0.1 M Kaliumphosphat pH 6,5; 1,2 M Sorbitol) vorsichtig gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension strichförmig auf einer YPD-Platte ausgezogen. Die Trennung der Tetraden und das Isolieren der Sporen erfolgte mit einem Mikromanipulator (Singer MSM Systems). Zur Germination der Sporen und Wachstum der Kolonien wurden die Platten mehrere Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

Serielle Verdünnungsreihen

Für die Analyse von Hefemutanten wurden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf Platten des entsprechenden Selektionsmediums oder auf Platten mit den angegebenen Zusätzen getüpfelt. Übernachtskulturen des Hefestammes im entsprechenden Wachstumsmedium wurden mit ddH₂O auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und vier weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:5 pipettiert. Je 5 µl jeder Verdünnung wurden nebeneinander auf die Platten getüpfelt und unter den gewünschten Bedingungen inkubiert.

5.4.4 Nachweis der Interaktion zweier Proteine im Zwei-Hybrid-System

Die kodierende Sequenz eines der zu untersuchenden Gene wurde im Leseraster hinter die aktivierende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (pGAD-C Vektor) kloniert (James *et al.*, 1996). Die Information des anderen Proteins wurde entsprechend hinter die DNA-bindende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (pGBD-C Vektor) kloniert. Der Hefestamm PJ69-4a wurde mit beiden Vektoren sowie mit den jeweiligen Leervektoren als Kontrolle transformiert. Transformierte Hefezellen wurden auf SC-Leu-Trp-Platten bei 30°C angezogen und anschließend deren Wachstum auf SC-Leu-Trp-His- oder SC-Leu-His-Ade-Reporterplatten analysiert.

5.5. Proteinbiochemische Methoden

5.5.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Meist wurden 6%-, 8%- oder 10%-Gele 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; 1,5% DTT; 0,1% Bromphenolblau) verwendet.

5.5.2 Western Blot

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe einer "Semi-dry" Blotapparatur auf eine in Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0.01% SDS; 20% Methanol) eingeweichte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Der Transfer erfolgte mit einem konstanten Strom von 150 mA pro Gel (entspricht 2.4 mA/cm²) für mindestens 2 h oder über Nacht. Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurde die Membran zunächst für 1 h in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-T (25 mM Tris pH 7,5; 137 mM NaCl; 2.6 mM KCl; 0.1% Tween20) blockiert. Danach erfolgte für 2-3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C die Inkubation mit dem primären Antikörper in 5% Magermilchpulver in TBS-T (Verdünnungen siehe Tabelle 2). Die Membran wurde 5-6 mal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend für 1 h mit HRP-konjugiertem sekundärem Antikörper inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen mit TBS-T wurden gebundene Antikörper mittels Chemilumineszenz (ECL Detection Kit, Amersham) nach Herstellerangaben auf ECL-Hyperfilmen oder durch Aufnahme mit Hilfe einer CCD-Kamera (LAS, Fuji) nachgewiesen.

5.5.3 Herstellung eines Proteinextraktes

Herstellung eines Proteinextraktes unter nativen Bedingungen

Eine Hefesuspension (maximale OD₆₀₀ von 1.5, 50-100 ml) wurde bei Raumtemperatur abzentrifugiert (2000 rpm, 5 min), einmal mit eiskaltem

Wasser gewaschen und in 250 μ l eiskaltem Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5; 100 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 10% Glycerin; 0.1% Nonidet P-40; 2 mM PMSF; 2 mM Benzamidin, Boehringer "Complete Protease Inhibitors"; Proteasom-Inhibitor MG132) aufgenommen. Zu der Mischung wurden bis ca. 2 mm unter den Meniskus Glasperlen (Glass beads, acid-washed, R 425-600 μ m, Sigma) zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden daraufhin je 30 sec auf dem Vortex-Schüttler geschüttelt und 30 sec auf Eis abgekühlt. Der Vorgang wurde vier- bis fünfmal wiederholt und eventuell die Detergenz-Konzentration auf 0.5% oder 1.0% erhöht. Die Zelldebris wurde durch eine 5-minütige Zentrifugation (2 600 g, 4 °C) entfernt und der Überstand wurde entweder mit Probenpuffer versetzt oder für weitere Experimente verwendet.

Herstellung eines Proteinextraktes unter denaturierenden Bedingungen

Eine Hefekultur (OD_{600} 1, 1 ml) wurde bei Raumtemperatur abzentrifugiert (14 000 rpm, 2 min) und in 1 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 150 μ l NaOH/ β -Me (1.85 M NaOH; 140 mM β Mercaptoethanol) wurde die Suspension für 15 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden anschließend mit 150 μ l 55%-iger Trichloressigsäure für 10 min auf Eis gefällt und abzentrifugiert (14 000 rpm, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 50 μ l HU-Puffer resuspendiert, 15 min bei 65°C geschüttelt und in der SDS-Gelelektrophorese analysiert (meist 5 μ l).

5.5.4 Analyse der Proteinwechselwirkung durch Immunpräzipitation

Die Wechselwirkung von Proteinen *in vivo* wurde meist durch Ko-Immunpräzipitationen untersucht. Hefekulturen wurden in YPD oder selektivem Medium über Nacht bei 30 °C angezogen, auf eine OD_{600} von 0,2 in 50 oder 100 ml verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0.8 bis 1,8 wachsen gelassen. Im Hmg2-Immunpräzipitationsexperiment mit den thermosensitiven Stämmen wurden die Kulturen bei einer OD_{600} von ca. 0,8 für drei Stunden bei der restriktiven Temperatur (37 °C) geschüttelt. Die Hefezellen wurden bei 2000 rpm, 4 °C, für 5 min abzentrifugiert, einmal mit eiskaltem ddH₂O

gewaschen und in 260 μ l (50 ml Ansätze) bzw. 300 μ l Lysepuffer (100 ml Ansätze) aufgenommen. Es wurden folgende Lysepuffer verwendet:

LP-A (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 10% Glycerin; 0,1% Nonidet P40)

LP-B (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 10% Glycerin; 0,1% Nonidet P40).

Als Protease-Inhibitoren wurden stets 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 2 mM Benzamidin und ein "Complete Protease Inhibitors" Mix (Roche Diagnostics, Mannheim) zugegeben. Für Experimente mit (putativen) Abbau-Substraten wurde außerdem 20 μ M Proteasom-Inhibitor MG132 zugesetzt. Bei den Immunpräzipitationsexperimenten mit Ubiquitin und dem Ub-P- β Gal Fusionsprotein wurde der Puffer LB-C (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1% Nonidet P40; 2 mM PMSF; 2 mM Benzamidin; 20 mM N-Ethylmaleimid (NEM); 20 μ M MG132) verwendet.

Nach Zugabe von Glasperlen (ca. 400 μ L Volumen) wurden die Hefezellen durch starkes Schütteln auf dem Vortex-Schüttler (5-6 x 30 sec, dazwischen 30 sec auf Eis) lysiert und in einigen Fällen anschließend die Detergenz-Konzentration auf 0,5% (Experimente zur Interaktion von UBX-Proteinen mit Cdc48, Shp1 und Ufd1) bzw. 1,0% NP-40 (Interaktionen von Cdc48, Ubx2 und Ufd1 mit ERAD-Substraten bzw. -Komponenten) erhöht. Die Zellbruchstücke wurden bei 2 600 g, 4 °C, 5 min abgetrennt, unter Umständen wurde das Lysat auch durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt bei 20 000 g, 4 °C, 25 min, geklärt. Ein Aliquot des Überstandes wurde mit HU-Puffer versetzt und bei 65 °C für 10 min denaturiert (Input Probe). Zu den Überständen wurden 1-2 μ g Antikörper zugegeben und die Lösung über Nacht auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper/Antigen-Komplexe durch Zugabe von Protein A- oder Protein G-Sepharose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) gefällt. Die Reaktionen wurden viermal gewaschen (zweimal mit LP mit erhöhter Detergenz-Konzentration), in 20-25 μ l HU-Puffer denaturiert und durch Gelelektrophorese und Immunoblot analysiert. In der Regel wurden als Input

2% und von der immunpräzipitierten Probe 33% der anfänglich eingesetzten Zellsatmenge auf das SDS-Gel geladen.

5.5.5 Analyse der Proteinlokalisierung

Indirekte Immunfluoreszenz

Die Hefezellen wurden in steril filtriertem, nicht autoklaviertem Selektionsmedium bis zu einer OD_{600} von 1 inkubiert. Zur Fixierung der Proteine wurden 1/9 vol Kaliumphosphatlösung, pH 6,5 und 1/9 vol 37% Formaldehyd (Sigma) zum Medium zugegeben und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig mit SP-Puffer (0.1 M Kaliumphosphat, pH 6.5, 1.2 M Sorbitol) gewaschen (3 x bei 2000 rpm, 4 °C, 5 min) und in 900 µl SPβ-Puffer (10 ml SP-Puffer mit 14 µl β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Zymolyase 100T (2.5 mg/ml in SPβ) wurde die Suspension für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit SP-Puffer gewaschen und anschließend in 200 µl PBSB-Puffer (PBS + 1 µg/ml BSA) aufgenommen. Zum Anheften der Zellen wurde die Zellsuspension auf zuvor mit Poly-Lysin beschichtete Objektträger (ICN Biomedicals Inc.) gegeben und nach 10 min wieder abgesaugt. Anschließend wurde der Objektträger bei -20 °C für 5 min in Methanol inkubiert und in Aceton für 30 sec gewaschen (-20 °C). Die Zellen wurden für 40-60 Minuten mit PBSB-Lösung überschichtet und über Nacht mit entsprechendem primärem Antikörper der geeigneten Verdünnung in PBSB in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf dem Objektträger vorsichtig gewaschen (5 x mit PBSB-Puffer) und anschließend mit Fluorophor-markiertem sekundären Antikörper in PBSB-Puffer für 2 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBST (PBS-Puffer mit 1% Triton X-100) und PBSB-Puffer (6x) wurde 3 µl DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol, 2,5 µg/ml in 50% Glycerin) zugegeben. Die Proben wurden mit Nagellack versiegelt und im Mikroskop (Leica DM RXA) analysiert. Bilder wurden mit einer Hamamatsu C-4742-95 Digitalkamera aufgenommen und mit dem Software-Programm OpenLab (Improvision, Coventry, UK) bearbeitet.

Analyse der Membran-Assoziation eines Proteins

Eine Hefekultur wurde in 30-50 ml YPD oder selektiven Medium bei der gewünschten Temperatur zu einer OD_{600} von 1 angezogen. Nach Zentrifugation bei 2 000 rpm, 4 °C, 5 min wurden die Hefezellen in 10 ml D-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,8; 10 mM DTT) für 10 min gewaschen, erneut zentrifugiert und mit SP-Puffer gewaschen (1.2 M Sorbitol; 10 mM Kaliumphosphat pH 7,7). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SP-Puffer resuspendiert und mit 50 bis 100 Units ZymoYlase 100T bei 30 °C für 25 min inkubiert. Die Spheroplasten wurden durch Zentrifugation bei 2 000 g, 4 °C, 5 min, geerntet und zweimal mit SP-Puffer gewaschen, bevor sie in 1 ml Lysepuffer LP-M (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,3 M Sorbitol; 1 mM EDTA; 2 mM PMSF; 2 mM Benzamidin; "Complete Protease Inhibitors"-Mix) aufgenommen wurden. Danach wurden die Zellen in einem Wheaton Zellhomogenisator durch 15 Schläge unter Eiskühlung aufgebrochen und größere Zellbruchstücke durch Zentrifugation bei 800 g, 4 °C, 5 min abgetrennt. Ein Aliquot (40 µl) des Überstandes wurden entnommen, mit TCA gefällt und in HU-Puffer bei 65°C denaturiert (Totalextrakt). 400 µl des Lysates wurden bei 20 000 g, 4 °C, 30 min zentrifugiert, um die Fraktionen P20 (Pellet) und S20 (löslicher Überstand) zu erhalten. Das Pellet wurde in HU-Puffer resuspendiert und bei 37 °C für eine Stunde denaturiert. Ein Aliquot der löslichen Fraktion wurde mit TCA gefällt und ebenfalls in HU-Puffer denaturiert (65 °C). Gegebenenfalls wurde die Hälfte des erhaltenen Überstandes S20 nochmals bei 100 000 g, 4 °C, 1 h zentrifugiert um die Pellet-Fraktion P100 und einen weiteren löslichen Überstand S100 zu erhalten. Gleiche Teile des Totalextrakts und der verschiedenen Fraktionen wurden schließlich im Immunblot auf die Anwesenheit des gewünschten Proteins analysiert.

Um zu überprüfen, ob ein Protein peripher mit der Membran assoziiert oder integraler Bestandteil der Membran ist, wurde der Totalextrakt in mehrere Aliquots (je 200 µl) aufgeteilt und bei 20 000 g, 4 °C, 30 min zentrifugiert. Die erhaltenen Pellet-Fraktionen P wurden in 200 µl LP-M, LP-M mit 0,6 M NaCl, LP-M mit 0,2 M Na_2CO_3 (ca. pH 11,0), LP-M mit 0,1% Triton

X-100 oder LP-M mit 1,0% Triton X-100 resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze erneut bei 20 000 g, 4 °C, 30 min zentrifugiert, der lösliche Überstand mit TCA gefällt und ebenso wie das Pellet in HU-Puffer denaturiert. Die Proteinproben wurden anschließend im Immunoblot untersucht.

“Protease Protection Assay”

Um die Topologie eines integralen Membranproteins zu bestimmen, wurden Hefezellen wie bei oben bei den Membran-Fraktionierungsexperimenten beschrieben lysiert, allerdings enthielt der Puffer LP-M keine Protease-Inhibitoren. Der Totalextrakt wurde aufgeteilt und mit Proteinase K (0,2 mg/ml), Proteinase K und 1% Triton X-100, oder ohne Zusatz für 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM PMSF gestoppt und die Ansätze mit TCA gefällt. Nach der Denaturierung in HU-Puffer wurden die Proteinproben im Immunoblot analysiert.

5.5.6 Analyse der Proteinstabilität

Analyse der Proteinstabilität im “Shut off” Experiment

Die Stabilität des ^{Myc}Hmg2 Proteins wurde nach Inhibition der Translation durch die Zugabe von Cycloheximid untersucht. Die Stämme RHY400, RHY400 Δ ubx2 oder RHY400 Δ ubx2 transformiert mit den Plasmiden pYCplac33, pYC-UBX2, pYC-UBX2 ^{Δ UBA} oder pYC-UBX2 ^{Δ UBX}, wurden über Nacht in YPD oder selektivem Medium angezogen, auf eine OD₆₀₀ von 0,3 in 20 ml YPD-Medium verdünnt und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 2 000 rpm, 23 °C, 5 min abzentrifugiert und schnell in vorgewärmten YPD-Medium resuspendiert (OD₆₀₀=1), welchem 0,5 mg/ml Cycloheximid zugesetzt worden war. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 1 ml der Hefesuspension entnommen, die Zellen bei 20 000 g, 4 °C, 1 min geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Beendigung der Probenentnahme wurden Proteinextrakte wie unter 5.5.3 beschrieben denaturierend hergestellt und im

anti-Myc Immunblot analysiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde zusätzlich mit Hilfe einer CCD-Kamera quantifiziert.

Bei den Experimenten zur Hmg2 Stabilität unter Stressbedingungen wurden die Zellen eine Stunde vor dem Translationsstopp auf 37 °C gebracht oder in YPD Medium mit 100 µM DTT umgeimpft. Für die Überexpressionsexperimente wurde der Stamm RHY400 mit den Plasmiden pYEplac195, pYE-UBX2 bzw. pYE-UBX2^{ΔUBX} transformiert und der Versuch ausschließlich in selektivem SC-Ura-Medium durchgeführt.

Analyse der Proteinstabilität im "Pulse chase" Experiment

Die Hefezellen wurden unter den gewünschten Bedingungen über Nacht angezogen, auf eine OD₆₀₀ von 0,3 verdünnt und für 3-5 h wachsen gelassen. Eine Zellmenge, die einer OD₆₀₀ von 15 entsprach, wurde abzentrifugiert, in 15 ml SC-Ura-Met-Medium (entweder mit Glukose oder Galaktose supplementiert) resuspendiert und 1 h bei 30 °C inkubiert. Zur radioaktiven Markierung der Proteine (pulse) wurden die Zellen in 1 ml SC-Met-Medium in einem Eppendorf Reaktionsgefäß konzentriert und 20-40 µl [³⁵S]-Methionin (10 µCi/µl; Amersham) zugegeben. Die Hefekulturen wurden anschließend für die zur effektiven Markierung benötigten Zeit (5 oder 10 min) bei 30 °C in einem Thermomixer geschüttelt, einmal mit SC-Medium gewaschen und in 5 ml SC-Medium, dem 0,5 mg/ml Cycloheximid zugesetzt war, resuspendiert. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde 1 ml der Suspension abgenommen.

Bei Experimenten zur Stabilität von Ub-P-βGal wurden die Zellen in der Tischzentrifuge bei 14 000 rpm, 4 °C, 2 min geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von Glasperlen aufgeschossen und βGal durch eine native Immunpräzipitation wie in Abschnitt 5.5.4 beschrieben aus dem Lysat gefällt.

Für Experimente zur Stabilität von HA-epitopmarkierten ERAD-Substraten wurden die Zellen in 4,5 ml SC-Medium resuspendiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 900 µl geerntet und zu 100 µl 100% (w/v) TCA auf Eis zugegeben. Nach der letzten Probenentnahme wurden die Zellen mit Glasperlen vermischt und auf dem Vortex-Schüttler lysiert. Der

Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die Glasperlen mit 500 µl 10% TCA-Lösung nachgespült und die Ansätze bei 20 000 g, 4 °C, 15 min abzentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden in 120 µl SDS-Puffer (100 mM Tris pH 11,0; 3% SDS) aufgenommen und für 5 min auf 98 °C erhitzt. Zur Immunpräzipitation der ERAD-Substrate wurden 80 µl der denaturierten Proteinlösung in 700 µl IP-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100) verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad mit 0,5 µg anti-HA Antikörper (F-7, monoklonal) inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper/Antigen-Komplexe durch Zugabe von Protein A-Sepharose gefällt, zweimal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 1% Triton X-100), einmal mit IP-Puffer und einmal mit PBS gewaschen, und schließlich in 20 µl HU-Puffer denaturiert.

Die Proben wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, in der Autoradiographie analysiert und die Signale mit Hilfe eines Phospho-Imagers (BAS, Fuji) quantifiziert.

6. Literaturverzeichnis

Acharya, U., Jacobs, R., Peters, J. M., Watson, N., Farquhar, M. G., und Malhotra, V. (1995). The formation of Golgi stacks from vesiculated Golgi membranes requires two distinct fusion events. *Cell* **82**, 895-904.

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

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.).

Bachmair, A., Finley, D., und Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**, 179-186.

Bays, N. W., Gardner, R. G., Seelig, L. P., Joazeiro, C. A., und Hampton, R. Y. (2001a). Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol* **3**, 24-29.

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

Bertolaet, B. L., Clarke, D. J., Wolff, M., Watson, M. H., Henze, M., Divita, G., und Reed, S. I. (2001). UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* **8**, 417-422.

Beuron, F., Dreveny, I., Yuan, X., Pye, V. E., McKeown, C., Briggs, L. C., Cliff, M. J., Kaneko, Y., Wallis, R., Isaacson, R. L., *et al.* (2006). Conformational changes in the AAA ATPase p97-p47 adaptor complex. *Embo J*.

Bogan, J. S., Hendon, N., McKee, A. E., Tsao, T. S., und Lodish, H. F. (2003). Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature* **425**, 727-733.

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**, 221-226.

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**, 615-621.

- 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**, 49609-49616.
- 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.
- Cao, K., Nakajima, R., Meyer, H. H., und Zheng, Y. (2003). The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell* **115**, 355-367.
- Carim-Todd, L., Escarceller, M., Estivill, X., und Sumoy, L. (2001). Identification and characterization of UBXD1, a novel UBX domain-containing gene on human chromosome 19p13, and its mouse ortholog. *Biochim Biophys Acta* **1517**, 298-301.
- 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**, 1576-1583.
- Chu, K., Niu, X., und Williams, L. T. (1995). A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11894-11898.
- Dahlmann, B. (2005). Proteasomes. *Essays Biochem* **41**, 31-48.
- Davies, J. M., Tsuruta, H., May, A. P., und Weis, W. I. (2005). Conformational changes of p97 during nucleotide hydrolysis determined by small-angle X-Ray scattering. *Structure (Camb)* **13**, 183-195.
- Deak, P. M., und Wolf, D. H. (2001). Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation. *J Biol Chem* **276**, 10663-10669.
- 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**, 127-139.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., und Rechsteiner, M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* **269**, 7059-7061.
- 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**, 1030-1039.

- Elkabetz, Y., Shapira, I., Rabinovich, E., und Bar-Nun, S. (2004). Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation substrates: roles of endoplasmic reticulum-bound p97/Cdc48p and proteasome. *J Biol Chem* **279**, 3980-3989.
- Ellgaard, L., und Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-191.
- Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., und Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem* **279**, 26817-26822.
- 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**, 725-730.
- Finger, A., Knop, M., und Wolf, D. H. (1993). Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur J Biochem* **218**, 565-574.
- 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**, 1035-1046.
- Finley, D., Sadis, S., Monia, B. P., Boucher, P., Ecker, D. J., Crooke, S. T., und Chau, V. (1994). Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* **14**, 5501-5509.
- Flierman, D., Ye, Y., Dai, M., Chau, V., und Rapoport, T. A. (2003). Polyubiquitin serves as a recognition signal, rather than a ratcheting molecule, during retrotranslocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **278**, 34774-34782.
- Frohlich, K. U., Fries, H. W., Peters, J. M., und Mecke, D. (1995). The ATPase activity of purified CDC48p from *Saccharomyces cerevisiae* shows complex dependence on ATP-, ADP-, and NADH-concentrations and is completely inhibited by NEM. *Biochim Biophys Acta* **1253**, 25-32.
- Frohlich, K. U., Fries, H. W., Rudiger, M., Erdmann, R., Botstein, D., und Mecke, D. (1991). Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J Cell Biol* **114**, 443-453.
- Frohlich, T., Risau, W., und Flamme, I. (1998). Characterization of novel nuclear targeting and apoptosis-inducing domains in FAS associated factor 1. *J Cell Sci* **111 (Pt 16)**, 2353-2363.

- Fu, X., Ng, C., Feng, D., und Liang, C. (2003). Cdc48p is required for the cell cycle commitment point at Start via degradation of the G1-CDK inhibitor Far1p. *J Cell Biol* **163**, 21-26.
- Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T., und Kobayashi, H. (2002). Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 745-750.
- Ghislain, M., Dohmen, R. J., Levy, F., und Varshavsky, A. (1996). Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **15**, 4884-4899.
- 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**, 527-534.
- 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**, 3149-3162.
- Hampton, R. Y., Gardner, R. G., und Rine, J. (1996). Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol Biol Cell* **7**, 2029-2044.
- Hampton, R. Y., und Rine, J. (1994). Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *J Cell Biol* **125**, 299-312.
- Hanna, J., Leggett, D. S., und Finley, D. (2003). Ubiquitin depletion as a key mediator of toxicity by translational inhibitors. *Mol Cell Biol* **23**, 9251-9261.
- Hanson, P. I., und Whiteheart, S. W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 519-529.
- Hartmann-Petersen, R., Semple, C. A., Ponting, C. P., Hendil, K. B., und Gordon, C. (2003). UBA domain containing proteins in fission yeast. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 629-636.
- 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**, 824-828.
- Helenius, A., und Aeby, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.

- 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**, 1086-1091.
- Hicke, L., und Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 141-172.
- Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., und Wolf, D. H. (2004). Endoplasmic reticulum-associated protein degradation--one model fits all? *Biochim Biophys Acta* **1695**, 215-223.
- Hitt, R., und Wolf, D. H. (2004). Der1p, a protein required for degradation of malfolded soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and Der1-like proteins. *FEMS Yeast Res* **4**, 721-729.
- Hiyama, H., Yokoi, M., Masutani, C., Sugasawa, K., Maekawa, T., Tanaka, K., Hoeijmakers, J. H., und Hanaoka, F. (1999). Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem* **274**, 28019-28025.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., Jentsch, S., Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., Hoppe, T., *et al.* (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141.
- 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**, 172-173.
- 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**, 577-586.
- Ishibashi, T., Ogawa, S., Hashiguchi, Y., Inoue, Y., Udo, H., Ohzono, H., Kato, A., Minakami, R., und Sugiyama, H. (2005). A novel protein specifically interacting with Homer2 regulates ubiquitin-proteasome systems. *J Biochem (Tokyo)* **137**, 617-623.
- James, P., Halladay, J., und Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- 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**, 134-139.
- 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**, 17442-17456.

Jungmann, J., Reins, H. A., Schobert, C., und Jentsch, S. (1993). Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature* **361**, 369-371.

Katoh, H., Harada, A., Mori, K., und Negishi, M. (2002). Socius is a novel Rnd GTPase-interacting protein involved in disassembly of actin stress fibers. *Mol Cell Biol* **22**, 2952-2964.

Kim, H. J., Song, E. J., Lee, Y. S., Kim, E., und Lee, K. J. (2005). Human Fas-associated factor 1 interacts with heat shock protein 70 and negatively regulates chaperone activity. *J Biol Chem* **280**, 8125-8133.

Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., und Wolf, D. H. (1996). Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *Embo J* **15**, 753-763.

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

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

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**, 75-78.

Kreft, S. G., Wang, L., und Hochstrasser, M. (2005). Membrane topology of the yeast ER-localized ubiquitin ligase DOA10 and comparison to its human ortholog TEB4 (March-VI). *J Biol Chem*.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

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**, 885-893.

Lilley, B. N., und Ploegh, H. L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**, 834-840.

- Lilley, B. N., und Ploegh, H. L. (2005). Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14296-14301.
- Lupas, A. N., und Martin, J. (2002). AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 746-753.
- Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D., und Frohlich, K. U. (1998). Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol Biol Cell* **9**, 131-141.
- McNeill, H., Knebel, A., Arthur, J. S., Cuenda, A., und Cohen, P. (2004). A novel UBA and UBX domain protein that binds polyubiquitin and VCP and is a substrate for SAPKs. *Biochem J* **384**, 391-400.
- 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**, 692-697.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., und Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**, 766-772.
- Meyer, H. H., Kondo, H., und Warren, G. (1998). The p47 co-factor regulates the ATPase activity of the membrane fusion protein, p97. *FEBS Lett* **437**, 255-257.
- Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D., 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**, 2181-2192.
- 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**, 5645-5652.
- Moir, D., Stewart, S. E., Osmond, B. C., und Botstein, D. (1982). Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**, 547-563.
- Neuber, O., Jarosch, E., Volkwein, C., Walter, J., und Sommer, T. (2005). Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* **7**, 993-998.
- Park, H., Suzuki, T., und Lennarz, W. J. (2001). Identification of proteins that interact with mammalian peptide:N-glycanase and implicate this hydrolase in the proteasome-dependent pathway for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11163-11168.

- Park, M. Y., Jang, H. D., Lee, S. Y., Lee, K. J., und Kim, E. (2004). Fas-associated factor-1 inhibits nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activity by interfering with nuclear translocation of the RelA (p65) subunit of NF-kappaB. *J Biol Chem* **279**, 2544-2549.
- Patel, S. K., Indig, F. E., Olivieri, N., Levine, N. D., und Latterich, M. (1998). Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion. *Cell* **92**, 611-620.
- Peters, J. M., Harris, J. R., Lustig, A., Muller, S., Engel, A., Volker, S., und Franke, W. W. (1992). Ubiquitous soluble Mg(2+)-ATPase complex. A structural study. *J Mol Biol* **223**, 557-571.
- Peters, J. M., Walsh, M. J., und Franke, W. W. (1990). An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *Embo J* **9**, 1757-1767.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-533.
- Pickart, C. M., und Cohen, R. E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 177-187.
- Pickart, C. M., und Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 55-72.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., und Di Fiore, P. P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* **416**, 451-455.
- Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K. U., Diamant, N., und Bar-Nun, S. (2002). AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* **22**, 626-634.
- Rabouille, C., Kondo, H., Newman, R., Hui, N., Freemont, P., und Warren, G. (1998). Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro. *Cell* **92**, 603-610.
- 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**, 905-914.
- Rancour, D. M., Park, S., Knight, S. D., und Bednarek, S. Y. (2004). Plant UBX domain-containing protein 1, PUX1, regulates the oligomeric structure and activity of arabidopsis CDC48. *J Biol Chem* **279**, 54264-54274.

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**, 11691-11695.

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**, 667-677.

Ravid, T., Kreft, S. G., und Hochstrasser, M. (2006). Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *Embo J* **25**, 533-543.

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

Romisch, K. (2005). Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

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**, 4909-4919.

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

Ryu, S. W., Chae, S. K., Lee, K. J., und Kim, E. (1999). Identification and characterization of human Fas associated factor 1, hFAF1. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 388-394.

Ryu, S. W., und Kim, E. (2001). Apoptosis induced by human Fas-associated factor 1, hFAF1, requires its ubiquitin homologous domain, but not the Fas-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 1027-1032.

Ryu, S. W., Lee, S. J., Park, M. Y., Jun, J. I., Jung, Y. K., und Kim, E. (2003). Fas-associated factor 1, FAF1, is a member of Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **278**, 24003-24010.

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

Sang, T. K., und Ready, D. F. (2002). Eyes closed, a Drosophila p47 homolog, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Development* **129**, 143-154.

Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., und Finley, D. (2005). Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem* **386**, 725-737.

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**, 818-824.

Schulze, A., Standera, S., Buerger, E., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., Koning, F., Kloetzel, P. M., und Seeger, M. (2005). The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *J Mol Biol* **354**, 1021-1027.

Seeley, E. S., Kato, M., Margolis, N., Wickner, W., und Eitzen, G. (2002). Genomic analysis of homotypic vacuole fusion. *Mol Biol Cell* **13**, 782-794.

Seufert, W., und Jentsch, S. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *Embo J* **9**, 543-550.

Seufert, W., und Jentsch, S. (1991). Yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in selective protein degradation are essential for cell viability. *Acta Biol Hung* **42**, 27-37.

Shih, S. C., Prag, G., Francis, S. A., Sutanto, M. A., Hurley, J. H., und Hicke, L. (2003). A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *Embo J* **22**, 1273-1281.

Sikorski, R. S., und Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.

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**, 2511-2524.

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**, 1265-1273.

Suyama, M., Doerks, T., Braun, I. C., Sattler, M., Izaurralde, E., und Bork, P. (2000). Prediction of structural domains of TAP reveals details of its interaction with p15 and nucleoporins. *EMBO Rep* **1**, 53-58.

- Swanson, R., Locher, M., und Hochstrasser, M. (2001). A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev* **15**, 2660-2674.
- Taxis, C., Vogel, F., und Wolf, D. H. (2002). ER-golgi traffic is a prerequisite for efficient ER degradation. *Mol Biol Cell* **13**, 1806-1818.
- Thoms, S. (2002). Shp1, ein neuer Faktor der Vakuolenmembranfusion von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation an der Universität Witten/Herdecke.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., und Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* **19**, 94-102.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., und Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258.
- Turqueti-Neves, A. (2005). Identification of substrates and cellular functions of the ubiquitin specific Cdc48^{Shp1} chaperone complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Master Thesis an der Technischen Universität München.
- 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**, 855-866.
- Vashist, S., Kim, W., Belden, W. J., Spear, E. D., Barlowe, C., und Ng, D. T. (2001). Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J Cell Biol* **155**, 355-368.
- Vashist, S., und Ng, D. T. (2004). Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol* **165**, 41-52.
- 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.
- Walters, K. J., Kleijnen, M. F., Goh, A. M., Wagner, G., und Howley, P. M. (2002). Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry* **41**, 1767-1777.
- Wang, Q., und Chang, A. (1999). Eps1, a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast. *Embo J* **18**, 5972-5982.

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**, 973-978.

Whiteheart, S. W., und Matveeva, E. A. (2004). Multiple binding proteins suggest diverse functions for the N-ethylmaleimide sensitive factor. *J Struct Biol* **146**, 32-43.

Whiteheart, S. W., Schraw, T., und Matveeva, E. A. (2001). N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. *Int Rev Cytol* **207**, 71-112.

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**, 939-943.

Wojcik, C., Yano, M., und DeMartino, G. N. (2004). RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci* **117**, 281-292.

Yamabe, Y., Ichikawa, K., Sugawara, K., Imamura, O., Shimamoto, A., Suzuki, N., Tokutake, Y., Goto, M., Sugawara, M., und Furuichi, Y. (1997). Cloning and characterization of Rep-8 (D8S2298E) in the human chromosome 8p11.2-p12. *Genomics* **39**, 198-204.

Yamabe, Y., Yokoi, A., Imamura, O., Matsui, M., Matsunaga, A., Taketo, M., Sugawara, M., und Furuichi, Y. (1999). Structures of mouse Rep-8 cDNA and genomic clones. *Gene* **227**, 39-47.

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**, 652-656.

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

Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., und Rapoport, T. A. (2005). Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14132-14138.

Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., und Rapoport, T. A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**, 841-847.

Young, P., Deveraux, Q., Beal, R. E., Pickart, C. M., und Rechsteiner, M. (1998). Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem* **273**, 5461-5467.

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**, 255-263.

Yuan, X., Simpson, P., McKeown, C., Kondo, H., Uchiyama, K., Wallis, R., Dreveny, I., Keetch, C., Zhang, X., Robinson, C., Freemont, P., und Matthews, S. (2004). Structure, dynamics and interactions of p47, a major adaptor of the AAA ATPase, p97. *Embo J* **23**, 1463-1473.

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**, 2037-2050.

Zhong, X., Shen, Y., Ballar, P., Apostolou, A., Agami, R., und Fang, S. (2004). AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* **279**, 45676-45684.

Abkürzungsverzeichnis

5-FOA	5-Fluoroorotat
AAA	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
C-Terminus	Carboxyterminus
CHX	Cycloheximid
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziiertes Proteinabbau
g	Erdbeschleunigung, $9,81 \text{ m s}^{-2}$
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
IB	Immunblot
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LK	Antikörper-Leichtkette
mA	milli-Ampere
min	Minuten
M	Molar
NEM	N-Ethylmaleimid
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Aminoternus

OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
SC	<i>Synthetic complete</i> (Medium)
SD	<i>Synthetic defined</i> (Minimalmedium)
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK	Antikörper-Schwerkette
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
Ub	Ubiquitin
UBA	<i>Ubiquitin associated</i>
UBC	<i>Ubiquitin conjugating enzyme</i>
UBD	Ubiquitin-ähnliche Domäne
UBL	<i>Ubiquitin like</i>
UBX	<i>Ubiquitin regulatory X</i>
UFD	<i>Ubiquitin fusion degradation</i>
UIM	<i>Ubiquitin interacting motif</i>
V	Volt
WT	Wildtyp
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	Hefe-Extrakt/Pepton/Glukose (Medium)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Alexander Buchberger bedanken: Für das interessante Projekt und besonders für die Möglichkeit, mit großer Freiheit zu forschen und trotzdem jederzeit auf Unterstützung zurückgreifen zu können.

Prof. Stefan Jentsch möchte ich für die Übernahme des Erstgutachtens danken, sowie für Tipps, Anregungen und allgemeine Ratschläge. Besonders hilfreich für diese Arbeit war außerdem, dass mir sämtliche Hefestämme, Antikörper und Plasmide aus seiner Abteilung großzügig zur Verfügung gestellt wurden.

Bei Herrn Prof. Peter Becker vom Adolf-Butenandt-Institut für Molekularbiologie in München bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Ich möchte auch gerne meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Buchberger danken, Claudia, Katja und Silke; insbesondere für die gute Stimmung auf dem gemeinsamen Leidensweg! Vielen Dank an Sandra Köglsberger für die technische Unterstützung und die Übernahme etlicher Tetraden-Dissektionen.

Zum Gelingen dieser Arbeit hat auch Sebastian Rumpf maßgeblich beigetragen: mit ihm konnte ich jederzeit ausgiebige und vor allem fruchtbare Diskussionen über das Cdc48-System (aber auch andere Themen) führen. An dieser Stelle möchte ich außerdem Angelika Rambold nennen, die mich besonders in harten Zeiten immer stimmungsvoll aufgeheitert hat!

Allen Mitgliedern der gesamten Abteilung Molekulare Zellbiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre. Ich habe mich hier sehr wohl gefühlt.

Schließlich und am Allermeisten möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, bei meinen Eltern, meinem Bruder Bernhard und bei Caro, für ihre Liebe, Geduld und jahrelange Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Christian Schuberth

Adresse: Reitmorstrasse 43
80538 München
Tel.: 089/99300968

Geburtsdatum: 27. November 1974

Geburtsort: Regensburg

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1981 bis 1985 Grundschule Ost, Garching
1985 bis 1994 Werner-Heisenberg-Gymnasium, Garching
Abitur im Juli 1994

Studium: 1994 bis 2000 Studium der Biologie an der
Ludwigs-Maximilians-Universität, München
Vordiplom im November 1996
Diplomarbeit: "Untersuchungen zur biologischen Funktion
von Kin4, einem Kar3-ähnlichem Kinesin aus *Ustilago
maydis*" (Arbeitsgruppe Prof. Kahmann)
Abschluss mit Diplom Biologie im August 2000

Doktorarbeit: Seit Juli 2001 am Max-Planck-Institut für Biochemie,
Martinsried, in der Abteilung Molekulare Zellbiologie
(Prof. Stefan Jentsch)