

**Identifizierung und Charakterisierung von potentiellen
Interaktionspartnern der Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP**

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sandra Glockzin

aus Hamburg

Köln, 2002

Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Prof. Dr. Martin Scheffner

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 14.02.2003

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Martin Scheffner für die Bereitstellung des interessanten Themas, die exzellente Betreuung und die jederzeit offene Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen möchte ich mich für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Für ihre besondere Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Belangen bedanke ich mich bei Stefanie Lang und Dr. Arnd Hengstermann.

Ganz besonders danke ich auch Thorsten Müller für die tatkräftige Unterstützung und die sehr gute Zusammenarbeit.

Sehr gefreut habe ich mich über die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft von Karin Butz, Sylvia Heink, Birgit Keck, Ulrike Kogel, Petric Kuballa, Laëtitia Linares, Konstantin Matentzoglou, Sylvia Schwarz und Michael D´Silva.

Ganz herzlich möchte ich auch all jenen danken, die mich während all der Jahre begleitet und unterstützt haben, allen voran meinen Eltern, meinen Geschwistern und Jens sowie Anne, Tessa, Tina und Tinky.

Köln, im Dezember 2002

Sandra Glockzin

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ubiquitin	1
1.2	Funktionen der Proteinmodifikationen durch Ubiquitin	2
1.2.1	K48-Ubiquitin-Ketten	2
1.2.2	K29-Ubiquitin-Ketten	3
1.2.3	K63-Ubiquitin-Ketten	3
1.2.4	Monoubiquitinierung	4
1.3	Das Ubiquitin-Konjugationssystem	4
1.3.1	Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1)	5
1.3.2	Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2)	6
1.3.3	Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3)	6
1.3.4	E4-Faktoren	7
1.4	Ubiquitin-Protein-Ligasen	7
1.4.1	HECT-Ligasen	7
1.4.1.1	Nedd-4-ähnliche HECT-Ligasen	8
1.4.1.2	HERC-Proteine	8
1.4.1.3	Andere HECT-Ligasen	9
1.4.2	RING-Finger-Ligasen	9
1.4.2.1	Monomere oder homodimere RING-Finger-Ligasen	10
1.4.2.2	Multimere oder heterodimere RING-Finger-Ligasen	11
1.4.3	U-Box-Ligasen	12
1.5	Ubiquitinierungssignale und Substraterkennung	12
1.6	Deubiquitinierende Enzyme	13
1.7	Ubiquitin-ähnliche Proteine und Ubiquitin-assoziierte Motive	14
1.7.1	Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ I	14
1.7.2	Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ II	15
1.7.3	Proteine mit Uba-Domänen	17
1.7.4	Proteine mit UIMs	17
1.8	E6-AP	18
1.8.1	E6-abhängige Substrate von E6-AP	19
1.8.2	E6-unabhängige Substrate von E6-AP	20
1.8.3	Angelman-Syndrom	21
1.9	Ziele der Arbeit	22

2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Material	23
2.1.1	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	23
2.1.2	Medien	23
2.1.2.1	Medien <i>E. coli</i>	23
2.1.2.2	Medien <i>S. cerevisiae</i>	24
2.1.2.3	Medien <i>S. pombe</i>	24
2.1.2.4	Medien Insektenzellen	25
2.1.2.5	Medien Säugerzellen	25
2.1.3	Zellen	25
2.1.3.1	Bakterienstämme	25
2.1.3.2	<i>S. cerevisiae</i> -Stamm	25
2.1.3.3	<i>S. pombe</i> -Stamm	25
2.1.3.4	Insektenzellen	26
2.1.3.5	Humane Zelllinien	26
2.1.4	Zur Klonierung verwendete Plasmidvektoren	26
2.1.5	Verwendete DNA-Konstrukte	27
2.1.5.1	pGEX-2TK-Konstrukte	27
2.1.5.2	pCDNA3-HA, pCDNA3-FLAG- und pCDNA3-myc-Konstrukte	28
2.1.5.3	pRc/CMV-Konstrukte	29
2.1.5.4	pBluescript SKII-Konstrukte	29
2.1.5.5	pDBLeu-Konstrukte	29
2.1.5.6	pET 3a-Konstrukte	30
2.1.5.7	pGEM-1-Konstrukte	30
2.1.5.8	Weitere Konstrukte	30
2.1.6	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Klonierung	31
2.1.7	cDNA-Banken	32
2.1.8	Rekombinante Baculoviren	32
2.1.9	Antikörper	33
2.1.10	Längenstandards	33
2.2	Methoden	34
2.2.1	Kultivierung von Zellen und Baculoviren	34
2.2.1.1	Kultivierung und Gefrierlagerung von Bakterien	34
2.2.1.2	Kultivierung und Gefrierlagerung von <i>S. cerevisiae</i>	34
2.2.1.3	Kultivierung und Gefrierlagerung von <i>S. pombe</i>	34
2.2.1.4	Kultivierung und Gefrierlagerung von eukaryotischen Zellen	34
2.2.1.5	Baculovirus-Infektion zur Virus-Amplifikation	35
2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.4	Analyse und Klonierung von DNA	36
2.2.4.1	Enzymatische Modifikationen von DNA	36
2.2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.4.3	Gelelution von DNA-Fragmenten	36
2.2.4.4	Ligation	36
2.2.4.5	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen und Transformation	37
2.2.4.6	Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen und Elektroporation	37
2.2.4.7	DNA-Sequenzierung	37

2.2.4.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
2.2.5	„Yeast Two Hybrid“-System	38
2.2.5.1	Transformation von pDBLeu-Vektoren in <i>S. cerevisiae</i>	38
2.2.5.2	Nachweis der Expression von GAL4-BD-Fusionsproteinen in <i>S. cerevisiae</i>	38
2.2.5.3	Transformation von cDNA-Banken in <i>S. cerevisiae</i>	39
2.2.5.4	Bestimmung der Transformationseffizienz	39
2.2.5.5	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	40
2.2.5.6	Retransformation von pPC86-Plasmide in <i>S. cerevisiae</i>	40
2.2.6	Proteinexpression	41
2.2.6.1	Proteinsynthese in RRL (Kaninchen-Retikulozytenlysate)	41
2.2.6.2	Expression in <i>E. coli</i>	41
2.2.6.3	Expression in <i>S. pombe</i>	41
2.2.6.4	Expression in Insektenzellen	42
2.2.7	Aufreinigung von Proteinen	42
2.2.7.1	Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen	42
2.2.7.2	Affinitätsreinigung von His-Fusionsproteinen	43
2.2.7.3	Anionenaustausch-Chromatographie	43
2.2.8	Analyse von Proteinen	43
2.2.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	43
2.2.8.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.2.8.3	Detektion von Proteinen	44
2.2.9	GST-Kopräzipitationsassay	45
2.2.10	<i>In vitro</i> -Ubiquitinierungsassays	45
2.2.11	<i>In vitro</i> -Degradationsassay	46
2.2.12	<i>In vitro</i> -Deubiquitinierungsassay	46
2.2.13	Transfektion von DNA in Säugetierzellen mittels Lipofektion	47
2.2.14	Immunpräzipitation	48
2.2.15	Herstellung [³⁵ S]-markierter Zellysate	48
2.2.16	Herstellung polyklonaler Seren gegen HERC2	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Isolierung von Interaktionspartnern von E6-AP im YTH	50
3.1.1	YTH mit E6-AP	50
3.1.2	Interaktionspartner von E6-AP im YTH	51
3.1.3	Interaktionspartner von katalytisch inaktivem E6-AP im YTH	52
3.2	Ubl/Uba-Proteine als Interaktionspartner von E6-AP	54
3.2.1	Bindung von HHR23A, CHAP1 und A1Up an E6-AP <i>in vitro</i>	54
3.2.2	Ubiquitinierung von HHR23A, CHAP1 und A1-Up <i>in vitro</i>	55
3.2.3	Einfluss von Ubl/Uba-Proteinen auf das Ubiquitin-Proteasom-System	57
3.2.3.1	Einfluss von Ubl/Uba-Proteinen auf den E6/E6-AP-induzierten Abbau von p53 <i>in vitro</i>	58
3.2.3.2	Einfluss von HHR23A auf Ubiquitinierungsreaktionen <i>in vitro</i>	59
3.2.4	Einfluss von HHR23A auf die Deubiquitinierung von p53 <i>in vitro</i>	62
3.2.5	Bindung von ubiquitiniertem p53 an HHR23A <i>in vitro</i>	64
3.2.6	Bindung von polyubiquitinierten Proteinen an Ubl/Uba-Proteine <i>in vitro</i>	65
3.2.7	Einfluss von HHR23A auf den E6/E6-AP-vermittelten Abbau von p53 <i>in vivo</i>	67

3.2.8	Einfluss von HHR23A auf den Mdm2-vermittelten proteasomalen Abbau von p53 <i>in vivo</i>	68
3.2.9	Einfluss von HHR23A auf den RLIM-vermittelten Abbau von CLIM2 <i>in vivo</i>	69
3.2.10	Isolierung von Interaktionspartnern des Ubl/Uba-Proteins CHAP1 im YTH	70
3.2.11	Bindung der identifizierten Interaktionspartner an CHAP1 <i>in vitro</i>	72
3.3	UIM-Proteine als Interaktionspartner von Ubl/Uba-Proteinen und als Ubiquitinierungssubstrate	72
3.3.1	Bindung von UIM-Proteinen an Ubl/Uba-Proteine <i>in vitro</i>	73
3.3.1.1	Charakterisierung der Bindung von HRS an CHAP1	73
3.3.1.2	Charakterisierung der Bindung von Ataxin-3 an HHR23A	74
3.3.2	Bindung von UIM-Proteinen an Ubiquitin <i>in vitro</i>	77
3.3.3	Einfluss des UIM-Proteins Ataxin-3 auf die Ubiquitinierung und den Abbau von p53 <i>in vitro</i>	79
3.3.4	UIM-Proteine als Ubiquitinierungssubstrate	80
3.3.4.1	Ubiquitinierung von UIM-Proteinen durch E6-AP <i>in vitro</i>	80
3.3.4.2	Ubiquitinierung von UIM-Proteinen durch verschiedene E3-Ligasen <i>in vitro</i>	82
3.3.4.3	UIMs als Ubiquitinierungssignale	83
3.4	HERC2 als Interaktionspartner von E6-AP	85
3.4.1	Bindung von HERC2 an E6-AP	85
3.4.2	Ubiquitinierung und Abbau von HERC2 <i>in vitro</i>	87
3.4.2.1	Ubiquitinierungen verschiedener HERC2-Fragmente <i>in vitro</i>	87
3.4.2.2	Spezifität der E6-AP-abhängigen Ubiquitinierung von HERC2	89
3.4.2.3	Abbau von HERC2	90
3.4.3	HERC2-spezifische Antikörper	91
3.5	Isolierung von Bindungspartnern und Substraten von E6-AP in biochemischen Ansätzen	94
3.5.1	Präzipitation von E6-AP-interagierenden Proteinen	94
3.5.2	Präzipitation E6-AP-abhängig ubiquitiniertes Proteine	96
4	DISKUSSION	98
4.1	Potentielle Interaktionspartner und Substrate von E6-AP	98
4.2	Charakterisierung von Ubl/Uba-Proteinen	99
4.2.1	HHR23A, CHAP1 und A1Up als potentielle Interaktionspartner von E6-AP	99
4.2.2	Einfluss von HHR23A auf Ubiquitinierungsreaktionen	100
4.2.3	Uba-Domänen als Bindemotive für ubiquitinierte Proteine	101
4.2.4	Ubl/Uba-Proteine als Vermittler zwischen Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau	103
4.2.5	Interaktionspartner von CHAP1	107
4.3	Charakterisierung von UIM-Proteinen	109
4.3.1	UIMs als Interaktionsmotive für Ubiquitin und Ubl-Domänen	109
4.3.2	UIMs als Ubiquitinierungssignale	112
4.4	HERC2 und E6-AP	114
4.4.1	HERC2 als Interaktionspartner von E6-AP	114
4.4.2	HERC2 als Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP	115

5	LITERATURVERZEICHNIS	118
6	ZUSAMMENFASSUNG	134
7	ABSTRACT	135
8	LEBENS LAUF	136
9	ERKLÄRUNG	137

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	M	Molar (mol/l)
	Ampere	m	Meter
Abb.	Abbildung		milli
AD	Aktivierungsdomäne	mu	murin
Amp	Ampicillin	μ	micro
AK	Antikörper	min	Minute(n)
AS	Aminosäure	mRNA	messenger-RNA
ATP	Adenosintriphosphat	N	N-Terminus
β-Gal	β-Galactosidase	n	nano
BD	Bindedomäne	OD	optische Dichte
bp	Basenpaare	ONPG	Orthonitrophenyl-β-D-galactopyranosid
BSA	Bovines Serumalbumin		galactopyranosid
bzw.	beziehungsweise	PBS	phosphate buffered saline
C	Cytosin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
	C-Terminus	®	Rechtsgeschützt
°C	Grad Celsius	RNA	Ribonukleinsäure
ca.	circa	RRL	Kaninchen-Retikulocytenslysat
cAMP	cyclisches AMP		
cDNA	complementary DNA	s	Sekunde(n)
		SDS	Natriumdodecylsulfat
CT	C-Terminus	s. o.	siehe oben
DMSO	Dimethylsulfoxid	s. u.	siehe unten
DNA	Desoxyribonukleinsäure	T	Thymin
DTT	Dithiothreitol	Tab.	Tabelle
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym	TAE	Tris-Acetat-EDTA
		TCA	Trichlorethansäure
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym	TM	eingetragenes Warenzeichen
		Tris	Tris[hydroxymethyl]amino-methan
E3	Ubiquitin-Protein-Ligase		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	U	unit(s), Einheit der Enzymaktivität
EtOH	Ethanol		
G	Guanin	u. a.	unter anderem
g	Erdbeschleunigung	Ub	Ubiquitin
	Gramm	Uba	Ubiquitin-assoziiert
GSH	Glutathion	Ubl	Ubiquitin-ähnlich
GST	Glutathion-S-Transferase	UIM	Ubiquitin-interagierendes Motiv
GTP	Guanidintriphosphat		
h	Stunde(n)	ÜN	Über Nacht
hu	human	usw.	und so weiter
IAA	Isoamylalkohol	UV	Ultraviolett
i. e.	id est	V	Volt
i. d. R.	in der Regel	v. a.	vor allem
IgG	Immunglobulin G	vgl.	vergleiche
inkl.	Inklusive	WB	Westernblot
IP	Immunpräzipitation	WT	Wildtyp
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid	YTH	„Yeast Two Hybrid“-System
		z. B.	zum Beispiel
J	Joule		
k	kilo		
kDa	Kilodalton		
L	light, leicht		

1 Einleitung

1.1 Ubiquitin

Ubiquitin, ein 76 Aminosäuren langes Protein mit einer molekularen Masse von 8,6 kDa, findet man in allen eukaryotischen Zellen sowohl im Kern als auch im Zytosol. Mit einem Unterschied von nur drei Aminosäuren zwischen Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Mensch ist es eines der am stärksten konservierten eukaryotischen Proteine, während es in Prokaryoten mit Ausnahme von bestimmten Archaeobakterien nicht vorkommt. Röntgenstrukturanalysen zeigen ein kompaktes, globuläres Protein mit einem freistehenden C-Terminus (Abb. 1) (Vijay-Kumar *et al.*, 1987). Ubiquitin kann Proteine modifizieren. Dazu wird es über die α -Carboxylgruppe seines C-terminalen Glycins (G76) an ϵ -Aminogruppen von Lysinresten anderer Proteine unter Ausbildung einer Isopeptidbindung kovalent gebunden. Der mehrstufige, enzymatisch katalysierte Prozess der Kopplung von Ubiquitin an ein Zielprotein wird als Ubiquitin-Konjugation oder Ubiquitinierung bezeichnet. Es können einzelne Ubiquitin-Moleküle (Monoubiquitinierung) aber auch Ubiquitin-Ketten an Substrate gebunden werden. Bei Ubiquitin-Ketten erfolgt die Kettenbildung und -verlängerung analog zur Substratubiquitinierung über eine Isopeptidbindung zwischen einem Lysinrest von Ubiquitin und dem G76 des nächsten Ubiquitin-Kettengliedes. Ob Ubiquitin-Ketten am Substrat synthetisiert oder als Kette an das Zielprotein gekoppelt werden, ist unbekannt. Ubiquitin besitzt sieben Lysinreste (Abb. 1). Bisher sind Bildungen von Ubiquitin-Ketten über die Lysinreste K48, K29 und K63, die im Folgenden kurz als K48-, K29- und K63-Ubiquitin-Ketten bezeichnet werden, beschrieben. Es ist unklar, ob gemischte Ubiquitin-Ketten entstehen können, die verschiedene Lysinreste für ihre Ausbildung benutzen. Interessanterweise unterscheiden sich die unterschiedlichen Arten der Proteinmodifikation durch Ubiquitin (Monoubiquitinierungen, Ausbildung von K48-, K29- oder K63-Ubiquitin-Ketten) in ihren Funktionen in der Zelle (Übersichtsartikel über Ubiquitin und Ubiquitin-Ketten: Pickart, 1998; 2000).

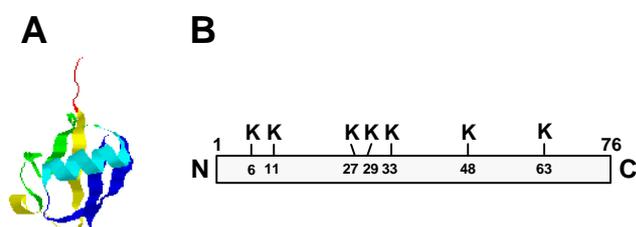


Abb. 1: Ubiquitin. (A) Dreidimensionale Struktur von Ubiquitin. Ubiquitin hat eine kompakte globuläre Struktur. Fünf β -Faltblattstränge (blau, gelb, grün) sind um eine α -Helix (türkis) gelegt. Ubiquitin wird über seinen C-Terminus (rot) an andere Proteine konjugiert. Bild nach Vijay-Kumar *et al.*, 1987. (B) Schematische Übersicht über Ubiquitin mit eingezeichneten Lysinresten (K). Am C-Terminus befinden sich zwei aufeinander folgende Glycinreste.

1.2 Funktionen der Proteinmodifikationen durch Ubiquitin

Die Aufgaben, die Ubiquitinierungen in der Zelle übernehmen, sind vielseitig und in ihrer Gesamtheit noch nicht verstanden. Im Folgenden werden den vorgestellten Ubiquitinierungsformen bereits bekannte Funktionen zugeordnet.

1.2.1 K48-Ubiquitin-Ketten

Die am besten verstandene Funktion der Proteinmodifikation durch Ubiquitin ist die Markierung von Proteinen für den Abbau durch das 26S-Proteasom, einer aus mehr als 40 verschiedenen Untereinheiten bestehenden, in drei Subkomplexe (zwei regulatorische 19S-Komplexe und ein katalytischer 20S-Komplex) gegliederten Protease (zusammengefasst in: Glickman und Ciechanover, 2002). Man spricht in diesem Zusammenhang verallgemeinernd vom „Ubiquitin-Proteasom-System“. Die Adressierung von Proteinen für den proteasomalen Abbau setzt eine mindestens viergliedrige Ubiquitin-Kette an den Substraten voraus (Thrower *et al.*, 2000). K48-Ubiquitin-Ketten stellen vermutlich das hauptsächlich proteasomale Abbausignal dar (Chau *et al.*, 1989; Finley *et al.*, 1994). Häufig umfassen sie mehr als zehn Ubiquitin-Monomere. Mit K48-Ubiquitin-Ketten modifizierte Proteine werden von den regulatorischen 19S-Komplexen des 26S-Proteasoms erkannt. Die Ubiquitin-Ketten werden abgespalten und Ubiquitin zurückgewonnen. Die abzubauenen Proteine werden unter Verbrauch von ATP entfaltet und an den proteolytisch aktiven 20S-Komplex weitergeleitet. Dieser zerlegt sie in kleine Peptide (Glickman und Ciechanover, 2002). Mindestens zwei Untereinheiten des 19S-Komplexes können Ubiquitin-Ketten binden: S5a und S6' (Ferrell *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 2002). S5a ist ein Protein, das die beiden multimeren Subkomplexe der 19S Untereinheit verbindet, aber auch frei in der Zelle vorliegt (van Nocker *et al.*, 1996). S6' ist eine der sechs in der Basis des 19S-Komplexes vorkommenden ATPasen. Sie kann im Gegensatz zu S5a nur im Zusammenhang ihrer im 19S-Komplex benachbarten Proteine Ubiquitin-Ketten erkennen und binden (Lam *et al.*, 2002). Wie die ubiquitinierten Proteine zum Proteasom gelangen, ist unbekannt.

Das Ubiquitin-Proteasom-System, das sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vorkommt, ist verantwortlich für die Degradation eines Großteils der zytosolischen und nukleären Proteine. Auch falsch gefaltete oder fehlerhaft zusammengesetzte Proteine werden erkannt. Der selektive Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System ist wichtig für nahezu alle zellulären Prozesse und ihre Regulation. Störungen in der Ubiquitinierung und im proteasomalen Abbau sind ursächlich beteiligt an bestimmten Krebsformen, wie z. B. dem

Mammakarzinom, neurologischen Erkrankungen, wie z. B. Morbus Parkinson, aber auch Autoimmunerkrankungen und verschiedenen anderen Erbkrankheiten (zusammengefasst in: Glickman und Ciechanover, 2002).

1.2.2 K29-Ubiquitin-Ketten

Neben K48-Ubiquitin-Ketten können auch K29-Ubiquitin-Ketten zumindest in *S. cerevisiae* vom 26S-Proteasom erkannt werden und zum Abbau eines Substrates führen (Johnson *et al.*, 1995; Pickart 2000). Zusammenfassend werden mit längeren Ubiquitinketten modifizierte Proteine, die für den proteasomalen Abbau markiert sind, im Rahmen dieser Arbeit als polyubiquitinierte Proteine bezeichnet. Bisher konnte nur in wenigen Fällen die Bildung von K29-Ubiquitin-Ketten gezeigt werden (Johnson *et al.*, 1995; Koegl *et al.*, 1999; Mastrandrea *et al.*, 1999). Wie wichtig die Rolle von K29-Ubiquitin-Ketten für den Abbau von Substraten durch das Proteasom ist und ob K29-Ketten zusätzliche Funktionen in der Zelle übernehmen, ist nicht bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass kurze K29-Ubiquitin-Ketten ein Signal für die Rekrutierung des Ubiquitinierungshilfsfaktors UFD2 („ubiquitin fusion degradation pathway protein 2“) (vgl.1.3.4) für die Ausbildung von K48-Ubiquitin-Ketten in *S. cerevisiae* sein könnten (Koegl *et al.*, 1999).

1.2.3 K63-Ubiquitin-Ketten

Im Gegensatz zu K48- und K29-Ubiquitin-Ketten werden K63-Ubiquitin-Ketten vom 26S-Proteasom vermutlich nicht als Abbausignal erkannt (Pickart, 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch K63-Ubiquitin-Ketten unabhängig von proteasomaler Proteolyse z. B. Funktionen in der postreplikativen DNA-Reparatur (Spence *et al.*, 1995) und der Translation (Spence *et al.*, 2000) übernimmt. Auch Endozytose von Membranproteinen kann durch K63-Ubiquitin-Ketten induziert werden (Galan *et al.*, 1997; Springael *et al.*, 1999), allerdings reicht dafür bereits eine Monoubiquitinierung aus (vgl. 1.2.4). Gut verstanden ist die Abhängigkeit der Aktivierung des für Entzündungsreaktionen wichtigen Transkriptionsfaktors NF- κ B von K63-Kettenubiquitinierung. Proinflammatorische Stimuli führen zur Konjugation einer K63-Ubiquitin-Kette an das Signalprotein TRAF6, was zur Aktivierung der Kinase Tak1 führt, die daraufhin die I κ B α -Kinase aktiviert (Wang *et al.*, 2001). Diese phosphoryliert im Anschluss I κ B α , was in dessen Abbau und in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B resultiert (DiDonato *et al.*, 1997).

1.2.4 Monoubiquitinierung

Proteinmodifikationen bei denen nur einzelne Ubiquitin-Moleküle an ein oder mehrere Lysinreste eines Proteins gekoppelt werden (einfache oder multiple Monoubiquitinierungen), sind als Abbausignal für das 26S-Proteasom zwar nicht ausreichend, können aber trotzdem wichtige regulatorische Funktionen in der Zelle übernehmen. Monoubiquitinierungen der zytoplasmatischen Domänen von zahlreichen Membranproteinen können zu deren Internalisierung in primäre endozytotische Vesikel und zum lysosomalen Abbau führen (Hicke, 1999). Unabhängig von Endozytose und lysosomaler Degradation wurden Monoubiquitinierungen z. B. in der Aktivitätsregulation von Transkriptionsfaktoren beschrieben. So verursacht die Anwesenheit von Methionin im Nährmedium die multiple Monoubiquitinierung des Proteins Met4 in *S. cerevisiae* und verhindert damit dessen Assoziation mit anderen Proteinen zu einem für die Synthese von Methionin essentiellen Transkriptionsfaktor (Kaiser *et al.*, 2000). Schließlich sei die nachgewiesene Bedeutung von Monoubiquitinierungen bei der DNA-Reparatur erwähnt. DNA-Strangbrüche induzieren unter anderem die einfache Monoubiquitinierung des Proteins FANCD2. Diese Monoubiquitinierung vermittelt die Lokalisierung von FANCD2 in nukleäre Foci, wo es eine Rolle bei der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination übernimmt (Garcia-Higuera *et al.*, 2001). Mutationen in Genen, die Proteine exprimieren, die für die Ubiquitinierung von FANCD2 notwendig sind, können zu der Erkrankung Fanconi-Anämie führen. Patienten mit Fanconi-Anämie zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Mitogenen und UV-Strahlung (Grompe und D'Andrea, 2001).

1.3 Das Ubiquitin-Konjugationssystem

Das für die Ubiquitin-Konjugation notwendige Ubiquitin wird als Fusionsprotein mit ribosomalen Untereinheiten oder als Polyprotein exprimiert. Im Anschluss an die Translation werden die Ubiquitin-Fusionsproteine durch Ubiquitin-spezifische Hydrolasen prozessiert und einzelne Ubiquitin-Moleküle freigesetzt (Pickart, 1998).

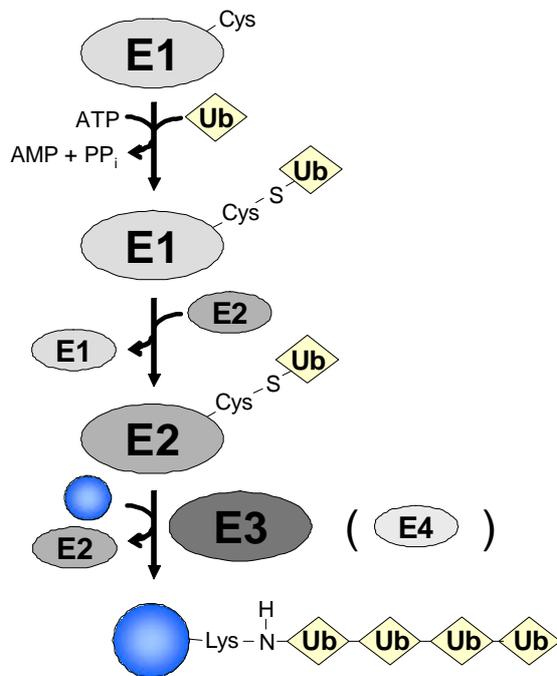


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ubiquitin-Konjugation. Im ersten Schritt entsteht unter ATP-Verbrauch ein Thioester zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins (Ub) und dem katalytisch aktiven Cysteinrest des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1). Im zweiten Schritt wird das aktivierte Ubiquitin erneut unter Ausbildung eines Thioesters auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. Ubiquitin-Protein-Ligasen sorgen für den Transfer des Ubiquitins auf das Substrat (blauer Kreis). Dabei sind die Reaktionsmechanismen unterschiedlich. Für die Ausbildung von Ubiquitin-Ketten können zusätzliche Faktoren (E4) notwendig sein.

Bevor Ubiquitin an ein Zielprotein kovalent gebunden wird, durchläuft es mehrere Reaktionen, die vermutlich vorwiegend drei verschiedene Enzymklassen umfassen (Abb. 2) (zusammengefasst in: Weissman, 2001): Im ersten Schritt entsteht unter ATP-Verbrauch ein Thioester zwischen dem C-terminalen G76 des Ubiquitins und dem katalytisch aktiven Cysteinrest des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms (E1). Das aktivierte Ubiquitin wird dann im zweiten Schritt vom E1 auf einen Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Ein Mitglied der heterogenen Gruppe der Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3) katalysiert im Anschluss den Transfer des Ubiquitins auf das Substrat. (In Abschnitt 1.4 wird auf die verschiedenen bekannten Mechanismen der durch Ubiquitin-Protein-Ligasen vermittelten Ubiquitin-Übertragung auf das Substrat eingegangen.) Der gleiche Prozess mit Ubiquitin als Substrat führt zur Zusammensetzung von Ubiquitin-Ketten. In einigen Fällen sind für die Ausbildung der Ubiquitin-Ketten möglicherweise zusätzliche Faktoren (E4s) notwendig (Koegl *et al.*, 1999).

1.3.1 Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1)

Von der Hefe bis zum Menschen gibt es je ein E1, das sowohl im Zytosol als auch im Nukleus vorkommt (zusammengefasst in: Haas und Siepmann, 1997). Die E1-Enzyme verschiedener Spezies sind Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa mit einer ATP-Binderegion und einem zentralen aktiven Cysteinrest. Die ATP-Bindung des E1 erhöht dessen Affinität für Ubiquitin. Das gebundene Ubiquitin wird unter Pyrophosphatabspaltung

am C-terminalen Glycin adenyliert. Das hohe Gruppenübertragungspotential des Ubiquitin-Adenylats macht im Anschluss die Ausbildung des Thioesters zwischen dem aktiven Cysteinrest des E1 und dem G76 des Ubiquitins energetisch möglich.

1.3.2 Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2)

Das über einen Thioester an das E1 gebundene Ubiquitin wird im zweiten Schritt der Ubiquitin-Konjugation in einer Transacylierungsreaktion auf den katalytisch aktiven Cysteinrest eines E2 übertragen (Hershko *et al.* 1983; Pickart und Rose, 1985). Das Genom von *S. cerevisiae* kodiert für elf verschiedene E2s. In Säugerzellen gibt es mindestens 30 verschiedene E2-Enzyme mit Molekulargewichten zwischen 15 und 530 kDa (meist unter 40 kDa), die genaue Anzahl ist nicht bekannt. E2-Homologe höherer Eukaryoten können in der Regel das entsprechende Hefehomolog funktionell ersetzen. Die unterschiedlichen E2s sind nukleär, zytosolisch oder auch membranassoziiert lokalisiert und können mit verschiedenen E3s interagieren. Sie verfügen alle über einen hochkonservierten, katalytischen, ca. 150 Aminosäuren umfassenden Bereich, der als „ubiquitin-conjugating“ (Ubc)-Domäne bezeichnet wird und den aktiven Cysteinrest einschließt (Jentsch *et al.* 1990; Jentsch, 1992). Einige Mitglieder der E2-Familie, wie z. B. UbcH5 und UbcH7, bestehen ausschließlich aus der Ubc-Domäne. Andere E2s weisen zusätzliche N- und/oder C-terminale Verlängerungen auf (zusammengefasst in: Scheffner *et al.*, 1998; Glickman und Ciechanover, 2002).

1.3.3 Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3)

Für die Ubiquitinierung eines Substrates ist in der Regel die Aktivität einer Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) notwendig. E3s sind Proteine oder Proteinkomplexe, die sowohl mit dem E2 interagieren als auch an das Substrat binden und damit den Transfer von Ubiquitin auf das Zielprotein vermitteln (zusammengefasst in: Weissman, 2001). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung. E3s bilden die größte Gruppe der Enzyme des Ubiquitin-Konjugationssystems und lassen sich strukturell und funktionell in drei verschiedene Familien unterteilen: HECT-Ligasen, RING-Finger-Ligasen und U-Box-Ligasen (vgl. 1.4). Die Heterogenität der E3s erschwert ihre Identifikation und das Verständnis ihrer Arbeitsweise. Viele E3s sind als solche vermutlich noch nicht identifiziert, und potentiellen E3s konnten in vielen Fällen noch keine Substrate zugeordnet werden. Die Mechanismen der Substraterkennung durch E3s sind nur in Ansätzen verstanden (vgl. 1.5). Die schon bekannten Familien der Ubiquitin-Protein-Ligasen werden in 1.4 vorgestellt.

1.3.4 E4-Faktoren

Für die Polyubiquitinierung können zusätzliche Faktoren notwendig sein. Unter E4-Faktoren werden Proteine verstanden, die neben E1-, E2- und E3-Enzymen für die Bildung von Polyubiquitin-Ketten am Substrat notwendig sind. Bisher wurde nur das *S. cerevisiae*-Protein UFD2 als E4-Faktor beschrieben, der für die Entstehung längerer K48-Ubiquitin-Ketten an einem Modellsubstrat notwendig ist. UFD2, ein U-Box Protein (vgl. 1.4.3), wurde als E4 klassifiziert, weil es nicht direkt mit einem E2-Enzym interagieren kann und zusätzlich zu einem E3 notwendig ist (Koegl *et al.*, 1999). Säugerhomologe von UFD2 können allerdings direkt mit ihren E2s interagieren und eine Ubiquitin-Kette bilden. Sie werden deshalb den U-Box-Ligasen zugeordnet (vgl. 1.4) (Cyr *et al.*, 2002). Ob andere Proteine als E4-Faktoren neben E1, E2s und E3s die Ausbildung von Ubiquitin-Ketten an natürlichen Substraten unterstützen und z. B. auch die Auswahl des Lysinrestes für die Verknüpfung der Ubiquitin-Ketten beeinflussen können, ist noch unklar.

1.4 Ubiquitin-Protein-Ligasen

1.4.1 HECT-Ligasen

Mitglieder der Familie der HECT-Ligasen besitzen eine charakteristische C-terminale, ca. 350 Aminosäuren umfassende sogenannte HECT-Domäne mit einem konservierten, katalytisch aktiven Cysteinrest (Huibregtse *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1995). Das erste isolierte Protein mit diesem Motiv war das sogenannte E6-assoziierte Protein (E6-AP), woraus sich auch der Domänenname HECT (homolog zum E6-AP C-Terminus) ableitet (Huibregtse *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1995) (zu E6-AP vgl. 1.8). Der katalytisch aktive Cysteinrest der HECT-Domäne kann wie E1- und E2-Enzyme einen Thioester mit Ubiquitin eingehen. Anschließend wird das gebundene Ubiquitin von der HECT-Ligase auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Zielproteins übertragen (Scheffner *et al.*, 1995). HECT-Ligasen gibt es in allen untersuchten eukaryotischen Organismen (Huibregtse *et al.*, 1995). Datenbankrecherchen ergeben mehr als 30 unterschiedliche Proteine mit HECT-Domänen beim Menschen, die funktionell überwiegend nicht charakterisiert sind. HECT-Ligasen werden in den meisten Zellen und Geweben konstitutiv in geringen Mengen exprimiert und interagieren bevorzugt mit den E2s UbcH5 und UbcH7 (Schwarz *et al.*, 1998; Scarafia *et al.*, 2000). Ihr Molekulargewicht variiert, abhängig von der Länge der N-terminal der HECT-Domäne gelegenen Bereiche, zwischen 90 und 530 kDa. Diese N-terminalen Sequenzen sind sehr variabel und spielen vermutlich eine Rolle bei der Erkennung und Bindung von

Substraten (Schwarz *et al.*, 1998). Ausgehend von zusätzlich zu der HECT-Domäne vorhandenen, bekannten Proteinmotiven kann man HECT-Ligasen in drei Unterfamilien einteilen: Nedd-4-ähnliche HECT-Ligasen, HERC-Proteine und andere HECT-Ligasen. Letztere tragen keine bekannten oder einheitlichen Proteinmotive.

1.4.1.1 Nedd-4-ähnliche HECT-Ligasen

Die Nedd-4-ähnlichen HECT-Ligasen verfügen über zwei oder mehrere sogenannte WW-Domänen, die für die Interaktion mit ihren Substraten notwendig sind (Rotin *et al.*, 2000). Die WW-Domäne ist ein Proteinmotiv mit zwei hoch konservierten Tryptophanresten, das hydrophobe Wechselwirkungen mit prolinreichen Sequenzen sowie mit bestimmten Phosphoserin und Phosphothreonin enthaltenden Sequenzen eingeht (Lu *et al.*, 1999; Kay *et al.*, 2000). Ein großer Teil dieser Gruppe besitzt zusätzlich eine N-terminale C2-Domäne, die Kalzium-abhängig die Bindung an Phospholipide der Plasmamembran erlaubt (Davletov und Südhof, 1993). Insgesamt sind über zehn verschiedene humane Nedd-4-ähnliche HECT-Ligasen bekannt. Das Hefehomolog Rsp5 des humanen Nedd-4 Proteins, das dieser Gruppe der HECT-Ligasen ihren Namen gab, ist eine der am besten untersuchten HECT-Ligasen. Sie kann so verschiedene Substrate wie Membranpermeasen, Membranrezeptoren, die große Untereinheit der RNA-Polymerase II oder bestimmte Vorläufer von Transkriptionsfaktoren ubiquitinieren und dadurch unterschiedliche Wirkungen erzielen. Oberflächenproteine werden daraufhin internalisiert (Rotin *et al.*, 2000), die große Untereinheit der RNA-Polymerase II durch das 26S-Proteasom abgebaut (Huibregtse *et al.*, 1997; Beaudenon *et al.*, 1999) bzw. die Vorläufer der Transkriptionsfaktoren Spt23 und Mga2 durch das 26S-Proteasom limitiert prozessiert und damit aktiviert (Hoppe *et al.*, 2000). Ob andere HECT-Ligasen ähnlich vielfältige Aufgaben übernehmen können, ist unklar.

1.4.1.2 HERC-Proteine

Eine kleine Subfamilie der HECT-Proteine besitzt eine oder mehrere Regionen, die homolog sind zu RCC1 („Regulator of Chromosome Condensation 1“). Das chromatingebundene RCC1-Protein ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF = guanine nucleotide exchange factor) für die im aktiven Kerntransport wichtige kleine GTPase Ran (Bischoff und Ponstingl, 1991; Görlich *et al.*, 1996). Proteine, die sowohl eine RCC1- als auch eine HECT-Domäne tragen, werden als HERC (HECT und RCC1) Proteine bezeichnet (Ji *et al.*, 1999). Interessanterweise kodieren das *S. cerevisiae*- und das *C. elegans*-Genom nicht für HERC-

Proteine, was auf eine in der Evolution spätere Entwicklung dieser Gene hinweisen könnte. Bisher sind vier humane Mitglieder (HERC1-4) genauer beschrieben, die in sich vermutlich die Funktion eines GEFs und eines E3s vereinen (Rosa *et al.*, 1996; Ji *et al.*, 1999; Mitsui *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2001). HERC1 und HERC2 gehören mit über 500 kDa zu den größten bekannten Proteinen. Ihre genauen Aufgaben in der Zelle sowie mögliche Ubiquitinierungssubstrate sind nicht bekannt. Mutationen im *HERC2*-homologen Gen in der Maus führen zum sogenannten „runty, jerky, sterile“ (*rjs*)- oder auch „juvenile development and fertility 2“ (*jfd*)-Syndrom, das durch neuromuskulären Tremor und Schwäche sowie Fertilitätsstörungen, Kleinwuchs und häufige juvenile Letalität gekennzeichnet ist (Walkowicz *et al.*, 1999). Warum es durch Mutationen im *HERC2*-Gen zu diesen Symptomen kommen kann, ist unbekannt.

1.4.1.3 Andere HECT-Ligasen

Eine weitere Gruppe von HECT-Ligasen trägt keine bekannten oder keine einheitlichen Proteininteraktionsdomänen. Hierzu zählen HECT-Ligasen mit unterschiedlichen, teilweise funktionell noch nicht charakterisierten Proteinmotiven, wie PABC („poly(A)-binding protein C-terminal domain“) (Kozlov *et al.*, 2001; 2002), WWE (benannt nach ihren konservierten Aminosäuren) (Aravind, 2000), Uba (Ubiquitin-assoziierte)-Domänen (vgl. 1.7.3) oder UIM („ubiquitin-interacting motif“) (vgl. 1.7.4). In diese uneinheitliche Gruppe wird auch die Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP, die in 1.8 genauer vorgestellt wird, eingeordnet.

1.4.2 RING-Finger-Ligasen

RING-Finger-Ligasen zeichnen sich durch eine sogenannte RING-Finger-Domäne aus, eine Proteininteraktionsdomäne, die man erstmals für das „really interesting new gene“ (RING)-Protein beschrieben hat (Freemont *et al.*, 1991; Lovering *et al.*, 1993). Die RING-Domäne, die eine charakteristische cystein- und histidinhaltige, zinkionenbindende Struktur bildet, ist vermutlich katalytisch inert. Im Gegensatz zu HECT-Ligasen vermitteln RING-Finger-Ligasen indirekt, wahrscheinlich durch gleichzeitige Bindung und räumliche Annäherung von E2-Enzym und Substrat, die direkte Übertragung des Ubiquitins vom E2-Enzym auf das Zielprotein. Dabei bindet das E2-Enzym an das RING-Finger Motiv, während das Substrat mit anderen Proteininteraktionsdomänen der Ligase interagiert. Der genaue Übertragungsmechanismus des Ubiquitins auf das Substrat ist nicht bekannt. RING-Finger-Proteine sind unter Eukaryoten weit verbreitet. In den Datenbanken sind über hundert

menschliche RING-Finger-Proteine verzeichnet. Wieviele dieser Proteine tatsächlich RING-Finger-Ligasen oder Bestandteile von RING-Finger-Ligasen sind, ist unklar.

Proteine mit einer RING-Finger-Domäne können allein die Funktion einer E3-Ligase übernehmen oder als Bestandteil eines sich aus verschiedenen Proteinen zusammensetzenden Komplexes eine aktive Ubiquitin-Protein-Ligase bilden. Dementsprechend unterscheidet man monomere bzw. homodimere und multimere bzw. heterodimere RING-Finger-Ligasen. (zusammengefasst in: Jackson *et al.*, 2000; Pickart *et al.*, 2001).

1.4.2.1 Monomere oder homodimere RING-Finger-Ligasen

Bei monomeren oder homodimeren RING-Finger-Ligasen liegen die Substratbindestelle und das RING-Finger-Motiv auf dem gleichen Protein. Ein wichtiges Beispiel ist das murine Protein Mdm2 („murine double minute 2“) bzw. sein humanes Homolog Hdm2 („human Mdm2“), ein E3 für den Tumorsuppressor p53 (Balint und Vousden, 2001; Alarcon-Vargas und Ronai, 2002). Verschiedenste Stress-Stimuli wie DNA-Schäden, Hypoxie und aktivierte zelluläre oder virale Onkogene führen zu einer Stabilisierung und Aktivierung des Tumorsuppressors p53 in der Zelle, was vor allem durch die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor zum Zellzyklusarrest und zur Reparatur bzw. zur Elimination geschädigter Zellen durch Apoptoseinduktion führt. Auf diese Weise wird die Proliferation entarteter Zellen, die zur Entstehung von Tumoren führen kann, ausgeschlossen (zusammengefasst in: Levine, 1997). Die Bedeutung dieses Mechanismus für die zelluläre Regulation wird am Beispiel von menschlichen Tumoren deutlich, die zu 50 % einen Defekt im *p53*-Gen aufweisen (Hainaut *et al.*, 1998). Unter normalen Wachstumsbedingungen ubiquitiniert Hdm2 den Tumorsuppressor p53 und markiert ihn damit für den proteasomalen Abbau, was p53 in Abwesenheit von Aktivierungsstimuli zu einem kurzlebigen Protein macht, das nur in geringer Menge in der Zelle vorliegt. Zusätzlich kann Hdm2 bzw. Mdm2 sich selbst ubiquitinieren und damit seinen eigenen Abbau regulieren (Fang *et al.*, 2000; Honda *et al.*, 2000).

Ein weiteres interessantes Beispiel für eine monomere RING-Finger-Ligase ist RLIM. RLIM ubiquitiniert CLIMs und markiert sie damit für den Abbau durch das Proteasom (Ostendorff *et al.*, 2002). CLIMs aktivieren als Kofaktoren Transkriptionsfaktoren der LIM-HD-Familie, die eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Neuronen spielen (Bach, 2000). RLIM führt also über seine ubiquitinierenden Eigenschaften indirekt zu einer Hemmung der

Aktivierung von LIM-HD-Transkriptionsfaktoren und reguliert damit die Differenzierung von Neuronen.

1.4.2.2 Multimere oder heterodimere RING-Finger-Ligasen

Komplexere RING-Finger-Ligasen setzen sich aus verschiedenen Proteinen zusammen, von denen mindestens eines ein RING-Finger-Motiv trägt. Dabei variiert die Anzahl der für die Ausbildung einer solchen katalytisch aktiven RING-Finger-Ligase notwendigen unterschiedlichen Untereinheiten. So ist z. B. ein heterodimerer Komplex aus dem RING-Finger-Protein BRCA1 („breast cancer type 1“) und dem RING-Finger-Protein BARD1 („BRCA1-associated RING domain protein 1“) ein aktives E3, das sich selbst und vermutlich auch andere Substrate ubiquitiniert und damit tumorsupprimierende Eigenschaften vermittelt (Baer *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002). Es sind jedoch auch Proteinkomplexe mit RING-Finger-Ligase-Aktivität aus bis zu zwölf verschiedenen Untereinheiten bekannt (zusammengefasst in: Jackson *et al.*, 2000; Pickart, 2001). Zu diesen multimeren RING-Finger Ligasen gehören der SCF („Skp1-Cullin1-F-Box“-Komplex, der VBC-CUL2 („von-Hippel Lindau-Elongin B und C CUL2“) Komplex und der APC („anaphase promoting complex“). SCF- und VBC-CUL2-Komplexe zeigen große Ähnlichkeiten in ihrer Architektur. Sie verfügen beide über das kleine RING-Finger-Protein Rbx, welches mit bestimmten E2s interagieren kann. Die Substraterkennung erfolgt bei SCF-Komplexen über F-Box-Proteine und bei VBC-CUL2-Komplexen über SOCS-Box-Proteine (Weissman, 2001). Abhängig vom im Komplex vertretenen F-Box- bzw. SOCS-Box-Protein können unterschiedliche Substrate erkannt und ubiquitiniert werden. Weiterhin weisen beide Komplexe eine Untereinheit auf, die zu der Familie der Culline gehört (CUL1/Cdc53 in SCF-Komplexen bzw. CUL2 in VBC-CUL2-Komplexen). Sowohl SCF- als auch VBC-CUL2-Komplexe binden über Elongine (Elongin A/Skp1 in SCF-Komplexen bzw. Elongin B und C in VBC-CUL2-Komplexen) an die substraterkennende Untereinheit des jeweiligen Komplexes. Der aus über zehn Untereinheiten bestehende APC zeigt ebenfalls Parallelen zu den eben beschriebenen Komplexen. Eine für seine Aktivität notwendige Untereinheit ist das RING-Finger-Protein Apc11. Apc2, eine weitere Untereinheit des APC ist ein Protein der Cullin-Familie.

1.4.3 U-Box-Ligasen

Erst kürzlich wurde eine neue Familie von Ubiquitin-Protein-Ligasen identifiziert, die U-Box-Ligasen. Mitglieder dieser Familie besitzen eine sogenannte U-Box, die in ihrer Struktur den RING-Finger-Domänen ähnelt, jedoch nicht durch die Bindung von Zinkionen sondern durch die Ausbildung von Salzbrücken stabilisiert wird (Aravind und Koonin, 2000). U-Box-Ligasen verhalten sich ähnlich wie RING-Finger-Ligasen. Sie ermöglichen durch die räumliche Annäherung von E2 und Substrat die direkte Übertragung des Ubiquitins auf das Zielprotein. Dabei ist die U-Box analog zum RING-Finger die Interaktionsdomäne für das E2 (Pringa *et al.*, 2001). Bisher sind fünf verschiedene U-Box-Ligasen in Säugerzellen bekannt (Cyr *et al.*, 2002). Am besten charakterisiert ist die U-Box-Ligase CHIP („C-terminal Hsp70 interacting protein“). CHIP interagiert mit den Hitzeschockproteinen Hsp70 und Hsp90 und ubiquitiniert an die Chaperone gebundene Substrate, wie z. B. denaturierte oder falsch gefaltete Proteine (Murata *et al.*, 2001). CHIP ist damit Bestandteil der Proteinqualitätskontrolle in der Zelle, die die Akkumulation von abnormalen Proteinen und somit die Entstehung von toxischen Proteinaggregaten verhindert (Cyr *et al.*, 2002).

1.5 Ubiquitinierungssignale und Substraterkennung

Eine der wichtigsten Fragen bei der Ubiquitinierung von Proteinen betrifft die Regulation dieses Prozesses. Wie entscheidet sich, ob und wie ein bestimmtes Protein ubiquitiniert wird? Bisher ist wenig darüber bekannt, welche Mechanismen zur Erkennung eines Proteins als Ubiquitinierungssubstrat beitragen. Es wird davon ausgegangen, dass Substrate in der Regel von mindestens einem ihnen zugeordneten, spezifischen E3 erkannt werden (Glickman und Ciechanover, 2002). Ubiquitinierungssignale können Konsensusmotive von Proteinen sein, die sie für bestimmte E3s als Substrate erkennbar machen. Ein Beispiel für ein solches Konsensusmotiv ist die N-terminale „destruction box“ von einigen Cyclinen, die für die Erkennung durch den APC notwendig ist (Peters, 2002). Weiterhin ist eine Abfolge von sechs Aminosäuren, von denen zwei phosphoryliert vorliegen müssen, als Ubiquitinierungssignal für einen bestimmten SCF-Komplex beschrieben (Yaron *et al.*, 1997). Neben spezifischen Phosphorylierungen tragen auch andere Substratmodifikationen, wie z. B. N-Glykosylierungen (Yoshida *et al.*, 2002) oder Hydroxylierungen (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001), zur Erkennung von Zielproteinen über bestimmte Motive von E3s bei. Die Freilegung oder Konjugation einer destabilisierenden Aminosäure (destabilisierend sind F, L, W, T, I, R, K, H) am N-Terminus eines Proteins führt zu dessen Ubiquitinierung durch die

RING-Finger-Ligase Ubr1 (bei Säugern E3 α) und damit zum Abbau durch das 26S-Proteasom. Es wurde gezeigt, dass dieser Zusammenhang eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der chromosomalen Stabilität in *S. cerevisiae* (Rao *et al.*, 2001) und bei der kardiovaskulären Entwicklung von Säugern spielt (Kwon *et al.*, 2002). Die Beziehung zwischen der metabolischen Stabilität eines Proteins und der Identität seiner N-terminalen Aminosäure ist schon lange bekannt und wird als „N-end-rule“ bezeichnet (Bachmair *et al.*, 1986). In anderen Fällen wird das Zielprotein nicht direkt, sondern über ein Hilfsprotein erkannt. Die U-Box Ligase CHIP (vgl. 1.4.3) kann beispielsweise über seine Bindung an Hsp70 oder Hsp90 falsch gefaltete und denaturierte Proteine ubiquitinieren und dem Abbau zuführen (Murata *et al.*, 2001). Ähnlich kann ein bestimmter SCF-Komplex (vgl. 1.4.2.2) das T-Zell-Oberflächenmolekül CD4 nur nach Vermittlung durch das Vpu-Protein des humanen Immundefizienzvirus (HIV) ubiquitinieren (Margottin *et al.*, 1998).

1.6 Deubiquitinierende Enzyme

Ubiquitin-Konjugation ist ein reversibler Prozess. Die der Ubiquitin-Konjugation entgegengerichtete Reaktion ist die sogenannte Ubiquitin-Dekonjugation oder Deubiquitinierung, die in der Zelle von Thiolproteasen, die die Isopeptidbindung zwischen Ubiquitin und Substrat hydrolysieren, katalysiert wird. Substrate können auch Ubiquitin-Ketten oder Ubiquitin-Vorläufer (vgl. 1.3) sein, so dass es zur Auflösung von Ubiquitin-Ketten bzw. zur Entstehung neuer, freier Ubiquitin-Moleküle kommt. Die deubiquitinierenden Thiolproteasen werden auch als deubiquitinierende Enzyme (DUBs) bezeichnet. Das Genom von *S. cerevisiae* kodiert für 19 verschiedene DUBs, höhere Eukaryoten verfügen über mehr als 40 größtenteils kaum genauer charakterisierte DUBs. Ausgehend von Unterschieden in Größe, Aminosäuresequenz und aktivem Zentrum werden DUBs in zwei Gruppen eingeteilt: Ubiquitin-C-terminale Hydrolasen (UCHs) und Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBPs). DUBs sind für die Bildung von Ubiquitin aus Vorläuferproteinen (vgl. 1.3) sowie für das Recycling von Ubiquitin und damit für die Aufrechterhaltung der Menge an freiem Ubiquitin in der Zelle wichtig. Neben diesen Haushaltsfunktionen übernehmen DUBs auch Aufgaben in der Regulation spezifischer zellulärer Prozesse (zusammengefasst in: Chung und Baek, 1999; Wilkinson, 2000). So konnte z. B. gezeigt werden, dass ein DUB in *Drosophila melanogaster* eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Photorezeptors spielt (Isaksson *et al.*, 1997).

1.7 Ubiquitin-ähnliche Proteine und Ubiquitin-assoziierte Motive

Neben Ubiquitin gibt es weitere Proteine, die in einem der Ubiquitin-Konjugation vergleichbaren Mechanismus kovalent an Proteine gebunden werden. Sie werden als Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ I zusammengefasst. Im Gegensatz dazu werden Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ II nicht an andere Proteine konjugiert; sie verfügen aber in ihrer Sequenz über Bereiche, die homolog zu Ubiquitin sind, sogenannte „ubiquitin-like“ (Ubl)-Domänen (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Weitere Proteine, die im Zusammenhang mit Ubiquitin beschrieben werden, verfügen über Ubiquitin-assoziierte Domänen (UBA) (Hofmann und Bucher, 1996) oder Ubiquitin-interagierende Motive (UIM) (Hofmann und Falquet, 2001).

1.7.1 Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ I

Neben Ubiquitin exprimieren alle Eukaryoten noch andere kleine Proteine, die Proteine durch kovalente Bindung posttranslational modifizieren können. Diese Modifikationen haben unterschiedliche funktionelle Auswirkungen, können aber ihre Substrate im Gegensatz zu Ubiquitin nicht für den direkten Abbau durch das 26S-Proteasom markieren. Da die Konjugation dieser Proteine an ihre Zielproteine dem Mechanismus der Ubiquitin-Übertragung ähnelt, werden sie als Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ I („ubiquitin-like modifiers“) zusammengefasst (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ I werden in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasst Proteine, die in ihrer Aminosäuresequenz Homologien zu Ubiquitin zeigen. Zu dieser Gruppe gehören u. a. SUMO („small ubiquitin like modifier“) und Nedd-8 („neural expressed developmentally downregulated protein 8“) (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Die SUMO-Aminosäuresequenz ist zu 18 % identisch und zu 50 % ähnlich zur Ubiquitin-Sequenz, die von Nedd-8 zu 59 % identisch und zu 70 % ähnlich (Pickart, 1998). SUMOlierung kann unterschiedliche Effekte wie z. B. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 (Gostissa *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999) oder die korrekte Lokalisierung von verschiedenen Proteinen, z. B. des Tumorsuppressors PML („promyelocytic leukemia protein“) (Müller *et al.*, 1998), vermitteln. Bevorzugte Substrate von Nedd-8 sind Mitglieder der Cullin-Familie. Dazu gehören z. B. CUL1 und CUL2, die Untereinheiten der SCF- bzw. VBC-CUL2-Komplexe sind (Lammer *et al.*, 1998; Liakopoulos *et al.*, 1999) (vgl. 1.4.2.2). Die Nedd-8-Konjugation an Cullin-Untereinheiten ist für die Funktion dieser multimeren RING-Finger-Ligasen notwendig (Morimoto *et al.*, 2000; Podust *et al.*, 2000; Read *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2002). Weitere

Funktionen und Substrate der Nedd-8-Konjugation sind bisher nicht bekannt. Die zweite kleinere Gruppe der Ubiquitin-ähnlichen Proteine vom Typ I umfasst Proteine, deren Sequenz der Ubiquitin-Aminosäuresequenz zwar nicht verwandt ist, die aber ähnlich wie Ubiquitin an Proteine konjugiert werden. Zu dieser Gruppe gehören u. a. die Proteine Apg12 und Apg8, deren Konjugation eine wichtige Rolle in der Autophagie, dem Transport zytoplasmatischen Materials in das Lysosom, spielt (Ohsumi, 2001).

1.7.2 Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ II

Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ II zeichnen sich durch eine vorwiegend N-terminal gelegene, 60 bis 80 Aminosäuren umfassende Ubl-Domäne aus (Abb. 3). Dabei sind die Ubl-Domänen unterschiedlicher Ubiquitin-ähnlicher Proteine vom Typ II, im Folgenden kurz „Ubl-Proteine“ genannt, nicht identisch. Die Ähnlichkeit der Ubl-Domänen mit der Aminosäuresequenz von Ubiquitin variiert zwischen 40 und 60 %, wobei sich insbesondere der C-terminale Bereich der Ubl-Domäne von Ubiquitin unterscheidet (Pickart, 1998). Viele Ubl-Proteine besitzen zusätzlich zu ihrer Ubl-Domäne eine Uba-Domäne (vgl. 1.7.3). Solche Proteine werden im Rahmen dieser Arbeit als „Ubl/Uba-Proteine“ bezeichnet (Abb. 3)

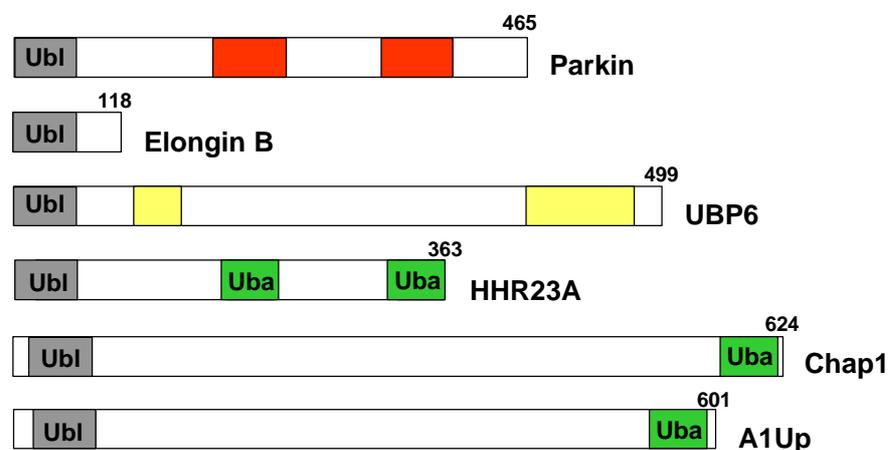


Abb. 3: Schematische Übersicht über verschiedene Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ II. Ubiquitin-ähnliche Proteine vom Typ II tragen ihre Ubl-Domänen normalerweise am N-terminalen Ende. Sie spielen in unterschiedlichen Zusammenhängen eine Rolle. Parkin ist eine RING-Finger Ligase, die RING-Domänen sind rot markiert. Elongin B ist ein Bestandteil des VBC-CUL2-Komplexes (vgl. 1.4.2.2). UBP6 ist ein *S. cerevisiae* DUB. Seine katalytischen Domänen sind gelb gekennzeichnet. HHR23A, CHAP1 und A1Up besitzen zusätzlich eine oder zwei Uba-Domänen. Sie werden als Ubl/Uba-Proteine bezeichnet. Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Proteine an.

Viele Ubl-Proteine übernehmen eine aktive Rolle in der Ubiquitinierung oder auch Deubiquitinierung (Jentsch und Pyrowolakis, 2000) (Abb. 3). Dazu gehört z. B. die RING-

Finger-Ligase Parkin, deren Funktionsverlust zur Entstehung von juvenilem Parkinson führt (Shimura *et al.*, 2000). Weiterhin verfügen z. B. Elongin B, eine Adaptoruntereinheit des VBC-CUL2-Komplexes, sowie UBP6, ein DUB aus der Hefe, über eine Ubl-Domäne (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Welche Funktionen die Ubl-Domänen dieser Proteine übernehmen, ist nicht bekannt.

Beispiele für Ubl/Uba-Proteine sind *S. cerevisiae* Rad23 bzw. seine humanen Homologe HHR23 („human homolog of Rad23“) A und B sowie die humanen Proteine CHAP1 (auch genannt: Ubiquilin 2 oder hPLIC2) und A1Up („Ataxin-1 ubiquitin-like interacting protein“) (Abb. 3). Sie weisen neben einer Ubl-Domäne noch eine (CHAP1, A1Up) oder zwei (Rad23, HHR23A, HHR23B) Uba-Domänen (vgl. 1.7.3) auf. Rad23-Proteine übernehmen eine wichtige Funktion in der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) von DNA. Im Komplex mit Rad4 bzw. dem humanen Rad4-Homolog XPC („Xeroderma Pigmentosum C-protein“) erkennen sie DNA-Schäden und dienen als Kristallisationskeim für die Anlagerung weiterer für die DNA Reparatur wichtiger Faktoren (Masutani *et al.*, 1994; Prakash und Prakash, 2000). Für diese Funktion ist die Ubl-Domäne von Rad23 notwendig (Watkins *et al.*, 1993). Weiterhin wurde für Rad23 über seine Ubl-Domäne eine Bindung an das 26S-Proteasom gezeigt. (Schauber *et al.*, 1998). Für HHR23A und B konnte als Bindungspartner der Ubl-Domänen das S5a-Protein des regulatorischen 19S-Komplexes des 26S-Proteasom identifiziert werden (vgl. 1.2.1) (Hiyama *et al.*, 1999). Auch CHAP1 bindet über seine Ubl-Domäne an S5a (Walters, 2002). Für Rad23 ist die Wechselwirkung mit Rpn1, einer weiteren Untereinheit des 19S-Komplexes des *S. cerevisiae* 26S-Proteasoms beschrieben worden (Elsasser *et al.*, 2002). Ob Ubl-Proteine generell über ihre Ubl-Domänen mit dem 26S-Proteasom interagieren, ist nicht bekannt. Interessanterweise ist für Rad23 unabhängig von seiner Ubl-Domäne eine inhibierende Wirkung auf Ubiquitinierungen und auf den proteasomalen Abbau gezeigt worden (Ortolan *et al.*, 2000). Wie diese Hemmung durch Rad23 vermittelt wird, ist genauso wie die physiologische Bedeutung dieser Funktion in der Zelle noch unbekannt.

Über die Aufgaben von CHAP1 und A1Up ist im Vergleich zu denen der Rad23-Proteine weitaus weniger bekannt. CHAP1 wurde sowohl als Bindungspartner des Stch-Proteins, eines Chaperons mit noch nicht genau charakterisierter Funktion, als auch des Plasmamembranrezeptors IAP („integrin associated protein“), der bei der Bindung des Zytoskeletts an die Plasmamembran eine Rolle spielt, beschrieben (Kaye *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1999). CHAP1 ist weiterhin ein humanes Homolog des *S. cerevisiae* Proteins Dsk2 und übernimmt vermutlich gemeinsam mit Rad23 Aufgaben bei der Spindelpol-Duplikation

(Biggins *et al.*, 1996). A1Up ist CHAP1 in seiner Aminosäuresequenz sehr ähnlich und interagiert im Nukleus über seine Ubl-Domäne mit Ataxin-1, einem Protein unbekannter Funktion (Davidson *et al.*, 2000).

1.7.3 Proteine mit Uba-Domänen

Ubiquitin-assoziierte (Uba) Domänen erhielten ihren Namen aufgrund ihres Vorkommens in vielen Proteinen, die einen Bezug zum Ubiquitin-System haben, wie z. B. in unterschiedlichen DUBs, E2s, RING-Finger- und HECT-Ligasen oder vielen Ubl/Uba-Proteinen (vgl. 1.7.2) (Hofmann und Bucher, 1996). Sie kommen aber auch in Proteinen vor, die in keinem offensichtlichen Zusammenhang zum Ubiquitin-System stehen, wie z. B. in verschiedenen Proteinkinasen. Uba-Domänen umfassen ca. 50 Aminosäuren, von denen einige unpolare Reste stark konserviert sind. Zu Beginn dieser Arbeit wurde vermutet, dass Uba-Domänen Sekundärstrukturen ausbilden, die eine Interaktion mit Ubiquitin erlauben und somit allgemeine Ubiquitin-Bindemotive sind (Hofmann und Bucher, 1996). Eine direkte Bindung von Ubiquitin an eine Uba-Domäne war aber nur für das Protein P62, einem Interaktionspartner der Src-Tyrosinkinase Lck, gezeigt worden (Vadlamudi *et al.*, 1996).

1.7.4 Proteine mit UIMs

Ubiquitin-interagierende Motive (UIMs) umfassen nur ungefähr 20 Aminosäuren und bilden vermutlich eine Helix aus, die sich in die Faltung des Gesamtproteins einpasst (Hofmann und Falquet, 2001). Ursprünglich wurden sie als Ubiquitin-bindende Motive in der S5a-Untereinheit des 19S-Komplexes des 26S-Proteasoms entdeckt (Young *et al.*, 1998). UIMs kommen aber auch in vielen anderen Proteinen, häufig mit mehreren Wiederholungen, vor, z. B. in zwei verschiedenen Subgruppen der DUBs, einem F-Box-Protein, einer pflanzlichen HECT-Ligase und anderen Proteinen mit Uba- oder U-Box-Domänen (Hofmann und Falquet, 2001) (Abb. 4). UIMs liegen auch in Proteinen vor, bei denen kein offensichtlicher Zusammenhang zum Ubiquitin-System besteht, wie z. B. in Ataxin-3 oder HRS („human growth factor-regulated tyrosine kinase substrate“) (Abb. 4). Mutationen im Ataxin-3 Gen, die zu einer Verlängerung der C-terminalen, ausschließlich aus Glutaminresten bestehende Proteinregion führen, verursachen die neurodegenerative Machado-Joseph-Krankheit, die auch als spinocerebrale Ataxie-3 bekannt ist (Kawaguchi *et al.*, 1994). Interessanterweise sind die Ubl/Uba-Proteine HHR23A und B Interaktionspartner von Ataxin-3 (Wang *et al.*, 2000). In welchem Zusammenhang die Interaktion zwischen Ataxin-3 und den HHR23-Proteinen zur

noch unbekannten Funktion von Ataxin-3 steht und ob die UIMs eine Rolle dabei spielen, ist noch unklar. Auffällig ist das Auftreten vieler Proteine mit UIMs, wie z. B. HRS, im Zusammenhang lysomaler Proteindegradation (Hofmann und Falquet, 2001). HRS, ein an der zytoplasmatischen Oberfläche von frühen Endosomen lokalisiertes Protein, spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der endosomalen Sortierung von Proteinen (Komada *et al.*, 1999; Raiborg *et al.*, 2002).

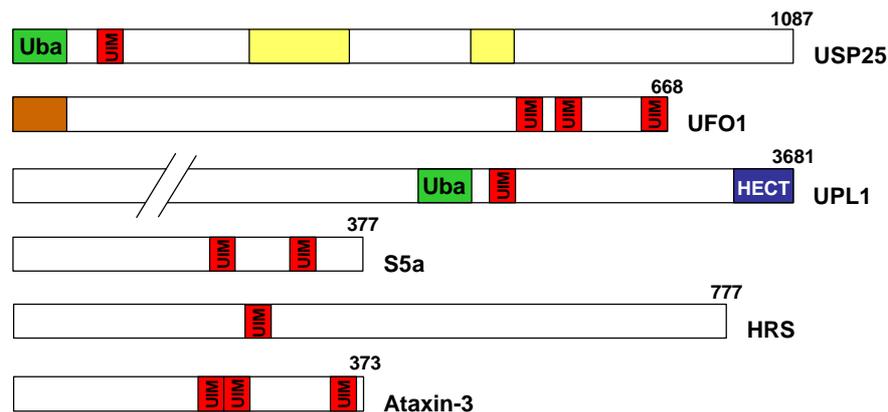


Abb. 4: Schematische Darstellung verschiedener Proteine mit UIMs. UIMs kommen in vielen Proteinen häufig mit mehreren Wiederholungen vor. USP25 ist eine humane DUB. Neben seinen beiden katalytischen Domänen (gelb) besitzt es eine N-terminale Uba-Domäne. UFO1 ist ein Protein mit einer F-Box (braun). UPL1 ist ein E3 aus *Arabidopsis thaliana*. Es verfügt neben der katalytischen HECT-Domäne auch über eine Uba-Domäne. Zu S5a, HRS und Ataxin-3 s. Text. Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Proteine an.

1.8 E6-AP

Die humane HECT-Ligase E6-AP (Abb. 5) wird durch das *UBE3A*-Gen auf Chromosom 15q11-q13 kodiert (Nakao *et al.*, 1994). Durch alternatives Spleißen entstehen drei in ihren unterschiedlichen Funktionen noch nicht näher charakterisierte Isoformen von E6-AP, die sich in ihren extremen N-Termini unterscheiden (Yamamoto *et al.*, 1997). E6-AP ist die erste Ubiquitin-Protein-Ligase, für die eine Thioesterbildung mit Ubiquitin gezeigt werden konnte (Scheffner *et al.*, 1995). Darüber hinaus wurde für E6-AP eine Koaktivatorfunktion für nukleäre Hormonrezeptoren beschrieben (Nawaz *et al.*, 1999).

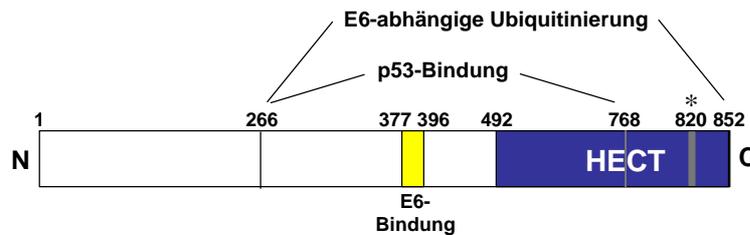


Abb. 5: Schema von E6-AP. Die Positionen der HPV E6-Binderegion (gelb) und der p53-Bindungsdomäne sowie der zur E6-abhängigen Ubiquitinierung von p53 erforderlichen Region von E6-AP (Huibregtse *et al.*, 1993) sind angegeben. Die katalytische HECT-Domäne ist blau markiert. Der katalytisch aktive Cysteinrest ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die Aminosäure-Positionen beziehen sich auf die Isoform I von E6-AP (Yamamoto *et al.*, 1997).

1.8.1 E6-abhängige Substrate von E6-AP

E6-AP wurde im Zusammenhang der Forschung an humanen Papillomviren (HPV) entdeckt (Huibregtse *et al.*, 1991; 1993). Einige HPV-Formen, sogenannte „high risk“-Typen, wie HPV16 und 18, spielen bei der Entstehung bestimmter oropharyngealer und anogenitaler maligner Tumoren, insbesondere des Zervixkarzinoms, eine kausale Rolle. Ihre onkogene Wirkung basiert auf der Aktivität der viralen E6- und E7-Proteine (zur Hausen, 2002). Für das E6-Onkoprotein konnte schon 1990 eine Bindung an p53, die den Abbau des Tumorsuppressors über das Ubiquitin/Proteasom-System induziert, gezeigt werden (Scheffner *et al.*, 1990). E6-AP wurde als Bestandteil des E6/p53-Komplexes entdeckt. Da es auch in Abwesenheit von p53 an E6 binden kann, wurde es als E6-assoziiertes Protein (E6-AP) bezeichnet. Weitere Untersuchungen ergaben, dass das virale E6-Onkoprotein zusammen mit E6-AP die Ubiquitinierung und damit den proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors p53 vermitteln kann (Scheffner *et al.*, 1993). Der E6/E6-AP-Komplex besitzt dabei die Eigenschaften einer Ubiquitin-Protein-Ligase für p53 und kann im Zusammenspiel mit Ubiquitin, E1, einem adäquaten E2 (z. B. Ubch5 oder Ubch7) und ATP p53 *in vitro* und *in vivo* ubiquitinieren (Scheffner *et al.*, 1993) (Abb. 6). In Mutationsstudien wurden die dafür notwendigen funktionellen Domänen von E6-AP bestimmt (Abb. 5). Die E6-Interaktionsdomäne liegt im Zentrum von E6-AP und umfasst 18 Aminosäuren (AS 377-396). Die Region, die die p53-Bindung vermittelt, beinhaltet diese E6-Binderegion und reicht von AS 266 bis 768. Für die E6-abhängige Ubiquitinierung von p53 ist der Bereich von AS 266-852 von E6-AP, der auch die vollständige katalytische HECT-Domäne (492-852) einschließt, notwendig (Huibregtse *et al.*, 1993).

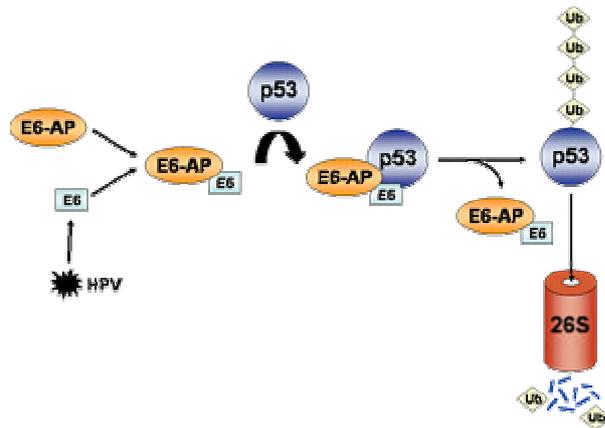


Abb. 6: E6/E6-AP-vermittelte Ubiquitinierung und Degradation von p53. E6-AP bildet einen stabilen Komplex mit „high-risk“ HPV E6. Der dimere Komplex bindet dann an p53 und induziert in Gegenwart von Ubiquitin, E1 und E2 dessen Polyubiquitinierung und Abbau durch das 26S-Proteasom.

E6-Onkoproteine induzieren neben dem Abbau von p53 auch den Abbau anderer Proteine in HPV-infizierten Zellen (Gross-Mesilaty *et al.*, 1998; Gardiol *et al.*, 1999; Thomas und Banks, 1999; Thomas *et al.*, 2002). Bisher ist jedoch nur für das humane Homolog des *Drosophila melanogaster* Tumorsuppressors hScrib (Nakagawa und Huibregtse, 2000), das für die Aufrechterhaltung der epithelialen Zellpolarität wichtig ist, und für E6TP („E6 targeted protein 1“), ein GTPase aktivierendes Protein (GAP) für die kleine GTPase Rap („ras related protein“), die E6-AP-Abhängigkeit des E6-vermittelten Abbaus gezeigt worden (Gao *et al.*, 1999). Weiterhin ist bekannt, dass E6-Onkoproteine die Autoubiquitinierung von E6-AP induzieren können (Kao *et al.*, 2000).

1.8.2 E6-unabhängige Substrate von E6-AP

E6-AP ist nicht nur in Anwesenheit des viralen E6-Proteins als E3 aktiv. Schon 1993 ist beschrieben worden, dass E6-AP in Zellsatzen HPV-negativer Zellen eine Ubiquitinierung von zellulären, nicht identifizierten Proteinen induzieren kann (Scheffner *et al.*, 1993). Darüber hinaus kann freies E6-AP, das nicht an ein Substrat gebunden ist, sich *in vivo* auch in Abwesenheit von E6 selbst ubiquitinieren und damit seinen eigenen Abbau fördern (Nuber *et al.*, 1998). Diese Autoubiquitinierung dient wahrscheinlich der Regulation der intrazellulären E6-AP-Konzentration. Weitere bekannte Bindungspartner von E6-AP sind: die Ubl/Uba-Proteine HHR23A und B (Kumar *et al.*, 1999) (vgl. 1.7.2), die noch nicht genauer charakterisierten Tyrosinkinase Blk („B lymphocyte-specific kinase“) und Lck („lymphocyte specific kinase“) (Oda *et al.*, 1999) aus der Src-Familie und Mcm7 („minichromosome maintenance protein 7“) (Kühne *et al.*, 1998), eine Untereinheit des für die DNA-Replikation

wichtigen RLF („replication licensing factor“). HHR23A, HHR23B (Kumar *et al.*, 1999) und aktivierte Blk (Oda *et al.*, 1999) stellen Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP dar und werden über das 26S-Proteasom abgebaut. Ob es sich bei HHR23A und HHR23B sowie bei der aktivierten Blk tatsächlich um physiologisch relevante Substrate von E6-AP handelt, ist jedoch noch unklar. Die E6-AP-Abhängigkeit ihres Abbaus wurde bisher *in vivo* nur unter Überexpressionsbedingungen von E6-AP getestet. Auch Mcm7 bindet an E6-AP (Kühne *et al.*, 1998). Es konnte aber noch nicht bestätigt werden, dass die *in vivo* beobachtete Ubiquitinierung und der nachfolgende Abbau von Mcm7 von E6-AP abhängen (Kühne *et al.*, 1998).

1.8.3 Angelman-Syndrom

Der Ausfall von funktionellem E6-AP ist mit einem erblichen Krankheitsbild verbunden, dem Angelman-Syndrom. Das Angelman-Syndrom ist eine neurologische Erkrankung, die mit einer Häufigkeit von 1/15.000 Neugeborenen auftritt. Angelman-Patienten sind geistig retardiert, haben ein erhöhtes Schlaganfallrisiko, Sprachstörungen, Koordinationsschwierigkeiten und weitere neurologische Ausfälle (zusammengefasst in: Williams *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1999; Cassidy *et al.*, 2000). Mutationen im mütterlichen Allel des E6-AP-Gens *UBE3A*, die die Expression von funktionellem E6-AP verhindern, sind für diese Erbkrankheit verantwortlich (Albrecht *et al.*, 1997; Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997). Die Assoziation der Erkrankung mit dem mütterlichen Allel kann auf seine alleinige Expression in den Purkinje-Zellen und Neuronen des Hippocampus im Gehirn zurückgeführt werden. Das väterliche Allel ist in diesen Bereichen stillgelegt (paternales Imprinting). In anderen Gebieten des Gehirns sowie in den somatischen Geweben werden sowohl das mütterliche als auch das väterliche Allel von *UBE3A* abgelesen (Albrecht *et al.*, 1997; Rougeulle *et al.*, 1997; Vu und Hoffmann, 1997). Die fehlende Ubiquitinierung eines oder mehrerer E6-AP-abhängiger Substrate in den genannten Gehirnzellen ist vermutlich verantwortlich für das beschriebene Krankheitsbild des Angelman-Syndroms (Lalande *et al.*, 1999). Die Funktion von E6-AP als Koaktivator für nukleäre Hormonrezeptoren steht nicht im Zusammenhang mit der Entstehung des Angelman-Syndroms, da bei den meisten Patienten die Koaktivatorfunktion im Gegensatz zur Ubiquitin-Protein-Ligase-Funktion von E6-AP intakt ist (Nawaz *et al.*, 1999). Die Identität der durch E6-AP regulierten Ubiquitinierungssubstrate in den betroffenen Gehirnzellen ist jedoch noch unklar. Die als Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP beschriebene Tyrosinkinase Blk (vgl. 1.8.2) wird nur in Lymphozyten und nicht in Gehirnzellen exprimiert (Drebin *et al.*, 1995). Eine Beteiligung der

fehlenden Ubiquitinierung von HHR23A und/oder HHR23B (vgl. 1.8.2) an der Entstehung des Angelman-Syndroms kann nicht ausgeschlossen werden (Kumar *et al.*, 1999). Aber auch weitere noch unbekannte Substrate von E6-AP könnten eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Angelman-Syndroms spielen.

1.9 Ziele der Arbeit

Obwohl die humane Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP als erstes Mitglied der Familie der HECT-Ligasen vor nun mehr als zehn Jahren entdeckt wurde, waren ihre physiologischen Funktionen und ihre Substrate in normalen (HPV-negativen Zellen) zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, Interaktionspartner und Substrate von E6-AP zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies sollte dazu beitragen, die Aufgaben, die E6-AP in der Zelle übernimmt, zu verstehen und möglicherweise erklären, warum die Inaktivierung von E6-AP in bestimmten Bereichen des Gehirns zum Angelman-Syndrom führt. Weiterhin war es Ziel, durch die Identifizierung von Substraten und assoziierten Proteinen von E6-AP das allgemeine Verständnis der Arbeitsweisen von Ubiquitin-Protein-Ligasen sowie des gesamten Ubiquitin-Proteasom-Systems zu verbessern. Für die Isolierung von Interaktionspartnern von E6-AP wurden das „Yeast Two Hybrid“-System (YTH) sowie zwei unterschiedliche biochemische Ansätze eingesetzt, die auf der Präzipitation von E6-AP-interagierenden Proteinen und E6-AP-abhängig ubiquitinierten Proteinen aus dem Zellysat beruhten. Die physiologische Relevanz der in den verschiedenen Ansätzen detektierten Interaktionen sollten *in vitro* und *in vivo* mit biochemischen, molekular- und zellbiologischen Methoden überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

HBS-Puffer:	20 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, Lagerung bei -20°C
Laemmli-Lauf-Puffer (10 x):	250 mM Tris-HCl (pH 8,4), 2 M Glycin, 1 % SDS
Laemmli-Stopp-Puffer:	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 10 % Glycerin, 100 mM DTT, 0,001 % Bromphenolblau, Lagerung bei -20°C
TNN-Lysepuffer:	1 % NP40 (IGEPAL), 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 1 mM DTT, je 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin, 1 mM PefaBloc SC (Roche, Mannheim)
PBS:	10,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,4), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
Puffer Z:	100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0), 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 50 mM β-Mercaptoethanol, Lagerung bei -20°C
Reaktionspuffer (10 x):	250 mM Glycylglycin, 150 mM MgSO ₄ (pH 7,8), Lagerung bei < 4°C in Glasflasche
STET-Puffer	8 % Saccharose, 50 mM Tris HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 5 % Triton
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris-HCl, 950 mM Essigsäure, 50 mM EDTA
TNE-T:	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,1 % Tween 20
Transferpuffer:	12,5 mM Tris-HCl, 100 mM Glycin (pH 8,3)

2.1.2 Medien

2.1.2.1 Medien *E. coli*

Vollmedium (LB)	10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Bacto-Trypton (Difco, Detroit, USA) (pH 7,5)
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 20 mM Glucose, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ (pH 7,5)

Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin zugesetzt. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2 % Agar (Difco).

2.1.2.2 Medien *S. cerevisiae*

Vollmedium (YPDA):	10 g/l Select Hefe Extrakt (Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe), 20 g/l Bacto™ Peptone (Difco), 30 ml/l Adenin-Lösung (100 mM), autoklavieren
Minimalmedium (SC)	5 g/l Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (Gibco BRL, Invitrogen), 15 g/l Ammoniumsulfat, 20 g/l Glucose, 4 g/l Aminosäuremix (bestehend zu je 6,25 % aus den folgenden Aminosäuren, angeben mit dem Einbuchstabencode: A, R, D, C, E, Q, G, I, M, F, P, S, T, Y, V), je 8 ml/l Uracil-Lösung (20 mM), Histidin-Lösung (100 mM), Leucin-Lösung (100 mM), Tryptophan-Lösung (40 mM), Lysin (40 mM), pH 5,9, autoklavieren

Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurde die entsprechenden Aminosäure oder Base dem Medium nicht zugesetzt. Feste Medien enthielten 2 % Agar (Difco).

2.1.2.3 Medien *S. pombe*

Vollmedium (YEALU):	5 g/l Hefeextrakt, 30 g/l Glucose, 225 mg/l Adenin, 225 mg/l Leucin, 225 mg/l Uracil, autoklavieren
Minimalmedium (EMM ₂):	3 g/l Kaliumhydrogenphthalat; 2,2 g/l Na ₂ HPO ₄ , 5 g/l NH ₄ Cl, 20 g/l Glucose, 20 ml/l 50x Salze, 1 ml/l 1.000 x Vitamine, 0,1 ml/l 10.000 x Mineralien, 0,23 g/l Adenin, sterilfiltrieren.
50 x Salze:	52,5 g/l MgCl ₂ , 0,735 mg/l CaCl ₂ , 50 g/l KCl, 2 g/l Na ₂ SO ₄ , sterilfiltrieren
1.000 x Vitamine:	1 g/l Pantothersäure, 10 g/l Nicotinsäure, 10 g/l Inositol, 10 mg/l Biotin, sterilfiltrieren
10.000 x Mineralien:	5 g/l Borsäure, 4 g/l MnSO ₄ , 4 g/l ZnSO ₄ , 2 g/l FeCl ₂ , 0,4 g Molybdänsäure, 1 g/l KCl, 0,4 g/l CuSO ₄ , 10 g/l Zitronensäure, autoklavieren, Zugabe einiger Tropfen Konservierungslösung (Chlorobenzol:Dichlorethan:Chlorobutan 1:1:2)
1.000 x Thiamin:	2 mM Thiaminiumdichlorid

Feste Medien enthielten 2 % Agar. Für die Herstellung von EMM₂-Selektionsplatten wurden sterilfiltrierte Mineralien-, Vitamin-, Salz-, Adenin- und Glucoslösungen erst nach dem Autoklavieren zugegeben. Unmittelbar vor Gebrauch der Platten wurden 200 µl 1.000 x Thiamin auf die Kulturplatten gestrichen.

2.1.2.4 Medien Insektenzellen

TNM-FH Insektenmedium (Sigma, Taufkirchen); 10 % fötales Kälberserum (FCS), 50 µg/ml Gentamycin

Grace Insektenmedium (Sigma)

2.1.2.5 Medien Säugerzellen

DMEM (Sigma, Taufkirchen), 10 % FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

RPMI-1640 (Sigma), 10 % FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

2.1.3 Zellen

2.1.3.1 Bakterienstämme

- *E. coli* DH5α, Genotyp: F⁻ φ80d *lacZ*ΔM15 Δ(*lac*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (r_K⁻ m_K⁺) *supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogen)
- *E. coli* BL21 (DE3), Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) βgal dcm* (DE3) (Novagen, Schwalbach)
- *E. coli* DH10B, Genotyp *mcrA ?(mrr-hsdRMS-mcrBC) ? 80dlacZ ? lacX74 deoR recA1 ara? 139 ?(ara, leu) 7697 galU galK rpsL endA1 nupG ?- tonA* (Invitrogen)

2.1.3.2 *S. cerevisiae*-Stamm

- *S. cerevisiae* KF1, Genotyp: *MATa trp1-901 leu2-3 112 his3-200 gal4? gal80? LYSZ GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2 : GAL7-lacZ SPAL10-URA3*, abgeleitet von PJ 69-4A (Butz *et al.*, 1999)

2.1.3.3 *S. pombe*-Stamm

- *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) *leu-*, Genotyp: *h-leu 1-32* (Braspenning *et al.*, 1997).

2.1.3.4 Insektenzellen

- Sf9 Zellen: abgeleitet von Eierstockzellen von *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (BD PharMingen, San Diego, USA); zur Amplifikation von rekombinanten Baculoviren verwendet.
- High Five™ Zellen: aus Eizellhomogenaten von *Trichoplusia ni* abgeleitet (Invitrogen); zur Expression von Proteinen verwendet, die durch rekombinante Baculoviren kodiert werden.

2.1.3.5 Humane Zelllinien

- RKO: Rektale Colonkarzinom-Zelllinie, (A. Pause, NIH Bethesda, USA)
- H1299: Großzellige Bronchialkarzinom-Zelllinie, p53-Null (H. Oie, NIH Bethesda, USA)

2.1.4 Zur Klonierung verwendete Plasmidvektoren

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die zur Klonierung verwendeten Plasmidvektoren.

Vektor	Charakteristika	Referenz
pRc/CMV	5,5 kb, Ampicillin-Resistenz; CMV-Promotor; zur <i>in vitro</i> -, und transienten Proteinexpression in Mammalia-Zellen verwendet	Invitrogen
pCDNA3-FLAG	5,4 kb, Ampicillin-Resistenz, CMV-Promotor, zur <i>in vitro</i> - und transienten Proteinexpression in Mammalia-Zellen verwendet, FLAG N-terminal	D. Roth, MPI, Frankfurt
pCDNA3-HA	5,4 kb, Ampicillin-Resistenz, CMV-Promotor, zur <i>in vitro</i> -Translation und transienten Proteinexpression in Mammalia Zellen verwendet, HA N-terminal	D. Roth
pDBLeu	9,9 kb, Kanamycin-Resistenz, GAL4-DNA-Bindedomäne, <i>Leu2</i> -Selektionsmarker, verwendet im YTH	Invitrogen
pPC86	7,1 kb, Ampicillin-Resistenz, GAL4-Aktivierungsdomäne, <i>Trp1</i> -Selektionsmarker, Ausgangsvektor cDNA-Bibliotheken	Invitrogen
pGEX-2TK	5,0 kb, Ampicillin-Resistenz, Protein A-Kinase A Erkennungssequenz, Thrombin-Schnittstelle, zur bakteriellen Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen verwendet.	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pET 3a	4,6 kb, Ampicillin-Resistenz, zur bakteriellen Proteinexpression verwendet	Novagen
pBluescript II SK (+)	3,0 kb, Ampicillin-Resistenz, zur <i>in vitro</i> -Translation verwendet	Stratagene
pRepL20-GST	8,9 kb, Ampicillin-Resistenz, Thrombin-Schnittstelle, <i>nmt1</i> -Promotor (Repression durch Thiamin), <i>LEU2</i> -Marker, <i>ars 1</i> , zur Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>S. pombe</i> verwendet	M. Tommasino, DKFZ, Heidelberg

Tabelle 1: Zur Klonierung verwendete Plasmidvektoren..

2.1.5 Verwendete DNA-Konstrukte

Die in den Tabellen 2 – 7 aufgeführten Konstrukte wurden für die vorliegende Arbeit hergestellt. Angegeben sind die Aminosäurepositionen der Proteine, die durch die jeweiligen Plasmide kodiert sind, sowie die Oligonukleotide, die zur Klonierung verwendet wurden, und die entsprechenden Restriktionsschnittstellen (RS).

2.1.5.1 pGEX-2TK-Konstrukte

Nummer	Protein	Aminosäuren	RS 5', 3'	Oligonukleotide
146	HHR23A	1-363	BamHI, XbaI	SG30, MS195
148	HHR23AΔUbl	82-363	BamHI, XbaI	SG31, MS195
150	HHR23AΔUba2	1-318	BamHI, XbaI	SG30, SG98
177	HHR23A-Ubl	1-87	BamHI, XbaI	SG30, SG145
163	HHR23A-Uba2	319-363	BamHI, XbaI	SG105, MS195
115	HHR23B	1-409	BamHI, XbaI	SG127, SG128
13	CHAP1	1-624	BamHI, EcoRI	SG10, SG11
47	CHAP1ΔUbl	91-624	BamHI, EcoRI	SG32, SG11
15	CHAP-Ubl	1-101	BamHI, EcoRI	SG10, SG12
152	CHAP-Uba	578-645	BamHI, EcoRI	SG85, SG11
98	A1Up	1-601	XhoI, NotI	SG79, SG80
63	Ataxin-3	1-373	BamHI, XbaI	SG51, SG53
176	Ataxin-3-2xUIM	212-275	BamHI, XbaI	SG146, SG142
56	Ataxin-3 180-291	180-291	BamHI, XbaI	SG55, SG56
76	HRS	1-777	BamHI, XbaI	SG94, SG73
179	HRS-UIM	245-297	BamHI, XbaI	SG148, SG149
73	S5a	1-377	XhoI, NotI	SG57, SG45
161	huHERC2-RCC1b	2959-3327	BamHI, XbaI	SG100, SG101
80	huHERC2 2918-3606	2918-3606	BamHI, XbaI	SG89, SG95

Tabelle 2: Klonierte pGEX-2TK-Konstrukte.

Die cDNA für Ataxin-3 (Isoform 1c) wurde freundlicherweise von O. Riess (Universität Rostock), die cDNA für S5a von S. Meiners (Charite, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Darüber hinaus wurden die folgenden pGEX-2TK-Konstrukte verwendet:

pGEX-2TK-Ubiquitin Scheffner *et al.*, 1993

pGEX-2TK-SUMO	Schwarz <i>et al.</i> , 1998
pGEX-2TK-Nedd8	M. Scheffner
pGEX-2TK-Hdm2	M. Scheffner
pGEX-2TK HPV16-E6	Huibregtse <i>et al.</i> , 1991

2.1.5.2 pCDNA3-HA, pCDNA3-FLAG- und pCDNA3-myc-Konstrukte

Nummer (HA/FLAG)	Protein	Aminosäuren	RS 5', 3'	Oligonukleotide
134/135	E6-AP	1-852	BamHI, HindIII	--
147/-	HHR23A	1-363	BamHI, XbaI	SG30, MS195
149/-	HHR23AΔUbl	82-363	BamHI, XbaI	SG31, MS195
151/-	HHR23AΔUba2	1-318	BamHI, XbaI	SG30, SG98
178/-	HHR23A-Ubl	1-87	BamHI, XbaI	SG30, SG145
133/-	HHR23A-Uba2	319-361	BamHI, XbaI	SG105, MS195
116/-	HHR23B	1-409	BamHI, XbaI	SG127, SG128
62	Ataxin-3	1-373	BamHI, Xba	SG51, SG53
176	Ataxin-3-2xUIM	212-275	BamHI, XbaI	SG152, SG153
184	Ataxin-1 + 2xUIM	1-816 Ataxin-1 + 224-263 2xUIM	EcoRI, XhoI XhoI, XbaI	SG139, SG140 SG141, SG142
175	HRS-UIM	245-297	BamHI, XbaI	SG148, SG149
73	S5a	1-377	XhoI, NotI	SG57, SG46
82/81	huHERC2 2918-3606	2918-3606	BamHI, XbaI	SG89, SG95

Tabelle 3: Klonierte pCDNA3-HA und pCDNA3-FLAG-Konstrukte.

Darüber hinaus wurden die folgenden pCDNA3-HA und pCDNA3-myc-Konstrukte verwendet:

pcDNA3-HA-RLIM	Bach <i>et al.</i> , 1999
pcDNA3-myc-CLIM2	Bach <i>et al.</i> , 1997

2.1.5.3 pRc/CMV-Konstrukte

Nummer	Protein	Aminosäuren	RS 5',3'	Oligonukleotide
68	FLASH 1543-1868	1543-1868	HindIII, XbaI	SG68, SG69
55	Ataxin-1	1-816	HindIII, XbaI	SG48, SG49
18	CHAP1	1-624	HindIII, NotI	SG14, SG15
48	CHAP1ΔUbl	92-624	HindIII, NotI	SG33, SG15
182	CHAP1-Ubl	1-102	HindIII, NotI	SG154, SG155
186	A1Up	1-601	HindIII, XbaI	SG77, SG78
72	S5a	1-377	HindIII, NotI	SG58, SG46
160	HERC2-RCC1b	2959-3328	HindIII, XbaI	SG99, SG101

Tabelle 4: Klonierte pRc/CMV-Konstrukte.

Darüberhinaus wurden die folgenden pRc/CMV-Konstrukte verwendet:

pRc/CMV-p53-wt T. Unger (Weizmann-Institut, Rehovot, Israel)

pRc/CMV-β-Galactosidase M. Scheffner

pRc/CMV-HPV16-E6 Werness *et al.*, 1990

2.1.5.4 pBluescript SKII-Konstrukte

Nummer	Protein	Aminosäure	RS 5', 3'	Oligonukleotide
69	DMPK 377-627	377-627	XhoI, EcoRI	SG66, SG67
70	HT2A	1-654	XhoI, EcoRI	SG70, SG71
71	HRS	1-777	XhoI, XbaI	SG72, SG73
144	muHERC2 2960-4837	2960-4837	EcoRI, XbaI	SG118, SG126

Tabelle 5: Klonierte pBluescript SKII-Konstrukte.

2.1.5.5 pDBLeu-Konstrukte

Nummer	Protein	Fragment	RS 5' 3'	Oligonukleotide
54	E6-AP C→A	1-852 (820 C→A)	NheI, NotI	SG42, BK10
51	CHAP1	1-624	NheI, NotI	SG22, SG15

Tabelle 6: Klonierte pDBLeu-Konstrukte.

Darüber hinaus wurden die folgenden pDBLeu-Konstrukte verwendet:

pDBLeu E6-AP M. Scheffner

2.1.5.6 pET 3a-Konstrukte

Nummer	Protein	Aminosäure	RS 5' 3'	Klonierung
159	Ubiquitin R29/R48/R63	1-76 K29R, K48R, K63R	NdeI, BamHI	Fragment isoliert aus Nr. 409 pET16B 3R Ubiquitin

Tabelle 7: Klonierte pET 3a-Konstrukte.

Darüber hinaus wurden die folgenden pDBLeu-Konstrukte verwendet:

pET3a-Weizenkeim E1	Hatfield und Vierstra, 1992
pET3a-UbcH5	Scheffner <i>et al.</i> , 1995
pET3a-UbcH7	Nuber <i>et al.</i> , 1996
pET3a-Ubiquitin R48	M. Scheffner
pET3a- Ubiquitin K48	You <i>et al.</i> , 1999
pET3a-Ubiquitin K27	You <i>et al.</i> , 1999
pET3a-Ubiquitin K0	You <i>et al.</i> , 1999
pET3a-Ubp1	R. T. Baker, Australian National University, Canberra, Australien
pET16b-His-Ubiquitin	M. Scheffner

2.1.5.7 pGEM-1-Konstrukte

pGEM-1-E6-AP 95 kD Huibregtse *et al.*, 1993

pGEM-1-E6-AP-HECT Schwarz *et al.*, 1998

pGEM-1-E6-AP Δ HECT M. Scheffner

2.1.5.8 Weitere Konstrukte

pCOC-Mdm2 Haupt *et al.*, 1997

pRepL20.GST-E6AP M. Scheffner

2.1.6 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Klonierung

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die synthetisch hergestellten Oligonukleotide zur Klonierung.

Nr.	Sequenz	Or.	Protein	AS
SG10	CGCGGATCCATGGCTGAGAATGGCGAG	5'BamH	CHAP1	1
SG12	GCGAATTCTTAGACAAGGTGAACAGTCAG	3'EcoRI	CHAP1	101
SG14	CCCAAGCTTCACCATGGCTGAGAATGGC	5'HindIII	CHAP1	1
SG15	ATAAGAATGCGGCCGCTTACGATGGCTGGGAGCC	3'NotI	CHAP1	624
SG22	GAATTCGCTAGCATGGCTGAGAATGGCGAGAGC	5'NheI	CHAP1	1
SG30	CGCGGATCCATGGCCGTCACCATCACGCTC	5'BamHI	HHR23A	1
SG31	CGCGGATCCATGCAGGGTACCTCAGCACCC	5'BamHI	HHR23A	83
SG32	CGCGGATCCATGATCCATGATGGGCTG	5'BamHI	CHAP1	92
SG33	CCCAAGCTTCACCATGATCCATGATGGGCTG	5'HindIII	CHAP1	92
SG46	ATAAGAATGCGGCCGCTCACTTCTTGCTTCCTCC	3'NotI	S5a	377
SG48	CCCAAGCTTCACCATGAAATCCAACCAAGAGC	5'HindIII	Ataxin 1	1
SG49	GCTCTAGACTACTTGCTACATTAGACCG	3'XbaI	Ataxin 1	816
SG51	CGCGGATCCATGGAGTCCATCTCCCACGAG	5'BamHI	Ataxin-3	1
SG53	GCTCTAGATTATTTTTTCTTCTGTTTTCAAATC	3'XbaI	Ataxin-3	373
SG55	CGCGGATCCATGATTAGGGTCCAACAGATG	5'BamHI	Ataxin-3	179
SG56	GCTCTAGATTATTCAAAGTAGGCTTCTCG	3'XbaI	Ataxin-3	290
SG57	CCGCTCGAGATGGTGTGGAAAGCACTATGG	5'XhoI	S5a	1
SG66	CCGCTCGAGCACCATGACTGCCATGGAGACACTG	5'XhoI	DMPK	377
SG67	GCGAATTCTTAGGGAGCGCGGGCGGCTCC	3'EcoRI	DMPK	627
SG68	CCCAAGCTTCACCATGACAAGCCGATCTGTTGC	5'HindIII	FLASH	1543
SG69	GCTCTAGATTAGTTTCTTCTTTTTGTG	3'XbaI	FLASH	1868
SG70	CCGCTCGAGCACCATGGCTGCAGCAGCAGC	5'XhoI	HT2A	1
SG71	GCGAATTCTTATGGGGTGAATATCTTC	3'EcoRI	HT2A	654
SG72	CCGCTCGAGCACCATGGGGCGAGGCAGCGGC	5'XhoI	HGS	1
SG73	GCTCTAGATTAGTCGAATGAAATGAGCTG	3'XbaI	HGS	777
SG77	CCCAAGCTTCACCATGGCGGAGCCGAGCGGGGCC	5'HindIII	A1Up	1
SG78	GCTCTAGATTAGGAGAGCTGGGAGCCCAG	3'XbaI	A1Up	601
SG79	CCGCTCGAGATGGCGGAGCCGAGCGGGGCC	5'XhoI	A1Up	1
SG80	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGGAGAGCTGGGAGCCCA	3'NotI	A1Up	601
SG85	CGCGGATCCATGCAGTTCATTCAGCAAATG	5'BamHI	CHAP1	578
SG89	CGCGGATCCATGGAAGATTTGGCTGCAG	5'BamHI	huHERC2	2916

SG95	GCTCTAGATTACGCGGCCGCTCTGCGAG	3' XbaI	huHERC2	3606
SG98	GCTCTAGATTACGCGGTCACCTGGATGTAG	3' XbaI	HHR23A	318
SG100	CGCGGATCCATGACCAAGGTGTTTGTGTGG	5' BamHI	huHERC2	2959
SG101	GCTCTAGATTACACAGTTGTCCACGCCAC	3' XbaI	huHERC2	3328
SG105	CCCAAGCTTCACCATGCAGGAGAAAGAAGCTATAG	5' HindIII	HHR23A	319
SG118	CGGAATTCACCATGACCAAAGTGTGTTGTGTGGG	5' EcoRI	muHERC2	2960
SG126	GCTCTAGATTAGTGTCTGTCAAGTAGTC	3' XbaI	muHERC2	4837
SG127	CGCGGATCCATGCAGGTCACCCTGAAGACC	5' BamHI	HHR23B	1
SG128	GCTCTAGATTAATCTTCATCAAAGTTCTG	3' XbaI	HHR23B	409
SG139	CGGAATTCATGAAATCCAACCAAGAGCGG	5' EcoRI	Ataxin 1	1
SG140	CCGCTCGAGCTTGCCCTACATTAGACC	3' XhoI	Ataxin 1	816
SG141	CCGCTCGAGATGTTAGACGAAGATGAGGAGG	5' XhoI	Ataxin-3	221
SG142	GCTCTAGATTATTGAGATATGTTTCTGGAAC	3' XbaI	Ataxin-3	266
SG148	CGCGGATCCATGCAGTCCCAGCTGCCCC	5' BamH	HGS	245
SG149	GCTCTAGATTAGGGCATGGGCTCCGCCTTG	3' XbaI	HGS	297
SG152	CGCGGATCCATGTTAGAAGCAAATGATGGC	5' BamHI	Ataxin-3	212
SG153	GCTCTAGATTAATTTGTACCTGATGTCTG	3' XbaI	Ataxin-3	275
SG154	CCCAAGCTTCACCATGGCTGAGATGGGCCCCCGCGC	5' HindIII	CHAP1	1*
SG155	ATAAGAATGCGGCCGCTTACTGGCTTTTCATGACAAGG	3' NotI	CHAP1	105**
BK10	ATTGCGGCCGCTTACAGC	3' NotI	E6-AP	852
MS195	GCGTCTAGATTACTCGTCATCAAAGTTCTG	3' XbaI	HHR23A	363

Tabelle 8: Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Klonierung. Die Erkennungssequenz für die jeweils angegebene(n) Restriktionsendonuklease(n) ist fett dargestellt (A, Adenin; C, Cytosin; G, Guanin; T, Thymin). Or., Orientierung des Oligonukleotids (5' oder 3'); Zahlen geben die korrespondierenden Aminosäure (AS)-Positionen auf Proteinebene an (rechte Spalte). Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Sigma. *, AS4 ist mutiert zu M; **, AS102 ist mutiert zu M.

2.1.7 cDNA-Banken

ProQuest™ „Two-Hybrid Human Brain cDNA Library“ (Invitrogen)

ProQuest™ „Two-Hybrid Human Skeletal Muscle cDNA Library“ (Invitrogen)

„Alala 2 cDNA Library“ (humane aktivierte T-Zellen) (Hu *et al.*, 1997)

2.1.8 Rekombinante Baculoviren

E6-AP (95 kDa-Form) Huibregtse *et al.*, 1993

E6-AP C→A (95 kDa-Form) Scheffner *et al.*, 1995

Rsp5 Huibregtse *et al.*, 1997
 E1 W. Krek, FMI, Basel, Schweiz

2.1.9 Antikörper

Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

Antikörper	Referenz	Verdünnung
monoklonaler Maus Anti-p53 IgG, DO-1	Dianova, Hamburg	1:1.000
monoklonaler Maus Anti-HA	Hiss Diagnostics, Heidelberg	1:1.000
monoklonaler Maus Anti-FLAG, M2	Sigma	1:1.000
polyklonaler Kaninchen Anti-GAL4-BD, <i>sc-577</i>	Santa Cruz, Heidelberg	1:1.000
polyklonaler Kaninchen Anti-c-Myc, A14	Santa Cruz	1:500
polyklonaler Kaninchen Anti-E6-AP	M. Scheffner	1:500
Peroxidase gekoppelter Ziege Anti-Maus IgG (H+L)	Dianova	1:5.000
Peroxidase gekoppelter Ziege Anti-Kaninchen IgG	Dianova	1:5.000

Tabelle 9: Verwendete Antikörper.

2.1.10 Längenstandards

λ (Lambda)-DNA Hind III-Marker (Gibco BRL):

23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 564, 125 bp (Endkonzentration 200 ng/ μ l)

Protein-Molekulargewichtsstandards (Gibco BRL):

- „High Range“: Lysozym 14,3, β -Lactoglobulin 18,4, Carboanhydrase 29, Ovalbumin 43, Bovines Serumalbumin 68, Phosphorylase B 97,4, Myosin (H-Kette) 200.
- „Low Range“: Insulin (α -Kette) 2,3, Insulin (β -Kette) 3,4, boviner Trypsin Inhibitor 6,2, Lysozym 14,3, β -Lactoglobulin 18,4, Carboanhydrase 29,1, Ovalbumin 43.

Die molaren Massen sind jeweils in kDa angegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen und Baculoviren

2.2.1.1 Kultivierung und Gefrierlagerung von Bakterien

Über Nacht (ÜN)-Kulturen von Bakterien wurden bei 37°C und ausreichender Belüftung in LB-Medium geschüttelt. Zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz wurden 100 µg/ml Ampicillin (Amp) zugesetzt. Für Plasmid-Minipräparationen wurden 3 ml LB-Amp-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und ÜN geschüttelt. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden 150 ml LB-Amp-Medium mit 1 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und gleichermaßen inkubiert. Zur Anlage von Dauerkulturen wurden 150 µl Glycerin steril in Cryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) eingefüllt. Dazu wurden 850 µl einer Bakterien-ÜN-Kultur gegeben, gemischt und bei – 70°C eingefroren.

2.2.1.2 Kultivierung und Gefrierlagerung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurden in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 30°C kultiviert. Falls keine Selektion erforderlich war, wurde YPDA-Vollmedium verwendet. Sollte auf die Gegenwart von Plasmiden selektioniert werden, wurde SC-Minimalmedium, in dem die entsprechenden Aminosäuren fehlten, verwendet. Für die Selektion auf Proteininteraktionen im „Yeast Two Hybrid“-System (YTH) wurde SC-Minimalmedium ohne Leucin ohne Tryptophan sowie zusätzlich ohne Adenin bzw. Histidin verwendet, wie angegeben. Platten ohne Histidin wurden 10 mM 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) zugesetzt. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Hefekulturen mit 15 % Glycerin versetzt und bei – 70 °C eingefroren.

2.2.1.3 Kultivierung und Gefrierlagerung von *S. pombe*

S. pombe wurde in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 30°C kultiviert. Als Vollmedium wurde YEALU eingesetzt, als Selektionsmedium EMM₂. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte wie unter 2.2.1.2 für *S. cerevisiae* beschrieben.

2.2.1.4 Kultivierung und Gefrierlagerung von eukaryotischen Zellen

Mammalia-Zelllinien wurden auf 10 cm Polystyrol-Gewebekulturschalen (Greiner, Frickenhausen) in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer 5 %igen Kohlendioxid-Atmosphäre kultiviert. RKO und H1299 und erhielten RPMI

1640 (SIGMA), jeweils komplementiert mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin (Pen), 0,1 mg/ml Streptomycin (Strep). Alle Zelllinien wurden je nach Bedarf gemäß Standardmethoden passagiert.

Sf9- und High Five™-Zellen wurden in TNM-FH-Medium (SIGMA) (komplementiert mit 10 % FCS und 50 ng/ml Gentamycin zum Vollmedium) bei 27°C inkubiert. Alle 2 – 3 Tage wurden die Zellen durch Abspülen geerntet und in einem geeigneten Verhältnis auf neue Kulturplatten mit frischem Vollmedium aufgeteilt.

Zur Gefrierlagerung wurden Zellen einer ca. 70 % konfluent bewachsenen 10 cm-Gewebekulturschale geerntet und 2 min bei 4°C und 500 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in vorgekühltem Einfriermedium (5,9 ml Vollmedium, 1,7 ml FCS, 1 ml DMSO) resuspendiert, in Cryoröhrchen portioniert, ÜN bei – 70°C in einer gepolsterten Box gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.5 Baculovirus-Infektion zur Virus-Amplifikation

Zur Virusamplifikation wurden ca. 10⁶ Sf9-Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach 20 min bei 27°C wurde das Medium mit nicht abgesetzten Zellen und Zelltrümmern abgenommen und durch frisches TNM-FH-Vollmedium ersetzt. Pro Platte wurden 50 µl des entsprechenden Virusstocks verwendet. 3 Tage nach Infektion wurde der virushaltige Überstand portioniert und bei – 80°C eingefroren.

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

a) Mini-Präparation:

DNA-Mini-Präparationen wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Stephen *et al.*, 1990) durchgeführt.

b) Midi-Präparation:

Die Präparation größerer Mengen DNA erfolgte mit Säulen der Firma Qiagen (Hilden) gemäß der Vorschrift des Herstellers.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Synthese von DNA-Fragmenten wurde neben der Taq- (Promega) v. a. die Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) verwendet, da letztere zusätzlich eine Kontroll-Lese-Aktivität

besitzt, die einem Falscheinbau von Nukleotiden vorbeugt. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben mit 0,1 bzw. 1 ng/μl (Taq bzw. Pfu) "template-DNA" durchgeführt.

2.2.4 Analyse und Klonierung von DNA

2.2.4.1 Enzymatische Modifikationen von DNA

Der Verdau von DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firmen NEB (Frankfurt am Main) oder Invitrogen. Dazu wurden 0,1 – 5 μg DNA in einem Volumen von 20 – 50 μl des entsprechenden 1 x Inkubationspuffers mit 1 – 10 U Enzym für 1 – 4 h im Wasserbad der entsprechenden Temperatur inkubiert.

2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse des Restriktionsverdaus wurde die jeweilige DNA mit 1/10 Volumen Stopp-Puffer (60 % Saccharose, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 0,25 M EDTA) versetzt und auf TAE-Agarosegelen (1 – 2 %) (Invitrogen) mit beigefügtem Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 μg/ml) aufgetrennt. Unter UV-Licht (254 nm) wurde das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Größenbestimmung der Fragmente erfolgte im Vergleich zu mit Hind III geschnittener λ-DNA.

2.2.4.3 Gelelution von DNA-Fragmenten

Nach Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung wurde das gewünschte DNA-Fragment unter langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAEX II-Gelextraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.4.4 Ligation

Zur Ligation eines oder mehrerer DNA-Fragmente in einen Zielvektor wurden 10 – 50 ng Vektor-DNA und 100 ng des oder der zu klonierenden Fragmente(s) eingesetzt. Bei Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden ("sticky ends") wurde der Ansatz 4 h bis ÜN bei 14°C mit 1 U T4-DNA-Ligase (Gibco BRL) in Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 50 μg/ml BSA) inkubiert. Bei Fragmenten mit glatten Enden ("blunt ends") erfolgte die Inkubation ÜN bei Raumtemperatur (RT).

2.2.4.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen und Transformation

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde die Methode nach Chung *et al.* (1989) verwendet. Zur Transformation von Bakterien wurden 10 ng DNA bzw. 4 µl eines Ligationsansatzes (vgl. 2.2.4.4) mit 100 µl kompetenten Bakterien gemischt und für 30 min auf Eis belassen. Danach wurde der Ansatz für 1 min bei 42°C und für 1 – 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Glucose-Medium (Glucose-Konzentration: 20 mM) wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C inkubiert und danach zur Selektion auf resistente Klone mit rekombinanter DNA auf einer LB-Platte mit Ampicillin oder Kanamycin ausplattiert. Die Platte wurde dann ÜN bei 37°C inkubiert.

2.2.4.6 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen und Elektroporation

Die Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen erfolgte nach dem Protokoll der Firma BioRad. 10 ml einer ÜN-Kultur des Bakterienstammes wurden in 1 l LB überimpft und für 2-3 Stunden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 x g, 15 min, 4°C), das Pellet zweimal mit 1 l eiskaltem sterilem Wasser gewaschen. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 20 ml eiskalter steriler 10 % Glycerinlösung gewaschen, abzentrifugiert, in 2,5 ml 10 % Glycerinlösung resuspendiert und in 200 µl Fraktionen aliquotiert. Die elektrokompetenten Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei – 70°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die elektrokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. In eine sterile, vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) (Biorad) wurden 40 µl Zellen und 2 µl Ligationsansatz gegeben. Alternativ wurde der gesamte Ligationsansatz mit Ethanol gefällt, zur Reduktion des Salzgehaltes mehrmals mit 70% Ethanol gewaschen, das Pellet dann in 5 µl H₂O aufgenommen und zu den elektrokompetenten Zellen gegeben. Der Stromimpuls erfolgte durch Entladung einer Spannung von 2,5 kV bei 25 µF und 200 Ω. Vor dem Ausplattieren auf einer Selektionsplatte mit Ampicillin oder Kanamycin wurden die Zellen 30 – 60 min in 1 ml SOC-Medium bei 37°C inkubiert.

2.2.4.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch das Service-Labor des ZMMK (Zentrum für molekulare Medizin Köln) auf einem ABI Prism 377 DNA Sequencer der Firma Applied Biosystems mit der Taq FS *BigDye-terminator cycle sequencing* Methode. Neben speziellen

Sequenzierprimern für die jeweiligen Vektoren wurden sequenzspezifische Oligonukleotide verwendet.

2.2.4.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der DNA-Präparationen wurden photometrisch durch Messung der Absorption (OD) bei der Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ in Quarzküvetten bestimmt. Mit Hilfe des Quotienten aus OD_{260}/OD_{280} wurde die Reinheit der DNA überprüft.

2.2.5 „Yeast Two Hybrid“-System

In der vorliegenden Arbeit wurde das ProQuest™ „Yeast Two Hybrid“-System (YTH) der Firma Invitrogen eingesetzt. Das System beruht auf der Rekonstitution des *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktors GAL4. Die Präparation der cDNA-Bibliotheken erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.5.1 Transformation von pDBLeu-Vektoren in *S. cerevisiae*

pDBLeu Konstrukte wurden nach der Lithiumacetatmethode von Gietz und Woods in den *S. cerevisiae* Stamm KF1 transformiert (Gietz und Woods, 2002). SC-Kulturplatten ohne Leucin wurden zur Selektion benutzt.

2.2.5.2 Nachweis der Expression von GAL4-BD-Fusionsproteinen in *S. cerevisiae*

Die Expression der im YTH eingesetzten GAL4-BD-Fusionproteine in *S. cerevisiae* wurde überprüft. Dazu wurden 5 ml einer ÜN-Kultur von *S. cerevisiae* Zellen, die entsprechende pDBLeu-Plasmid enthielten, abzentrifugiert, in 500 μl TNN-Lysepuffer resuspendiert und mit Säure-gewaschenen Glasperlen versetzt (\varnothing 0,4 – 0,5 mm, Sigma). Für den Aufschluss der Zellen wurde diese 5 min bei maximaler Geschwindigkeit im Vibrax (IKA-Vibrax-VXT, Janke und Kunkel) geschüttelt. Das Zellysate wurde dann von den Glasperlen separiert, abzentrifugiert (15.000 x g, 20 min, 4°C), und 100 μg in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde im Anschluss geblottet (vgl. 2.8.3.3.3). Der Nachweis der GAL-BD-Fusionsproteine erfolgte mit einem polyklonalen Anti-GAL4-BD Antikörper (Abb. 7).

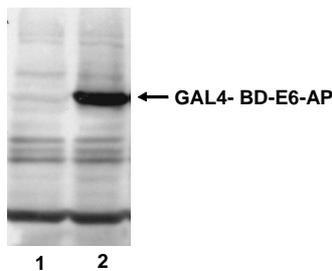


Abb. 7: Nachweis der Expression von GAL4-BD-E6-AP in *S. cerevisiae*. 100 µg Lysat von *S. cerevisiae*-Zellen, die das leere pDBLeu-Plasmid (Kontrolle) (1) bzw. pDBLeu-E6-AP (2) enthielten, wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt. Im angeschlossenen Westernblot wurde der polyklonale anti-GAL4-BD-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

2.2.5.3 Transformation von cDNA-Banken in *S. cerevisiae*

Die Transformation der cDNA-Banken erfolgte nach dem Protokoll von Gietz und Woods nach der Lithiumacetatmethode (Gietz und Woods, 2002). Der das entsprechende pDBLeu-Plasmid enthaltende Hefestamm wurde in 50 ml SD-Medium ohne Leucin angeimpft und über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden $2,5 \times 10^8$ Zellen in 150 ml YPDA überimpft und die Kultur inkubiert, bis ein Zelltitert von 2×10^7 Zellen/ml erreicht worden war (3 – 4 h). Die Zellen wurden dann abzentrifugiert ($3.000 \times g$, 5 min, RT), das Pellet mit 75 ml sterilem Wasser gewaschen, in 6 ml 100 mM Lithiumacetat (pH 8 – 9) resuspendiert und 15 min bei 30°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand komplett verworfen. Für die Transformationsmischung wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge und den angegebenen Mengen zusammengegeben: 7,2 ml 50 % PEG 3350 (Roth), 1,08 ml 1 M Lithiumacetat; 1,5 ml einzelsträngige DNA (Herringssperma- oder Kalbsthymus-DNA 2 mg/ml, Sigma), 0,35 ml der entsprechenden cDNA-Bibliothek (0,5 µg/µl) und 0,67 ml H₂O. Die Transformationsmischung wurde 1 min gevortext, zum Zellpellet gegeben und erneut anhaltend bis zur Resuspension des Pellets gevortext. Die Zellen wurden anschließend 30 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 40 min bei 42°C. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert, mit H₂O gewaschen und in 4 ml H₂O aufgenommen. Je 100 µl der transformierten Hefen wurden auf 10 cm SC-Minimalkulturplatten ohne Leucin, ohne Tryptophan, ohne Adenin bzw. auf SD-Platten ohne Leucin, ohne Tryptophan, ohne Histidin mit 10 mM 3-AT ausgestrichen. Positive Klone wurden auf ihr Wachstum auf unterschiedlichen Selektionsplatten überprüft, um die Stärke der Interaktion zu bestimmen.

2.2.5.4 Bestimmung der Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz bestimmen zu können, wurden die im Rahmen des YTH transformierten Hefen in unterschiedlichen Verdünnungen (1:100, 1:1.000, 1:10.000) auf Selektionsplatten ohne Leucin und ohne Tryptophan ausgestrichen. Nach drei Tagen wurden

die Klone (cfu „colony forming units) auf den verschiedenen Platten gezählt und die Transformationseffizienz nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Cfu x Resuspensionsvolumen}}{\text{Ausplattiertes Volumen x Verdünnungsfaktor x eingesetzte Plasmidmenge}}$$

2.2.5.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Um die cDNA-Bibliothekplasmide (pPC86) der positiven Klone zu isolieren, wurden 3 ml ÜN-Kulturen in SC-Minimalmedium ohne Tryptophan angelegt. 1,5 ml der Kultur wurden abzentrifugiert, in 200 µl STET-Puffer resuspendiert mit 0,2 g Glasperlen (Ø 0,4 – 0,5 mm, Sigma) versetzt und die Zellen im Vibrax aufgeschlossen (5 min max. Geschwindigkeit). Nach erneuter Zugabe von 200 µl STET-Puffer wurden die aufgebrochenen Zellen 5 min auf 100°C erhitzt und dann abzentrifugiert (13.000 x g, 10 min, 4°C). 350 µl des Überstandes wurden mit 175 µl 7,5 M Ammoniumacetat versetzt, 1 h bei – 20°C inkubiert und dann abzentrifugiert (13.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das doppelte Volumen an eiskaltem Ethanol zugeben und die Plasmid-DNA 30 min bei – 20°C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 x g, 20 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. 5 µl dieser Plasmid-DNA-Lösung wurden durch Elektroporation (vgl. 2.2.4.6) in Bakterien (DH5α) transformiert. Selektiert wurde auf LB-Kulturplatten mit Ampicillin (pPC86). Die Plasmid-DNA der verschiedene cDNA-Sequenzen tragenden pPC86-Vektoren wurde in Minipräparationen isoliert.

2.2.5.6 Retransformation von pPC86-Plasmide in *S. cerevisiae*

Die Retransformation der pPC86-Plasmide erfolgte mit gefrierkompetenten Hefezellen nach der Methode von R. J. Dohmen (Dohmen *et al.* 1991). Kontrolltransformationen wurden mit *S. cerevisiae*-Zellen durchgeführt, die nur den leeren pDBLeu-Vektor enthielten und damit kein GAL4-DNA-BD-Fusionsprotein exprimierten. Als positiv wurden retransformierte Klone gewertet, die abhängig vom exprimierten GAL4-DNA-BD-Fusionprotein zumindest Histidin synthetisierten.

2.2.6 Proteinexpression

2.2.6.1 Proteinsynthese in RRL (Kaninchen-Retikulozytenlysat)

Die *in vitro*-Proteinsynthese in RRL wurde mit dem RRL-System TnT™ (Promega) für 1 – 2 h bei 30°C gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.6.2 Expression in *E. coli*

Die Expression von GST (Glutathion S-Transferase)-Fusionsproteinen (pGEX-Vektoren) mit Ausnahme von GST-E6-AP (vgl. 2.2.5.3) erfolgte in *E. coli* DH5 α , während die Expression von Proteinen im pET-System in *E. coli* BL21 durchgeführt wurde. Zur Proteinexpression wurde LB-Medium 1:10 (DH5 α) bzw. 1:25 (BL21) mit einer ÜN-Kultur angeimpft und im Schüttler bei 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 wurden die Kulturen mit 0,15 mM (pGEX) oder 0,4 mM IPTG (Isopropyl-thio- β -D-galacto-pyranosid) (pET) induziert und für weitere 3 h geschüttelt. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert, in Triton-X100/PBS (1 % Triton-X 100) resuspendiert, durch Ultraschallbehandlung (Sonifier W-250 Branson, 3 x 17 Pulse) aufgebrochen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt eingesetzt oder wie unter 2.2.7 beschrieben aufgereinigt.

2.2.6.3 Expression in *S. pombe*

GST-E6-AP (pRepL20GST) wurde in *S. pombe* exprimiert. Dazu wurden frisch ausgestrichene, GST-E6-AP exprimierende *S. pombe*-Zellen von der Kulturplatte in 25 ml Thiamin-haltiges EMM₂ angeimpft und 24 h im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (1.600 x g, 5 min), zweimal mit 50 ml H₂O und dann zweimal mit 50 ml Thiamin-freiem EMM₂ gewaschen. Die Expression erfolgte in 500 ml Thiamin-freiem EMM₂ bei 30°C. Die Zelldichte wurde zu Beginn der Expression auf 2 x 10⁵/ml eingestellt. (Eine OD₅₉₅ von 1 entspricht 2 x 10⁷ Zellen/ml.) Bei einer OD₅₉₅ von 0,5 – 0,8 wurden die Zellen abzentrifugiert, in 5 ml kaltem TNN-Lysepuffer mit zusätzlichen Proteaseinhibitoren (je 10 μ g/ml Pepstatin A, Chymostatin, Sojabohnen-Trypsininhibitor) resuspendiert und mit Säure-gewaschenen Glasperlen (\varnothing 0,4 – 0,5 mm, Sigma) versetzt. Die Zellsuspension wurde dann im Eppendorfgefäß an einem Drahtgitter entlang gezogen. Nach Ablauf von 2 min erfolgte eine 1-minütige Inkubation auf Eis. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis ca. 80 % der *S. pombe* Zellen aufgebrochen waren. Zur Überprüfung des erfolgreichen Aufschlusses wurden 1 – 2 μ l der Zellsuspension mit 10 μ l 1 % SDS-Lösung auf einen Objektträger

gegeben. Bei der Betrachtung durch das Mikroskop erscheinen aufgebrochene Zellen im Gegensatz zu intakten, hellen Zellen schwarz. Die aufgeschlossenen Zellen wurden von den Glasperlen getrennt, zentrifugiert (10.000 x g, 20 min, 4°C), und der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen. GST-E6-AP wurde aus dem Überstand, wie in 2.2.7.1 beschrieben, aufgereinigt.

2.2.6.4 Expression in Insektenzellen

Zur Expression von Proteinen im Baculovirus-System wurden High Five™-Zellen verwendet (vgl. 2.1.3.4). Dazu wurden auf zehn 10 cm-Kulturschalen je ca. 10⁶ Zellen ausgesät und nach einem Mediumwechsel mit 200 µl einer Stocklösung des entsprechenden Virus pro Platte infiziert (Virus-Titer: ca. 10⁸ Partikel/ml). Danach wurden die infizierten Zellen 48 h bei 27°C inkubiert. Zur Lyse wurden die Zellen im Medium von der Platte gespült, abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in TNN-Lysepuffer mit 10 mM β-Glycerophosphat (β-GP) (200 µl/Platte) für 60 min bei 4°C lysiert. Nach Abzentrifugation (15 000 x g, 30 min, 4°C) des Lysats wurde der Überstand abgenommen. Aus dem Überstand wurde über Anionenaustausch-Chromatographie das überexprimierte Protein aufgereinigt (vgl. 2.2.7).

2.2.7 Aufreinigung von Proteinen

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden entweder direkt als nicht aufgereinigte Gesamtzellextrakte eingesetzt, oder es erfolgte eine Aufreinigung des gewünschten Proteins. GST-Fusionsproteine bzw. His-Fusionsproteine wurden durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia, Freiburg) bzw. Ni-NTA™-Agarose (Qiagen) aufgereinigt. Zudem wurde die Anionenaustausch-Chromatographie eingesetzt.

2.2.7.1 Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Trägermaterial Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) wurde zunächst auf die Pufferbedingungen des Bakterien- bzw. *S. pombe*-Extraktes eingestellt. Dann erfolgte die Anbindung des präparierten Extraktes (vgl. 2.2.6) an die Sepharose durch Inkubation bei 4°C für 30 – 60 min auf einem Rotationsschüttler. Danach wurde viermal mit je 1 ml 1 % Triton-X 100/PBS (Bakterien) bzw. TNN-Lysepuffer mit zusätzlichen Proteaseinhibitoren (*S. pombe*) gewaschen. Zur Elution des gewünschten Proteins wurde die Sepharose für 5 min in

Gegenwart einer Glutathionlösung (10 mM reduziertes Glutathion (Roche) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) inkubiert.

2.2.7.2 Affinitätsreinigung von His-Fusionsproteinen

Ni-NTA™-Agarose (Qiagen) wurde in 1 % Triton-X 100/PBS äquilibriert und zum präparierten bakteriellen Extrakt gegeben. Die Anbindung erfolgte bei 4°C für 30 min im Rotationsschüttler. Die mit Fusionprotein beladene Agarose wurde dann viermal mit 20 mM Imidazol/1 % Triton-X 100/PBS gewaschen. Zur Elution des überexprimierten His-markierten Proteins wurde die Agarose 5 min mit 200 mM EDTA-Lösung inkubiert.

2.2.7.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Zur Anionenaustausch-Chromatographie wurde als Säulenmaterial Q Sepharose® Fast Flow von Pharmacia verwendet. Zur Vorbereitung der Säule wurde die entsprechende Menge Q Sepharose® (Säulenvolumen 1 ml bei 10 Platten) zunächst mit 10 Säulenvolumina (SV) 25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 400 mM NaCl (T₂₅N₄₀₀) und im Anschluss mit 10 SV 25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 125 mM NaCl (T₂₅N₁₂₅), 1 mM DTT, 1 µg/ml Aprotinin/Leupeptin (A/L), 5 mM β-Glycerophosphat (β-GP) gewaschen. Dann wurde zum Anbinden des aufzureinigenden Proteins der Gesamtzellextrakt (Präparation siehe 2.2.6.4), auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 SV T₂₅N₁₂₅/1 mM DTT/1 µg/ml A/L/5 mM β-GP gewaschen. Bei der Präparation von E6-AP erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 10 SV T₂₅N₃₀₀/1 mM DTT/1 µg/ml A/L/5 mM β-GP. Die Proteine wurden dann schrittweise mit T₂₅N₃₀₀ (E1 und Rsp5) bzw. T₂₅N₄₀₀ (E6-AP) mit jeweils 1 mM DTT/1 µg/ml A/L/5 mM β-GP/1 mM PefaBloc eluiert. Zur Ermittlung der Fraktionen mit höchstem Proteingehalt wurde ein "Dot-Test" durchgeführt. Dazu wurden je Fraktion 2 µl auf 3MM Whatman-Papier aufgetragen, getrocknet und mit Coomassie Blau gefärbt.

2.2.8 Analyse von Proteinen

2.2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein-Assays bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Wasser/Bradford-Reagenz als Leerwert. Anhand einer

mit BSA aufgestellten Eichgeraden konnte aus den so erhaltenen Werten die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Je nach molarer Masse der aufzutrennenden Proteine wurde die Prozentigkeit des Trenngels (370 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS) gewählt (8 – 14 %). Das Sammelgel (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS) war immer 5 % ig. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in Laemmli-Stopp-Puffer für 5 – 10 min aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Puffer bei konstanten 44 mA für 200 min; die Spannung wurde dabei auf 250 V begrenzt. Die Proteine wurden dann wie unter 2.2.8.3 beschrieben sichtbar gemacht.

2.2.8.3 Detektion von Proteinen

2.2.8.3.1 Coomassie Blau-Färbung

Zur Anfärbung der Proteine mit Coomassie Brilliant Blue (Serva, Heidelberg) wurden die SDS-Gele nach der PAGE in einer 0,2 %igen Coomassie Blau-Lösung in 40 % Methanol, 10 % Essigsäure für 1 – 2 h geschwenkt. Danach wurden die Gele bis zur gewünschten Färbung der Proteinbanden in Entfärberlösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert.

2.2.8.3.2 Fluorographie

Zur Detektion von [³⁵S]-markierten Proteinen wurden die entsprechenden SDS-Gele 30 min in Fixierlösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) geschwenkt. Danach wurden sie 15 min in Amplify (Amersham) getränkt und dann bei 80°C für 2 h unter Vakuum getrocknet und fluorographiert (Kodak X-OMAT AR Röntgenfilme in Kodak X-Omatic-Filmcassetten). Nach 3 – 72-stündiger Exposition bei – 80°C wurden die Filme entwickelt.

2.2.8.3.3 Western-Blot/ECL

Das Blotting auf PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) erfolgte bei 40 V für 150 min bei 4°C in Transferpuffer in einer Kammer von Biorad. Die folgenden Schritte wurden jeweils bei RT auf einem Schwenker durchgeführt. Die Membran wurde 1 h in TNE-T mit 5 % Magermilchpulver zum Blockieren unpezifischer Bindungen inkubiert. Dann wurde mit TNE-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 1 – 1,5 h in TNE-T. Nach

einem weiteren Waschvorgang wurde die Membran dann mit dem Sekundärantikörper in TNE-T 1 h inkubiert. Nach einer weiteren Waschprozedur wurde schließlich eine ECL (“enhanced chemiluminescence“)-Reaktion (Amersham) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.9 GST-Kopräzipitationsassay

Um Proteininteraktionen *in vitro* nachweisen zu können, wurden GST-Kopräzipitationsassays durchgeführt. Hierzu wurde eines der zu untersuchenden Proteine in *E. coli* bzw. *S. pombe* als GST-Fusionsprotein exprimiert und über Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose gebunden und aufgereinigt (vgl. 2.2.6 und 2.2.7.1). 5 – 15 µl der mit GST-Fusionprotein beladenen GSH-Sepharose wurden mit 10 µl [³⁵S]-markiertem *in vitro* Translatat des möglichen Bindungspartners zusammengegeben und der Ansatz auf ein Volumen von 200 µl mit einer Mischung von TNN-Lysepuffer und T₂₅N₅₀ im Verhältnis 1:3 aufgefüllt. Die Ansätze wurden für 3 – 4 h im Rotationsschüttler bei 4°C inkubiert, dann abzentrifugiert und das Präzipitat 3 – 4 mal mit TNN-Lysepuffer gewaschen. Nach Zugabe von 2 x Laemml-Stopp-Puffer wurden die Proben aufgeköcht und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurden 2 µl *in vitro* Translatat aufgetragen. Der radioaktiv markierte Bindungspartner wurde durch Fluorographie sichtbar gemacht.

Für den Nachweis der Bindung von ubiquitinierten Proteinen an GST-Fusionproteine wurden zunächst Ubiquitinierungsreaktionen durchgeführt (dreifacher Ansatz) und nach Ablauf durch Zugabe von EDTA (20 mM Endkonzentration) abgestoppt. Die Ansätze wurden auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt und das auf seine Bindung an ubiquitinierte Proteine zu testende GST-Fusionprotein, gebunden an GSH-Sepharose, zugegeben und wie oben beschrieben weiter verfahren. Als Kontrollen wurden ein einfacher Ubiquitinierungsansatz nach Reaktionsablauf direkt auf die SDS-PAGE aufgetragen sowie Bindungsversuche mit dem nicht ubiquitinierten Protein durchgeführt.

2.2.10 *In vitro*-Ubiquitinierungsassays

In einem Reaktionsvolumen von 40 µl wurden 1 – 3 µl des *in vitro* translatierten [³⁵S]-markierten Ubiquitinierungssubstrats in Gegenwart von 8 µg nativem Ubiquitin, 50 ng bakteriell oder in Insektenzellen exprimiertem E1 (vgl. 2.2.6), 50 ng bakteriell exprimiertem UbcH7 und UbcH5 (vgl. 2.2.6) und 0,1 – 0,5 µg in Insektenzellen exprimiertem E6-AP bzw. Rsp5 (vgl. 2.2.6.4) inkubiert. Außerdem enthielt der Ansatz 25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100

mM NaCl, 4 mM DTT, 2 mM ATP (Roche) und 4 mM MgCl₂. Die HPV16-E6/E6-AP abhängige Ubiquitinierung von p53 erfolgte in zusätzlicher Anwesenheit von 0,1 – 0,5 µg GST-HPV16-E6. Nach zweistündiger Inkubation bei 25°C wurden die Ansätze mit 2 x Laemmli-Stopp-Puffer versetzt, für 5 – 10 min aufgekocht und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Schließlich erfolgte eine Fluorographie, um das radioaktiv markierte Protein sichtbar zu machen. Reaktionen mit GST-Fusionsproteinen als Ubiquitinierungssubstrat wurden analog durchgeführt. Dabei wurden ca. 0,5 – 1 µg des GST-Fusionsproteins eingesetzt und die Mengen an eingesetztem Ubiquitin auf 16 µg und ATP auf 4 mM erhöht.

Für die Hdm2-abhängigen Ubiquitinierungen wurde der beschriebene Ubiquitinierungsassay leicht variiert. Die Ubiquitinierungsassays enthielten ausschließlich bakteriell exprimiertes UbcH5 als E2, statt E6-AP wurden 0,5 – 1 µg bakteriell exprimiertes GST-Hdm2 als E3 eingesetzt. Die Inkubation der Ubiquitinierungsansätze erfolgte 2 h bei 30°C.

2.2.11 *In vitro*-Degradationsassay

Für den proteasomalen Abbau von Proteinen *in vitro* wurde Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL = rabbit reticulocyte lysate) als Proteasomquelle eingesetzt. Ubiquitinierungsreaktionen wurden wie beschrieben (vgl. 2.2.10) durchgeführt. Die Ubiquitinierungsreaktionen wurden nach Ablauf durch die Zugabe von EDTA (Endkonzentration 20 mM) abgestoppt, die ATP-Konzentration auf 4 mM eingestellt und 5 µl frisches RRL zugeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 30°C. Anschließend wurden die Ansätze mit 2 x Laemmli Stopp-Puffer versetzt, 5 – 10 min aufgekocht und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch Fluorographie sichtbar gemacht.

2.2.12 *In vitro*-Deubiquitinierungssassay

Die Expression von *S. cerevisiae* UBPI erfolgte im pET System in *E. coli* BL21 (vgl. 2.2.6.2). Es wurde eine 2 ml Expressionskultur aufgearbeitet. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl 25 % Sucrose/50 mM Tris, pH 8,0, resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozym (10 mg/ml, Serva) und intensivem Schütteln folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurden 10 µl 50 mM EDTA zugefügt, und es wurde erneut 5 min auf Eis inkubiert, bevor 100 µl Tris, pH 8,0/1,7 mM DTT-Lösung zugegeben, gevortext und dann 1 µl 10 % Triton X-100 zugeben wurde. Die Lösung wurde

mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend bei 15.000 x g 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der UBP1-haltige Überstand wurde in den Deubiquitinierungsreaktionen eingesetzt.

Ubiquitinierungsreaktionen (vgl. 2.2.10) wurden nach 1 h durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 20 mM) abgestoppt, und es wurden 10 µl des UBP1-haltigen Überstandes (vgl. 2.2.11) hinzugefügt. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 1 h. Danach wurden die Proben mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt, aufgeköcht, in der SDS-PAGE aufgetrennt, und die radioaktiv-markierten Proteine wurden durch Fluorographie sichtbar gemacht.

2.2.13 Transfektion von DNA in Säugetierzellen mittels Lipofektion

Für transiente Transfektionen wurden H1299-Zellen (p53 Null) in 6 cm-Kulturschalen ausgesät und bei einer erreichten Konfluenz von ca. 70 % gemäß Herstellerangaben mit dem liposomalen Transfektionsreagenz DOTAP (Roche) transfiziert. Die Transfektionsansätze enthielten bei einer maximalen Gesamtmenge von 2 µg DNA pro Schale stets 200 ng β -Galactosidase-Expressionsplasmid. Für *in vivo*-Abbauassays von p53 wurden jeweils 25 ng pRc/CMV p53 transfiziert. Für den Abbau von p53 durch Mdm2 wurden 200 ng pCOC-Mdm2-Expressionsplasmid, zur Analyse der p53-Degradation durch HPV E6 250 bzw. 500 ng (HPV16-E6) kotransfiziert. Für die Degradation von CLIM2 durch RLIM wurden 200 ng pCDNA myc-CLIM2 und 800 ng pCDNA HA-RLIM2 transfiziert. Zur Untersuchung des Einflusses von HHR23A auf den Abbau von p53 und CLIM2 *in vivo* wurden 350 ng – 1.400 ng pCDNA-HA-HHR23A kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 100 µl TNN-Lysepuffer geschabt und 30 min auf Eis lysiert. Danach wurde 30 min bei 4°C und 16.000 x g abzentrifugiert und der Überstand gewonnen.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden je 10 µl des Lysates in Doppelbestimmungen für den sogenannten β -Gal-Assay eingesetzt, der die β -Galactosidase-Aktivität im Zellysat ermittelt. Auf Eis wurden in einer 96-Loch-Mikrotiter-Platte jeweils 120 µl Puffer Z vorgelegt. Dazu wurden 20 µl Lysat und 5 µl ONPG (4 mg/ml Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid in 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,0) gemischt und lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Bei ausreichender Gelbfärbung wurde bei 410 nm in einem ELISA-Reader die Absorption bestimmt. Als Nullwert diente das Lysat von nicht transfizierten Zellen.

2.2.14 Immunpräzipitation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich in H1299-Zellen überexprimierte Proteine immunpräzipitiert. Dazu wurden zunächst die zu präzipitierenden Proteine transient in H1299-Zellen transfiziert (vgl. 2.2.12). 24 h Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit TNN-Lysepuffer lysiert. Das Zellysat wurde auf ein Volumen von 200 µl mit einer Mischung aus TNN-Lysepuffer und T₂₅N₅₀ (1:4) aufgefüllt und nach Zugabe von 40 µl Protein A-Sepharose CL4B (Pharmacia) 1 h bei 4°C im Rotationsschüttler inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde durch Zentrifugation präzipitiert. Nach Überführung des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß wurde der entsprechende Antikörper (1 µg anti-FLAG, 1 µg anti-HA oder 4 µl polyklonales HERC2-Serum) zugegeben und 1 h bei 4°C im Rotationsschüttler inkubiert. Dann wurden 40 µl Protein A-Sepharose zugefügt. IgG-Antikörper binden an Protein A-Sepharose. Nach einer weiteren Inkubation von 4 h wurden die Ansätze abzentrifugiert und das Präzipitat viermal mit TNN-Lysepuffer gewaschen, bevor sie mit 2 x Laemmli-Stopp-Puffer versetzt, aufgeköcht und in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Im Anschluss erfolgte ein Westernblot (vgl. 2.2.8.3.3) zum Nachweis der präzipitierten Proteine. Bei Koimmunpräzipitationen zum Nachweis der Interaktion zweier Proteine *in vivo* wurden beide Proteine transient kotransfiziert. Ein Bindungspartner wurde immunpräzipitiert, der andere im angeschlossenen Westernblot nachgewiesen.

2.2.15 Herstellung [³⁵S]-markierter Zellysate

Zur radioaktiven *in vivo*-Markierung wurden die jeweiligen Zellen auf 10 cm-Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit vorgewärmtem PBS wurde Methionin-freies DMEM (SIGMA) zugesetzt und die Zellen 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch Methionin-freies DMEM mit 100 µCi ³⁵S-Methionin (L-(³⁵S)-Methionin/Cystein-Mix, Amersham, 10 mCi/ml, 1000 mCi/mmol) ersetzt und die Zellen 3 h bei 37°C metabolisch markiert, wobei die Platten alle 15 min kurz geschwenkt wurden. Danach wurden die Zellen mit TNN-Lysepuffer aufgeschlossen. Im Anschluss wurden die Zellysate über Anionenaustausch-Chromatographie fraktioniert (Scheffner *et al.*, 1993).

2.2.16 Herstellung polyklonaler Seren gegen HERC2

Die Synthese eines als Antigen verwendbaren HERC2-Peptids sowie die Herstellung polyklonaler Seren gegen HERC2 erfolgte durch die Firma Eurogentec. Dabei wurde ein HERC2-Peptid, das im murinen HERC2 den Aminosäuren 3593-3606 und im humanen HERC2 den Aminosäuren 3593-3608 entspricht, zur Immunisierung gegeben und folgendes Schema zur Immunisierung gewählt.

Tag 0: Entnahme des Präimmunserums, 1. Immunisierung

Tag 14: 2. Immunisierung

Tag 28: 3. Immunisierung

Tag 56: 4. Immunisierung

Tag 80: Gewinnung des gesamten Blutserums

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von Interaktionspartnern von E6-AP im YTH

3.1.1 YTH mit E6-AP

Zur Identifizierung von Bindungspartnern und potentiellen Substraten von E6-AP wurden das „Yeast Two Hybrid“-System (YTH) sowie zwei unterschiedliche biochemische Ansätze (vgl. 3.5) eingesetzt. Das YTH-System ermöglicht den Nachweis von Proteininteraktionen *in vivo* durch eine interaktionsabhängige Aktivierung von Reportergenen in Zellen der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Fields und Song, 1989). Zu diesem Zweck wird ein potentieller Bindungspartner als Fusionsprotein mit einer DNA-Bindedomäne und der andere als Fusionsprotein mit einer transaktivierenden Domäne in Hefezellen exprimiert. Interagieren in *S. cerevisiae* beide Proteine miteinander, bilden sie durch die räumliche Annäherung von DNA-Binde- und Transaktivierungsdomäne einen funktionellen Transkriptionsfaktor. Dieser kann die Expression von Reportergenen, die spezifische Bindestellen für die verwendete DNA-Bindedomäne in ihrem Promotor tragen, bewirken. Mithilfe dieser Methode ist es auch möglich, gezielt nach Interaktionspartnern eines Proteins zu suchen. Dafür sind cDNA-Bibliotheken oder -Banken notwendig, die cDNA-Sequenzen eines Großteils der in bestimmten Zellen oder Geweben exprimierten Proteine enthalten. Das in dieser Arbeit eingesetzte YTH-System basiert auf der Rekonstitution des Hefetranskriptionsfaktors GAL4.

Nach Klonierung von katalytisch aktivem E6-AP in den GAL4-Bindedomänen (BD)-Vektor wurde dieser in den *S. cerevisiae*-Stamm KF1 (Butz *et al.*, 2000) transformiert, der die drei GAL4-abhängigen Gene *GAL1-HIS3*, *GAL2-ADE2* und *SPO13-URA* trägt. Dabei ist das *GAL1-HIS3*-Gen der schwächste und das *SPO13-URA3*-Gen im Vergleich der stärkste Selektionsmarker. Für die Ablesung des *GAL2-ADE2*-Gens ist eine mittelstarke Interaktion der Bindungspartner notwendig (James *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1996; Butz *et al.* 2000). Die Expression des GAL4-BD-E6-AP-Fusionsproteins in der Hefe wurde mithilfe eines Westernblots durch den Nachweis der GAL4-BD überprüft (vgl. Abb. 7). Es wurden YTHs mit drei unterschiedlichen GAL4-Aktivierungsdomänen (AD)-cDNA-Banken durchgeführt, um ein breites Spektrum verschiedener Proteine auf ihre Interaktion mit E6-AP zu überprüfen. Dabei wurden (i) eine humane Skelettmuskel-cDNA-Bibliothek aufgrund einer im Northern Blot nachgewiesenen starken Expression von E6-AP im Skelettmuskel (Schwarz *et al.*, 1998), (ii) eine cDNA-Bank aus humanem fötalen Gehirn (die fehlende Expression von E6-AP in bestimmten Gehirnzellen führt zum Angelman-Syndrom (vgl. 1.8.3)) und (iii) eine

cDNA-Bibliothek aus aktivierten humanen T-Zellen eingesetzt. Die T-Zell-cDNA-Bibliothek war schon vorher erfolgreich für die Isolierung von E6-AP-interagierenden Proteinen benutzt worden (Kumar *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 1999). Für die primäre Selektion der Klone wurde das für Wachstum auf adeninfreien Kulturplatten notwendige *GAL2-ADE2*-Gen als chromosomales Reporter-gen gewählt. Die GAL4-aktivierbaren Gene *GAL1-HIS3* und *SPO13-URA3* erlauben das Wachstum auf histidinfreien bzw. uracilfreien Kulturplatten. Als positiv wurden Klone gewertet, in denen auch nach Retransformation, ablesbar am Wachstum auf histidinfreien Selektionsplatten, GAL4-BD-E6-AP-abhängig zumindest das *GAL1-HIS3*-Gen transkribiert wurde. Die in die GAL4-AD-Vektoren eingebrachten cDNA-Sequenzen der positiv getesteten Klone wurden sequenziert, und es wurde mithilfe von Datenbankrecherchen ermittelt, für welche Proteine diese cDNA-Sequenzen kodieren.

3.1.2 Interaktionspartner von E6-AP im YTH

Die Ergebnisse der drei verschiedenen YTH-Ansätze mit E6-AP sind in Tabelle 10 dargestellt. Ungefähr $8,3 \times 10^6$ cDNAs der humanen Bibliothek aus Skelettmuskel, die vom Hersteller mit 5×10^6 unabhängigen Klonen angegeben wird, wurden getestet. Um sicherzustellen, dass mit hinreichender Wahrscheinlichkeit alle 5×10^6 enthaltenen Klone überprüft werden, muss mindestens die dreifache Anzahl der angegebenen unabhängigen Klone „gescreent“ werden. Mit $8,3 \times 10^6$ überprüften Klonen wurde die cDNA-Bibliothek also nicht komplett abgedeckt. Trotzdem konnten mehr als 1.000 Klone auf Kulturplatten ohne Adenin primär selektiert werden. Davon wurden nur 100 Klone weiterbearbeitet, die alle cDNA-Sequenzen enthielten, die für die schwere Kette IIa von Myosin („myosin heavy chain IIa“ = MyHCIIa) kodieren. Es handelt sich dabei um eine von drei Isoformen der humanen schweren Myosinkette im Skelettmuskel von Erwachsenen (Schiaffino und Reggiani, 1994). Die zwei schweren und zwei leichten Ketten dieses Myosins bilden zusammen mit Aktinfilamenten die für die Muskelkontraktion wichtige Myofibrille. Gemeinsam war allen analysierten cDNAs ein Bereich (AS 1572-1730) im letzten Drittel der „coiled coil“ oder Schwanz-Domäne von MyHCIIa, die die Assoziation der schweren Ketten vermittelt. Damit ist MyHCIIa möglicherweise ein physiologisch relevanter Interaktionspartner von E6-AP im Skelettmuskel.

cDNA-Bank ¹	Interaktionspartner	Anzahl positiver Klone	Interaktionsbereich ²	Aktivierter Selektionsmarker		
				<i>HIS3</i>	<i>ADE2</i>	<i>SPO13-URA</i>
Skelettmuskel 8,3 x 10 ⁶ (5 x 10 ⁶)	MyHCIIa	100 [#]	1572-1730 (1941)	+	+	(+) ^{##}
Fötale Gehirn 16,1 x 10 ⁶ (5 x 10 ⁶)	CHAP1	3	1-624 (624)	+	+	+
Aktivierte T-Zellen 9,1 x 10 ⁶ (2,4 x 10 ⁶)	CHAP1	10	1-624 (624)	+	+	+

Tabelle 10: Isolierte Interaktionspartner von E6-AP im YTH. Es wurden die angegebenen cDNA-Banken eingesetzt. Primärer Selektionsmarker war *GAL2-ADE2*. ¹ Die Zahlen bezeichnen die Anzahl der getesteten Klone. In Klammern ist die vom Hersteller angegebene Anzahl repräsentativer Klone der cDNA-Banken vermerkt. ² Die Zahlen geben den Bereich des Proteins an, mit dem E6-AP interagiert (überlappender Bereich in allen isolierten Klonen). In Klammern ist die Gesamtlänge des jeweiligen Proteins in Aminosäuren angegeben. [#] Weitere ca. 900 Klone wurden nicht bearbeitet. ^{##} (+) deutet eine nur schwache Aktivierung des Selektionsmarkers an.

Im YTH mit den cDNA-Banken aus humanem fötalen Gehirngewebe und humanen aktivierten T-Zellen, die beide mit hinreichender Wahrscheinlichkeit abgedeckt wurden (vgl. Tabelle 10), konnten ausschließlich Klone isoliert werden, die für das vollständige Ubl/Uba-Protein CHAP1 (vgl. 1.7.2) kodierten. Dies weist auf CHAP1 als einen Interaktionspartner von E6-AP hin, der in verschiedenen Geweben exprimiert wird.

3.1.3 Interaktionspartner von katalytisch inaktivem E6-AP im YTH

Obwohl mit Ausnahme der Skelettmuskel-cDNA-Bank alle cDNA-Bibliotheken mit ausreichender Wahrscheinlichkeit komplett ausgeschöpft wurden (vgl. Tabelle 10), konnten in den YTH-Ansätzen nur zwei potentielle Interaktionspartner von E6-AP isoliert werden. Schon in der Literatur beschriebene YTH-Bindungspartner von E6-AP, wie UbcH8 (Kumar *et al.*, 1997), HHR23A (Kumar *et al.* 1999) und Lck (Oda *et al.*, 1999), wurden trotz des Einsatzes der gleichen cDNA-Bibliothek nicht identifiziert. Die geringe Anzahl verschiedener Klone aus den hier beschriebenen YTH-Ansätzen könnte darauf zurückzuführen sein, dass im Gegensatz zu den publizierten Studien mit katalytisch aktivem E6-AP gearbeitet wurde. Möglicherweise ubiquitiniert katalytisch aktives E6-AP in *S. cerevisiae* potentielle Substrate und markiert sie für den Abbau, so dass ein Interaktionsnachweis im YTH nicht mehr möglich ist. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass der gewählte primäre Selektionsmarker (*GAL2-ADE2*) zu stark war. Aus diesen Gründen wurden die YTH-Ansätze sowohl mit der

fötalen Gehirn- als auch mit der aktivierten T-Zell-cDNA-Bank mit katalytisch inaktivem E6-AP, bei dem das aktive Cystein (C820) der HECT-Domäne durch ein Alanin ersetzt wurde, wiederholt. In diesen Ansätzen wurde das *GAL1-HIS3*-Gen als primäres Reportergergen gewählt, weil für seine Transkription nur eine schwache Interaktion notwendig ist. Die Ergebnisse der beiden YTHs mit katalytisch inaktivem E6-AP sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

cDNA-Bank ¹	Interaktionspartner	Anzahl positiver Klone	Interaktionsbereich ²	Aktivierter Selektionsmarker		
				<i>HIS3</i>	<i>ADE2</i>	<i>SPO13-URA</i>
Fötale Gehirn 17,4 x 10 ⁶ (5 x 10 ⁶)	HERC2	8	2950-3334 (4834)	+	+	+
	CHAP1	3	1-624 (624)	+	+	+
	A1Up	2	1-601 (601)	+	(+) [#]	-
	unbekannt	2		+	-	-
Aktivierte T-Zellen 6,4 x 10 ⁶ (2,4 x 10 ⁶)	CHAP1	10	1-624 (624)	+	+	+
	HHR23A	2	1-363 (363)	+	(+) [#]	-
	unbekannt	2		+	-	-

Tabelle 11: Isolierte Interaktionspartner von katalytisch inaktivem E6-AP im YTH. Es wurde eine cDNA-Bank aus humanem fötalem Gehirn und aus aktivierten T-Zellen eingesetzt. Primärer Selektionsmarker war *GAL1-HIS3*. ¹ Die Zahlen bezeichnen die Anzahl der getesteten Klone sowie in Klammern die Anzahl der Klone der cDNA-Bank insgesamt. ² Die Zahlen geben den Bereich des Proteins in Aminosäuren an, mit dem katalytisch inaktives E6-AP im YTH interagiert. In Klammern ist die Gesamtlänge des jeweiligen Proteins in Aminosäuren angegeben. [#] (+) deutet eine nur schwache Aktivierung des Selektionsmarkers an.

Aus der cDNA-Bibliothek von humanem fötalem Gehirngewebe konnte neben CHAP1 das HECT-Protein HERC2 (vgl. 1.4.1.2) als starker Interaktionspartner von E6-AP isoliert werden. Allen HERC2-positiven Klonen waren cDNA-Sequenzen gemeinsam, die für die zweite RCC1-Domäne (RCC1b) der insgesamt drei RCC1-Domänen von HERC2 kodieren. Dies weist darauf hin, dass HERC2 über seine RCC1b-Domäne mit E6-AP interagiert. Neben CHAP1 konnte mit A1-Up ein weiteres Ubl/Uba-Protein (vgl. 1.7.2) als Bindungspartner von E6-AP identifiziert werden. Außerdem wurden zwei cDNA-Klone gefunden, die für Proteinsequenzen kodieren, die keine Ähnlichkeiten zu schon bekannten Proteinen aufweisen.

Zusätzlich zu CHAP1 wurde mit katalytisch inaktivem E6-AP (und einem schwächeren primären Selektionsmarker) HHR23A aus der aktivierten T-Zell-cDNA-Bank isoliert. Der Nachweis von Klonen, die für HHR23A kodieren, bestätigte die schon in der Literatur beschriebene Interaktion von E6-AP mit HHR23A im YTH (Kumar *et al.*, 1999). Insgesamt wurden damit in den unterschiedlichen Ansätzen drei verschiedene Ubl/Uba-Proteine als Bindungspartner von E6-AP isoliert. Zwei weitere positive Klone aus der T-Zell-cDNA-Bank enthielten Sequenzen, denen keine schon bekannten Proteine zugeordnet werden konnten. Die

Sequenzen waren nicht identisch mit den isolierten Sequenzen aus der humanen fötalen Gehirn-cDNA-Bibliothek, denen ebenfalls keine Proteine zugeordnet werden konnten.

Um zu untersuchen, ob die im YTH mit katalytisch inaktivem E6-AP isolierten Interaktionspartner auch mit katalytisch aktivem E6-AP interagieren können, wurden die entsprechenden GAL4-AD-Vektoren in *S. cerevisiae*-Zellen, die katalytisch aktives E6-AP exprimieren, transformiert. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Aktivierung der verschiedenen Selektionsmarker in Anwesenheit von katalytisch aktivem und inaktivem E6-AP. Die Tatsache, dass mit katalytisch inaktivem E6-AP eine größere Anzahl an Interaktionspartnern im YTH ermittelt werden konnte, ist deshalb vermutlich auf den im Vergleich zum YTH mit aktivem E6-AP benutzten schwächeren primären Selektionsmarker zurückzuführen.

3.2 Ubl/Uba-Proteine als Interaktionspartner von E6-AP

3.2.1 Bindung von HHR23A, CHAP1 und A1Up an E6-AP *in vitro*

Die im YTH beobachteten Interaktionen von E6-AP mit den Ubl/Uba-Proteinen HHR23A, CHAP1 und A1Up wurden *in vitro* in GST-Kopräzipitationsassays (vgl. 2.2.9) überprüft. Es wurde entweder *in vitro* translatiertes [³⁵S]-markiertes HHR23A, CHAP1 oder A1Up mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-E6-AP vier Stunden inkubiert und dann präzipitiert oder umgekehrt *in vitro* translatiertes E6-AP mit den genannten GST-Ubl/Uba-Proteinen. Die Präzipitate wurden gewaschen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, und die kopräzipitierten [³⁵S]-markierten Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht. Unter diesen Bedingungen konnte die schon beschriebene Bindung von HHR23A an E6-AP (Kumar *et al.*, 1999) in beiden Richtungen gezeigt werden (Abb. 8A, B). Die im YTH detektierten Interaktionen zwischen CHAP1 bzw. A1Up und E6-AP konnten *in vitro* nicht bestätigt werden (Abb. 8A, B).

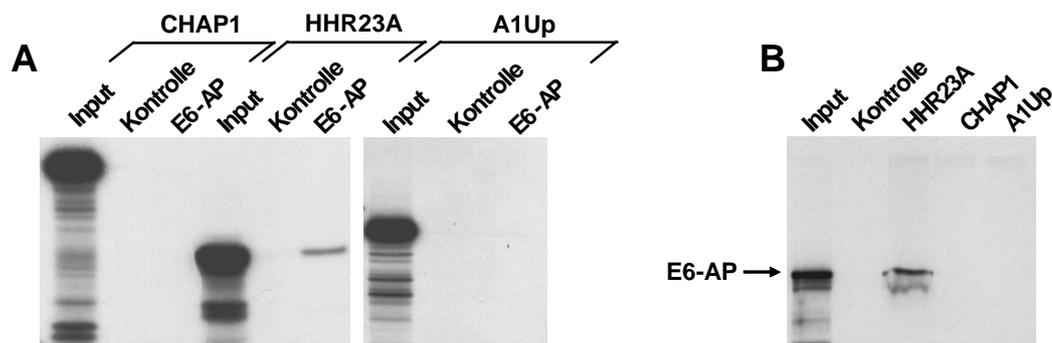


Abb. 8: HHR23A, nicht jedoch CHAP1 und A1Up, binden *in vitro* an E6-AP. (A) GST-E6-AP bzw. GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem HHR23A, CHAP1 bzw. A1Up 4 h inkubiert und mit GSH-Sepharose präzipitiert (vgl. 2.2.9). Die kopräzipitierten, radioaktiv markierten Proteine wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. (B) Die GST-Fusionsproteine HHR23A, CHAP1, A1Up sowie GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem E6-AP inkubiert, präzipitiert und analysiert (8 % SDS-PAGE), wie in (A) beschrieben. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten *in vitro*-Translatats.

3.2.2 Ubiquitinierung von HHR23A, CHAP1 und A1Up *in vitro*

Anschließend wurde getestet, ob es sich bei den drei Ubl/Uba-Proteinen um Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP handelt. Dazu wurden Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem CHAP1, A1Up oder HHR23A in Gegenwart von rekombinantem E1, UbcH5, UbcH7 und E6-AP unter Standardbedingungen durchgeführt (vgl. 2.2.10). Die Ubiquitinierungsreaktionen wurden nach zwei Stunden abgestoppt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt, und die radioaktiv markierten Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die ubiquitinierten Proteine können dabei aufgrund ihres veränderten Molekulargewichts und damit Laufverhaltens von nicht-modifiziertem Protein unterschieden werden. HHR23A, nicht aber CHAP1 oder A1Up, wurden von E6-AP *in vitro* ubiquitiniert (Abb. 9A). Damit stellen CHAP1 und A1Up zumindest *in vitro* vermutlich keine Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP dar.

Die bereits von Kumar *et al.* (1999) beschriebene Ubiquitinierung von HHR23A durch E6-AP konnte bestätigt werden. HHR23A wurde jedoch auch in Abwesenheit von rekombinantem E6-AP ubiquitiniert (Abb. 9A). Um festzustellen, ob das im RRL vorhandene Kaninchen-Homolog von E6-AP (Scheffner *et al.*, 1993) für diese Ubiquitinierung verantwortlich ist, wurden zusätzlich Ubiquitinierungsexperimente mit in Weizenkeimlysat translatiertem HHR23A durchgeführt. Weizenkeimlysat enthält im Gegensatz zu RRL keine E6-AP-Homologe (Scheffner *et al.*, 1993). Auch in diesen Ansätzen kam es zu einer schwachen Ubiquitinierung von HHR23A in Abwesenheit von rekombinantem E6-AP (nicht gezeigt).

Dies zeigt, dass HHR23A zumindest *in vitro* auch E6-AP-unabhängig ubiquitiniert werden kann. Im Anschluss stellte sich die Frage, ob HHR23A allein durch E1 und E2 ubiquitiniert wird oder ob zusätzlich ein E3 notwendig ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde HHR23A als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, und es wurden Ubiquitinierungsassays ausschließlich mit bakteriell exprimierten E1, UbcH5 und UbcH7 durchgeführt. Da Bakterien nicht über ein Ubiquitin-Proteasom-System verfügen (vgl. 1.1), konnten Verunreinigungen in den Ubiquitinierungsansätzen durch E3-Enzyme ausgeschlossen werden. In diesen Versuchen wurde HHR23A in Anwesenheit von E1, UbcH5 und UbcH7 nicht ubiquitiniert (nicht gezeigt). Dies weist daraufhin, dass die Ubiquitinierung von HHR23A E3-abhängig ist. Da HHR23A im Weizenkeimlysat in Abwesenheit von rekombinantem E6-AP ubiquitiniert wurde, können neben E6-AP auch ein oder mehrere pflanzliches E3s HHR23A ubiquitinieren. Auch rekombinantes Hdm2 kann HHR23A *in vitro* ubiquitinieren (Abb. 9D). HHR23A ist somit zumindest *in vitro* kein alleiniges Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP. Es wird vielmehr von verschiedenen E3-Enzymen erkannt und ubiquitiniert.

Welche Bereiche des Ubl/Uba-Proteins HHR23A für seine Erkennung als Ubiquitinierungssubstrat durch verschiedene E3-Enzyme wichtig sind, wurde mit HHR23A-Deletionsmutanten getestet, denen entweder die N-terminale Ubl-Domäne (HHR23A Δ Ubl) oder die C-terminale Uba2-Domäne (HHR23A Δ Uba2) fehlt (Abb. 9B). Sowohl für die effiziente Ubiquitinierung von HHR23A durch E6-AP (Abb. 9C) als auch durch Hdm2 (Abb. 9D) war die Ubl-Domäne von HHR23A notwendig. Mit diesen Ergebnissen konnte die schon von Kumar *et al.* (1999) beschriebene Abhängigkeit der Ubiquitinierung von HHR23A durch E6-AP von seiner Ubl-Domäne bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Ubiquitinierung von HHR23A durch Hdm2 die Ubl-Domäne benötigt. Dies könnte bedeuten, dass die Ubl-Domäne von HHR23A eine wichtige Rolle bei der Ubiquitinierung durch verschiedene E3-Ligasen spielt (vgl. 4.2.1). HHR23A Δ Uba2 wurde von E6-AP als Ubiquitinierungssubstrat erkannt und ubiquitiniert (Abb. 9C), während die Ubiquitinierung dieser Mutante durch Hdm2 nicht mehr möglich war (Abb. 9D). Möglicherweise ist die Uba2-Domäne von HHR23A für die Interaktion mit Hdm2 notwendig, während sie für die Bindung an E6-AP nicht gebraucht wird.

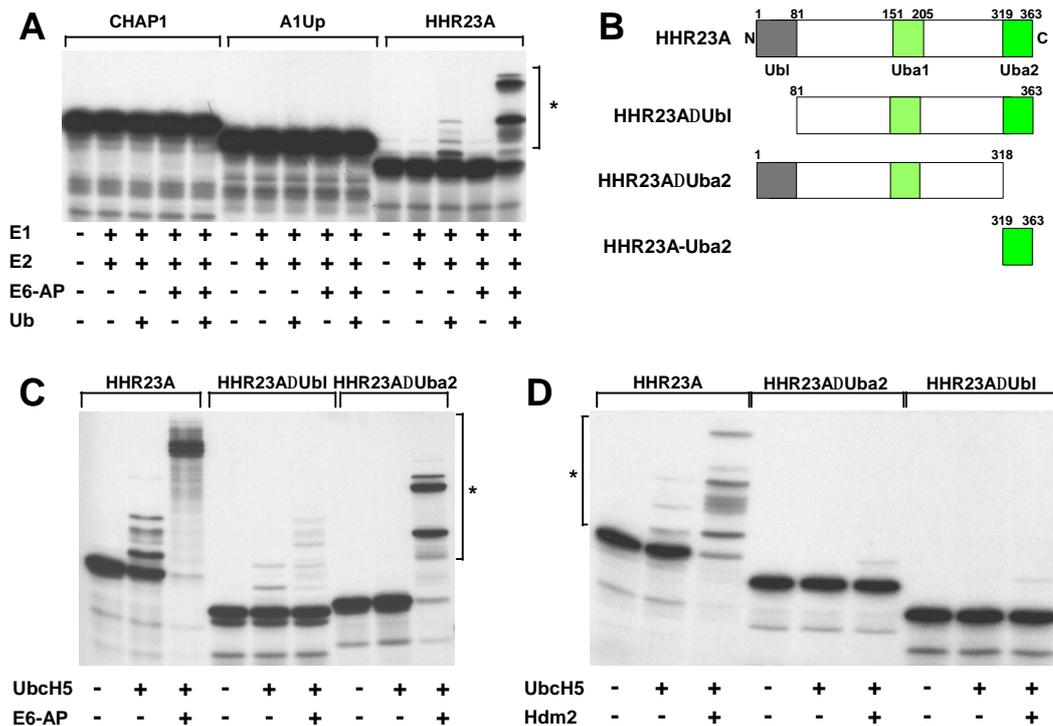


Abb. 9: HHR23A, nicht aber CHAP1 und A1Up sind Ubiquitinierungssubstrate *in vitro*. (A) Ubiquitinierungsassays wurden unter Standardbedingungen (vgl. 2.1.10) mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem HHR23A, CHAP1 bzw. A1Up in An- und Abwesenheit von rekombinantem E1, E2 (UbcH5 und H7), E6-AP und Ubiquitin (Ub) durchgeführt, wie angegeben. Die Ubiquitinierungsansätze wurden nach 2 h aufgekocht und in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden fluorographisch sichtbar gemacht. (B) Überblick über die in (C) und (D) eingesetzten Deletionsmutanten von HHR23A. (C) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes HHR23A sowie die angegebenen Mutanten von HHR23A (vgl. (B)) wurden in An- und Abwesenheit von UbcH5 und E6-AP ubiquitiniert und analysiert, wie in (A) beschrieben. (D) Analog zu (C) wurde die Ubiquitinierung von HHR23A und seinen Mutanten durch rekombinantes Hdm2 untersucht. *, ubiquitinierte Proteine.

3.2.3 Einfluss von Ubl/Uba-Proteinen auf das Ubiquitin-Proteasom-System

Für die im YTH ermittelten Interaktionspartner von E6-AP, CHAP1 und A1Up konnte *in vitro* weder eine Bindung an E6-AP (vgl. 3.2.1) noch eine Ubiquitinierung durch E6-AP (vgl. 3.2.2) nachgewiesen werden. Damit blieb unklar, was für ein Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen und E6-AP besteht. Für Rad23 ist gezeigt worden, dass seine Überexpression in *S. cerevisiae*-Zellen den proteasomalen Abbau von Proteinen hemmt (Ortolan *et al.*, 2000). Weiterhin ist eine inhibierende Wirkung von Rad23 und HHR23B auf Ubiquitinierungen beschrieben worden (Ortolan *et al.*, 2000) (vgl. 1.7.2). Es ist denkbar, dass neben Rad23 und HHR23B auch HHR23A und andere Ubl/Uba-Proteine, wie CHAP1 und A1Up, Aufgaben in der Regulation der Ubiquitinierung und des proteasomalen Abbaus übernehmen. Daher wurde überprüft, ob CHAP1, A1Up und HHR23A das Ubiquitin-Proteasom-System beeinflussen.

3.2.3.1 Einfluss von Ubl/Uba-Proteinen auf den E6/E6-AP-induzierten Abbau von p53 *in vitro*

Die Wirkung der drei genannten Ubl/Uba-Proteine auf den proteasomalen Abbau wurde zunächst *in vitro* am Beispiel der Degradation von p53 untersucht. *In vitro* translatiertes p53 kann in Ubiquitinierungsassays in Gegenwart von rekombinantem E1, UbcH5 oder UbcH7, HPV16-E6 und E6-AP polyubiquitiniert werden (Scheffner *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1998). Fügt man den Reaktionsansätzen nach Ablauf der Ubiquitinierung frisches RRL zu, welches ausreichende Mengen an 26S-Proteasom enthält, kommt es während einer zweistündigen Inkubation zum Abbau von polyubiquitiniertem p53 (Glockzin *et al.*, 1999) (vgl. 2.2.11). p53-Abbauassays wurden in An- und Abwesenheit gleicher Mengen an GST-CHAP1, GST-A1Up und GST-HHR23A durchgeführt. Während die zusätzliche Anwesenheit von rekombinantem CHAP1 oder A1Up keinen Einfluss auf die Degradation von p53 hatte, hemmte HHR23A den durch HPV16-E6 und E6-AP vermittelten Abbau von p53 vollständig (Abb. 10A). Die Inhibition des Abbaus konnte dabei nicht auf eine Hemmung der Ubiquitinierung von p53 durch HHR23A zurückgeführt werden. p53 wurde auch in Anwesenheit von HHR23A polyubiquitiniert (Abb. 10A). Titrationsexperimente zeigten, dass auch im Vergleich zu HHR23A höhere Konzentrationen an CHAP1 und A1Up keinen Effekt auf den E6/E6-AP-vermittelten Abbau von p53 hatten (nicht gezeigt). Ein Einfluss auf den E6/E6-AP-abhängigen Abbau von p53 *in vitro* konnte damit nur für HHR23A, nicht aber für CHAP1 und A1Up nachgewiesen werden.

Im Anschluss wurde analysiert, welche Domänen von HHR23A für den inhibierenden Effekt auf den Abbau von p53 *in vitro* notwendig sind. Dafür wurden die HHR23A-Deletionsmutanten HHR23A Δ Ubl, HHR23A Δ Uba2 sowie die isolierte Uba2-Domäne von HHR23A (HHR23A-Uba2) (vgl. Abb. 9B) als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und in jeweils gleichen Konzentrationen in p53-Abbauassays getestet (Abb. 10B, C). HHR23A Δ Ubl führte ebenso zu einer Abbauehemmung von polyubiquitiniertem p53 wie HHR23A (Abb. 10C). HHR23A Δ Uba2 blockierte den Abbau von p53 hingegen nicht (Abb. 10C). Die isolierte Uba2-Domäne von HHR23A verhinderte den Abbau von polyubiquitiniertem p53 (Abb. 10C). Die Stärke der Hemmung durch die isolierte Uba2-Domäne von HHR23A war mit der durch HHR23A vergleichbar (Abb. 10C). HHR23A Δ Ubl hatte sogar einen etwas stärkeren inhibierenden Effekt als HHR23A (Abb. 10C). Insgesamt wurde gezeigt, dass die Uba2-Domäne, nicht jedoch die Ubl-Domäne von HHR23A für die oben beschriebene Inhibition des E6/E6-AP-vermittelten Abbaus von p53 *in vitro* notwendig ist. Die isolierte Uba2-Domäne ist dabei ausreichend für die Hemmung der Degradation von

polyubiquitiniertem p53. Experimente mit der isolierten Uba-Domäne von CHAP1 führten nicht zu einer Hemmung des Abbaus von p53 (Abb. 10D). Somit kann HHR23A-Uba2 in seiner inhibierenden Wirkung auf den Abbau von p53 nicht durch eine beliebige Uba-Domäne eines anderen Proteins ersetzt werden.

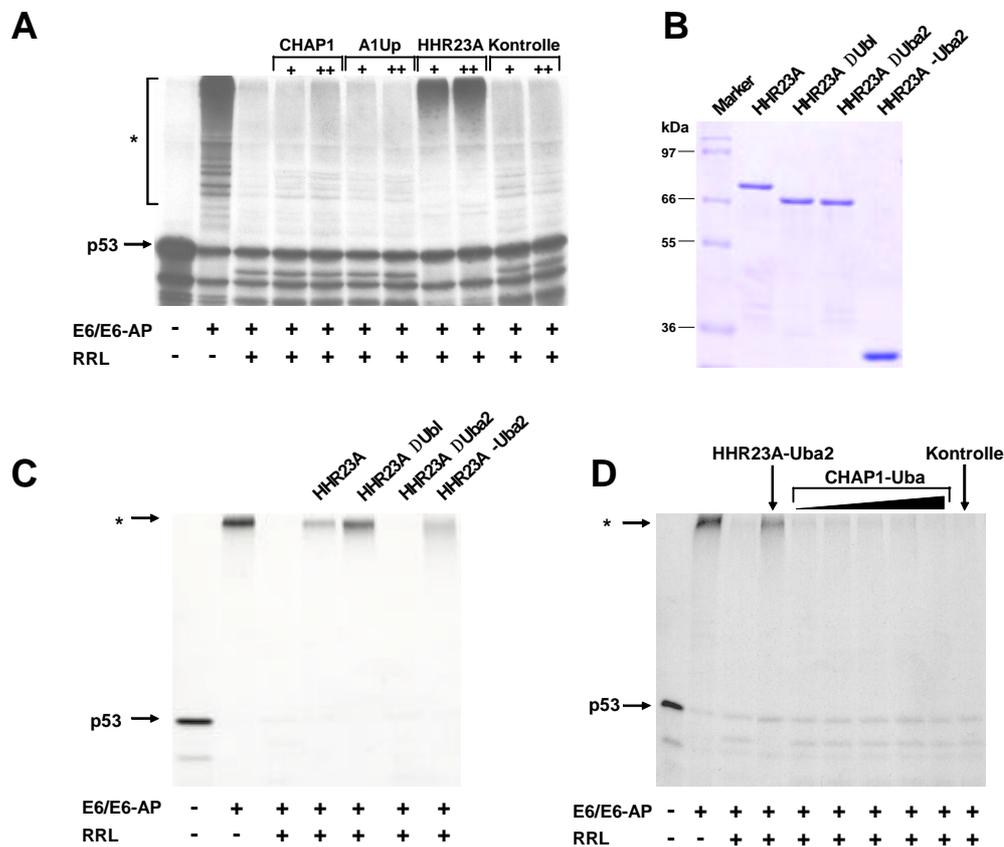


Abb. 10: HHR23A, nicht aber CHAP1 oder A1Up, hemmen den proteasomalen Abbau von polyubiquitiniertem p53 *in vitro*. (A) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde HPV16-E6/E6-AP-abhängig unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) ubiquitiniert. Nach 1 h wurde die Ubiquitinierungsreaktion abgestoppt und aufgeköcht bzw. durch Zugabe von RRL in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von rekombinantem GST (Kontrolle), GST-HHR23A, GST-CHAP1 bzw. GST-A1Up 2 h Degradationsbedingungen ausgesetzt. Die Ansätze wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und radioaktiv markiertes p53 fluorographisch sichtbar gemacht. (B) In (C) und (D) eingesetzte HHR23A bzw. HHR23A-Deletionsmutanten wurden in *E. coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert und über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Proteinmengen wurden einander angeglichen, in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. (C) Analog zu (A) wurde der Einfluss von HHR23A und den angegebenen HHR23A-Deletionsmutanten auf die *in vitro* Degradation von p53 getestet. (D) Analog zu (A) wurde der Einfluss der isolierten Uba-Domänen von HHR23A und verschiedenen Konzentrationen von CHAP1 auf die *in vitro* Degradation von p53 untersucht. Kontrolle, nicht-fusioniertes GST; *, polyubiquitiniertes p53.

3.2.3.2 Einfluss von HHR23A auf Ubiquitinierungsreaktionen *in vitro*

Polyubiquitiniertes p53 wurde in Degradationsassays *in vitro* in Anwesenheit von rekombinantem HHR23A (Abb. 10) bzw. HHR23B (nicht gezeigt) stabilisiert. Es konnte

somit keine Hemmung der Ubiquitinierung durch Rad23-Proteine, wie sie von Ortolan *et al.* (1999) für die Ubc2-abhängige Ubiquitinierung von Histon H2B beschrieben wurde, beobachtet werden. Es ist möglich, dass E6-AP durch seine Bindung an HHR23A bzw. B mit den Funktionen der beiden Ubl/Uba-Proteine interferiert. Dies könnte erklären, warum HHR23A und B keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung von p53 durch E6/E6-AP hatten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Wirkung von HHR23A auch auf das E6-AP-unabhängige System der Autoubiquitinierung von Hdm2 getestet. Interessanterweise wurde auch die Selbstubiquitinierung von Hdm2 nicht durch HHR23A inhibiert (Abb. 11B). Somit lassen sich die beobachteten unterschiedlichen Effekte von Rad23, HHR23A und HHR23B auf Ubiquitinierungen nicht auf spezifische Eigenschaften von E6-AP zurückführen (vgl. Ortolan *et al.*, 2000; Abb. 11A, B).

Histon 2B (H2B) wird Ubc2-abhängig an mehreren Lysinresten monoubiquitiniert. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Ubiquitinierung die Bildung zwei- bis dreigliedriger Ubiquitin-Ketten umfasst (Jason *et al.*, 2002). In der SDS-PAGE kann nicht unterschieden werden, ob Substrate an mehreren Lysinen monoubiquitiniert vorliegen oder ob kurze Ubiquitin-Ketten an die Proteine gekoppelt sind. In beiden Fällen ist ein nicht auflösbarer „Schmier“ oberhalb des nicht-modifizierten Proteins zu erkennen. Aus diesem Grund werden multiple Monoubiquitinierungen sowie die Ubiquitinierung mit kurzen, zwei- bis dreigliedrigen Ubiquitin-Ketten im Rahmen dieser Arbeit unter dem Begriff „Oligoubiquitinierung“ zusammengefasst. Oligoubiquitinierte Proteine werden vom Proteasom nicht als Abbausubstrate erkannt (vgl. 1.2). Im Gegensatz zu H2B werden Hdm2 und p53 in den beschriebenen Experimenten nicht oligoubiquitiniert, sondern Hdm2- bzw. E6/E6-AP-abhängig polyubiquitiniert. Unter Polyubiquitinierungen werden in dieser Arbeit Modifikationen von Substraten mit Ubiquitin-Ketten, meistens langen K48-Ketten verstanden, die Proteine für den proteasomalen Abbau markieren (vgl. 1.2). Sie sind in der SDS-PAGE daran zu erkennen, dass hochmolekulare Proteinaggregate im oberen Teil des Trenngels akkumulieren (vgl. Abb. 11A, B). Ausgehend von den dargelegten Überlegungen ist es möglich, dass Rad23-Proteine nur mit der Oligoubiquitinierung von Proteinen interferieren, während sie die Polyubiquitinierung von Substraten zulassen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Einfluss von HHR23A auf zwei Oligoubiquitinierungssubstrate *in vitro* untersucht. Das UIM-Protein HRS (vgl. 1.7.4) wird durch rekombinantes E6-AP *in vitro* oligoubiquitiniert (vgl. 3.3.4). Auch p53 wird *in vitro* durch Hdm2 oligoubiquitiniert. Darauf weisen u. a. Ergebnisse mit der Ubiquitinmutanten R29/R48/R63, bei der die Lysinreste K29, K48 und K63 gegen Argininreste ausgetauscht

sind, hin. Diese Mutante lässt keine Polyubiquitin-Kettenbildung über K48 sowie auch keine Bildung alternativer Ubiquitin-Ketten über K29 und K63 zu. Die Hdm2-abhängige Ubiquitinierung von p53 mit R29/R48/R63 unterschied sich in ihrem Ubiquitinierungsbild nicht von der Ubiquitinierung mit Wildtyp-Ubiquitin (Abb. 11E). Bei Benutzung der gleichen Ubiquitinmutanten für die E6/E6-AP-induzierte Ubiquitinierung von p53 ist im Vergleich ein deutlicher Unterschied zur Ubiquitinierung mit Wildtyp-Ubiquitin erkennbar (Abb. 11F). Diese Ergebnisse lassen eine multiple Monoubiquitinierung von p53 durch Hdm2 *in vitro* vermuten, wie sie auch von Lai *et al.* (2001) angenommen wird, und bestätigen die Polyubiquitinierung von p53 durch E6/E6-AP. In Anwesenheit von HHR23A wurden die Oligoubiquitinierungen von HRS durch E6-AP sowie von p53 durch Hdm2 unterbunden (Abb. 11C, D). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rad23-Proteine zumindest *in vitro* Oligoubiquitinierungen, nicht jedoch die zum Abbau notwendigen Polyubiquitinierungen von Substraten, hemmen können.

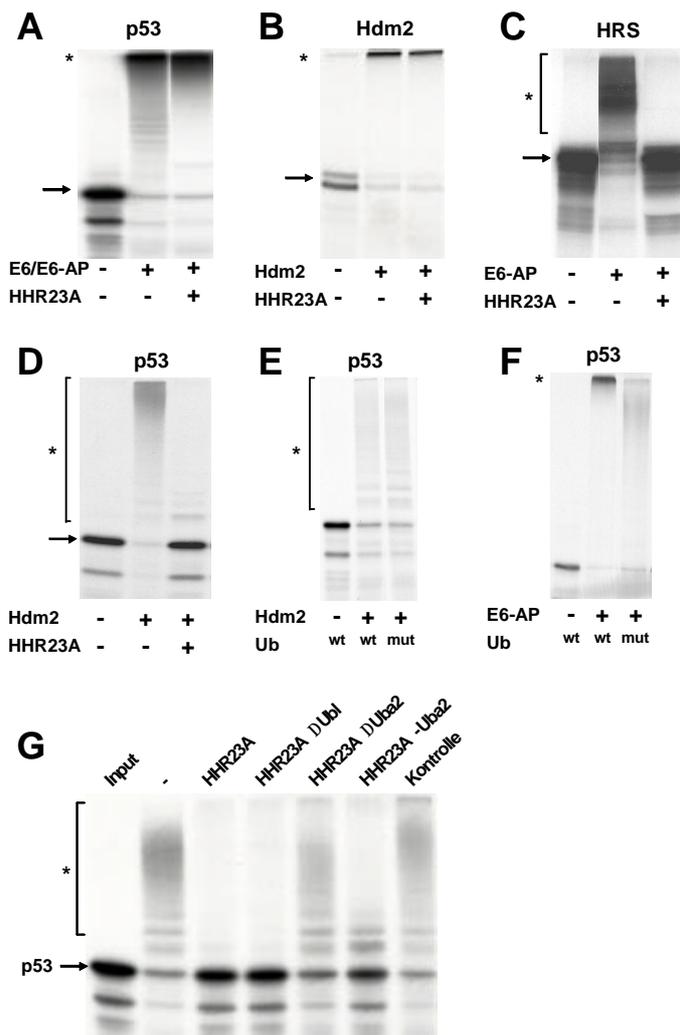


Abb. 11: HHR23A hemmt Oligoubiquitinierungen, nicht aber Polyubiquitinierungen verschiedener Proteine *in vitro*, abhängig von seiner Uba2-Domäne. (A) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde HPV16-E6/E6-AP-abhängig unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) in An- und Abwesenheit von GST-HHR23A ubiquitiniert. Die Ubiquitinierungsansätze wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Radioaktiv markiertes p53 wurde fluorographisch sichtbar gemacht. (B-D) Analog zu (A) wurde der Einfluss von HHR23A auf die Hdm2-vermittelte Autoubiquitinierung von Hdm2 (B), die E6-AP-abhängige Oligoubiquitinierung von HRS (C) und die Hdm2-abhängige Oligoubiquitinierung von p53 ermittelt (D). (E-F) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde Hdm2-abhängig (E) bzw. HPV16-E6/E6-AP-abhängig (F) mit Wildtyp-Ubiquitin (wt) oder R29/R48/R63-Ubiquitin (mut) ubiquitiniert. Die Ubiquitinierungsansätze wurden, wie in (A) beschrieben, analysiert. (G) Analog zu (D) wurde der Einfluss der angegebenen HHR23A-Deletionsmutanten (vgl. Abb. 9B) auf die Hdm2-abhängige Ubiquitinierung von p53 ermittelt. Kontrolle, nicht-fusioniertes GST. *, ubiquitiniertes Protein (mit Klammer: oligoubiquitiniert; ohne Klammer: polyubiquitiniert).

Experimente mit HHR23A-Deletionsmutanten zeigten weiterhin, dass die Uba2-Domäne, nicht jedoch die Ubl-Domäne von HHR23A für die Hemmung der Hdm2-abhängigen Oligoubiquitinierung von p53 benötigt wird (Abb. 11G). Auch die isolierte Uba2-Domäne von HHR23A hatte einen blockierenden Effekt, der aber allein nicht für eine komplette Inhibition der Oligoubiquitinierung von p53 ausreichte.

Es stellte sich die Frage, ob außer HHR23A auch CHAP1 oder A1Up Oligoubiquitinierungen hemmen können. Im Gegensatz zu HHR23A hatten CHAP1 und A1Up keinen Einfluss auf die Oligoubiquitinierung von p53 (nicht gezeigt).

3.2.4 Einfluss von HHR23A auf die Deubiquitinierung von p53 *in vitro*

Polyubiquitiniertes p53 wurde im Degradationsassay *in vitro* in Gegenwart von HHR23A stabilisiert. Da im RRL, das für den Abbauassay benötigt wird (vgl. 2.2.11), deubiquitinierende Enzyme vorhanden sind, wurde überprüft, ob HHR23A auch vor Deubiquitinierung schützen kann. Dazu wurde *in vitro* translatiertes p53 entweder Hdm2-abhängig oligo- oder E6/E6-AP-abhängig polyubiquitiniert (vgl. 3.2.3.2). Nach abgelaufener Ubiquitinierung wurde die Reaktion abgestoppt und rekombinantes *S. cerevisiae* UBP1 zugesetzt (vgl. 2.2.11). Die weitere einstündige Inkubation erfolgte in An- bzw. Abwesenheit von HHR23A. Polyubiquitiniertes wie oligoubiquitiniertes p53 wurden durch UBP1 vollständig deubiquitiniert (Abb. 12A). Die zusätzliche Anwesenheit von HHR23A hemmte die Deubiquitinierung von polyubiquitiniertem, nicht jedoch von oligoubiquitiniertem p53 (Abb. 12A). Eine genaue Charakterisierung der Inhibition der UBP1-vermittelten Deubiquitinierung von polyubiquitiniertem p53 durch HHR23A mit den HHR23A-Deletionsmutanten HHR23A Δ Ubl, HHR23A Δ Uba2 und HHR23A-Uba2 zeigte, dass die Uba2-Domäne von HHR23A, nicht jedoch die Ubl-Domäne für diesen Effekt notwendig und allein ausreichend ist (Abb. 12B). CHAP1 konnte die Deubiquitinierung von polyubiquitiniertem p53 durch UBP1 nicht hemmen (Abb. 12B).

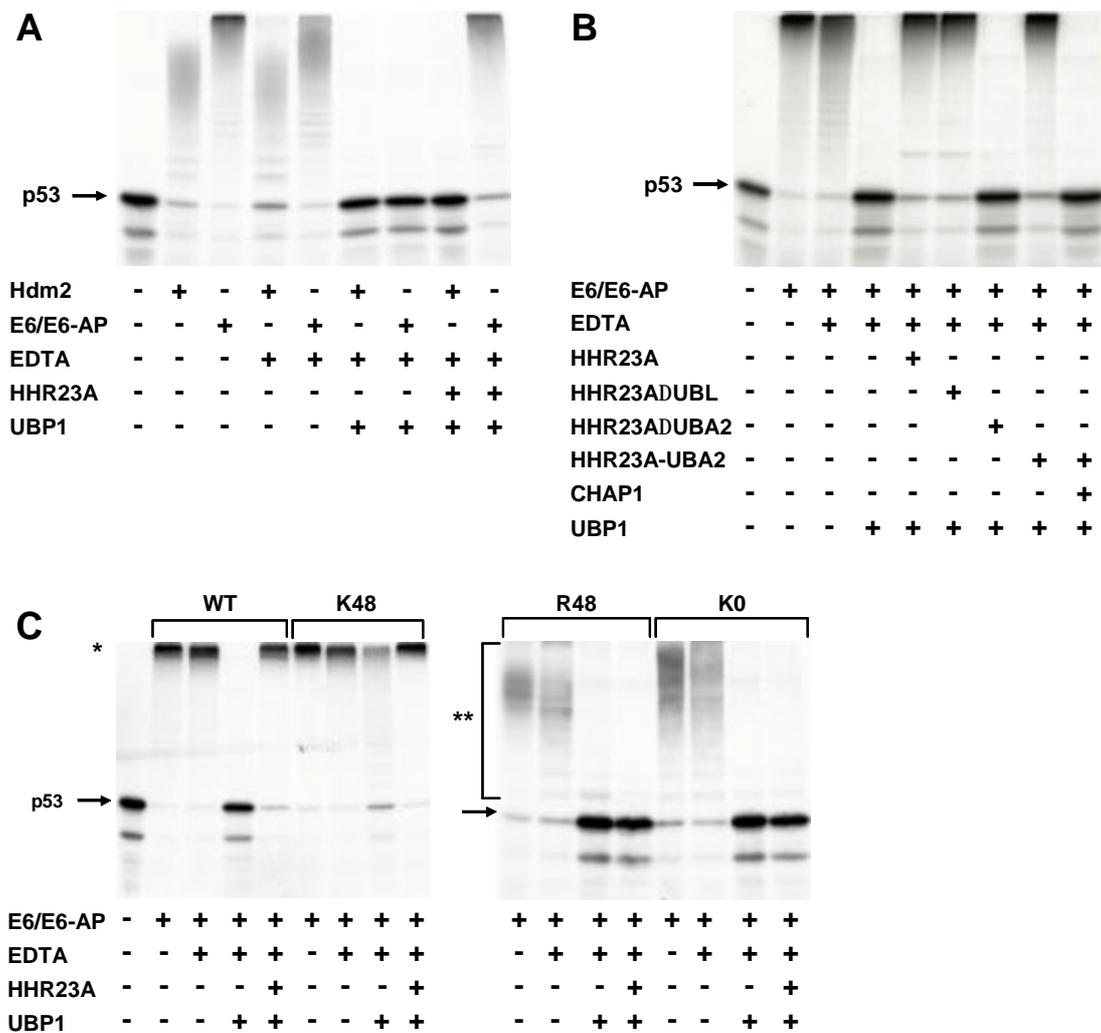


Abb. 12: HHR23A hemmt abhängig von seiner Uba2-Domäne die Deubiquitinierung von poly-, nicht aber von oligoubiquitiniertem p53 *in vitro*. (A) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) in An- und Abwesenheit von HPV16-E6 und E6-AP (=> Polyubiquitinierung) bzw. Hdm2 (=> Oligoubiquitinierung) ubiquitiniert, wie angegeben. Nach 1 h wurden die Ubiquitinierung durch Zugabe von EDTA (20 mM Endkonzentration) abgestoppt und rekombinantes UBPI zugegeben. Die Deubiquitinierungsreaktion erfolgte 1 h in An- und Abwesenheit von rekombinantes GST-HHR23A, wie angegeben. Die Deubiquitinierungsreaktionen wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und radioaktiv markiertes p53 fluorographisch sichtbar gemacht. (B) Analog zu (A) wurde E6/E6-AP-abhängig polyubiquitiniertes p53 einer Deubiquitinierungsreaktion in An- und Abwesenheit von GST-HHR23A-Deletionsmutanten (vgl. Abb. 9A) bzw. GST-CHAP1 unterzogen, wie angegeben. (C) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde in Anwesenheit von Ubiquitin (WT) bzw. den Ubiquitinmutanten K48, R48 oder K0 HPV16-E6/E6-AP-abhängig ubiquitiniert, wie angezeigt. Die angeschlossenen Deubiquitinierungsreaktionen erfolgten analog zu (A). *, polyubiquitiniertes p53; **, oligoubiquitiniertes p53.

Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, dass HHR23A seinen protektiven Effekt nur in Anwesenheit von Polyubiquitin-Ketten am Substrat ausüben kann, wurden Versuche mit Ubiquitinmutanten durchgeführt. Massenspektrometrischen Analysen zeigten, dass p53 E6/E6-AP-abhängig mit K48-Ubiquitin-Ketten modifiziert wird (nicht gezeigt). Setzte man also für die E6/E6-AP-vermittelte Ubiquitinierung von p53 *in vitro* die Ubiquitinmutante K48 ein, die von allen 7 Lysinresten des Ubiquitins nur noch K48 enthält, erhielt man

polyubiquitiniertes p53 (Abb. 12C). Der Gebrauch von Ubiquitinmutanten, bei denen nur K48 (R48) oder alle Lysinreste (K0) durch Argininreste ersetzt wurden, erlaubte hingegen keine Kettenbildung und damit nur die Entstehung von oligoubiquitiniertem p53 im E6/E6-AP-System (Abb. 12C). p53, das durch K48-Ubiquitin polyubiquitiniert wurde, wurde in Anwesenheit von UBP1 deubiquitiniert und in zusätzlicher Anwesenheit von HHR23A stabilisiert (Abb. 12C). Mit den Mutanten R48 und K0 oligoubiquitiniertes p53 wurde hingegen auch in der Präsenz von HHR23A durch UBP1 deubiquitiniert (Abb. 12C). Die Deubiquitinierung von mit der K48-Mutante polyubiquitiniertem p53 durch UBP1 war wenig effizient (Abb. 12C). Dies könnte auf eine schlechtere Erkennung der K48-Mutanten durch UBP1 zurückzuführen sein. Zusammengefasst konnte durch die Verwendung von Ubiquitinmutanten auch in einem einheitlichen Ubiquitinierungssystem (ein Substrat und gleiches E3) gezeigt werden, dass HHR23A die Deubiquitinierung eines polyubiquitinierten Substrates inhibiert, während es auf die Deubiquitinierung eines oligoubiquitinierten Substrats keinen Einfluss hat.

3.2.5 Bindung von ubiquitiniertem p53 an HHR23A *in vitro*

Um zu verstehen, wie HHR23A polyubiquitiniertes, nicht aber oligoubiquitiniertes p53 vor Deubiquitinierung und vor dem Abbau durch das 26S-Proteasom schützen kann, wurde überprüft, ob HHR23A an ubiquitiniertes p53 bindet. Dazu wurden GST-Kopräzipitationsassays mit GST-HHR23A und poly- bzw. oligoubiquitiniertem p53 durchgeführt (vgl. 2.2.9). Als Negativkontrolle wurde nicht-ubiquitiniertes p53 eingesetzt. HHR23A band effizient an polyubiquitiniertes, nicht jedoch an nicht-ubiquitiniertes p53 (Abb. 13A). Experimente mit HHR23A-Deletionsmutanten zeigten weiterhin, dass für diese Wechselwirkung nur die Uba2-Domäne, nicht aber die Ubl-Domäne von HHR23A notwendig ist (Abb. 13A). Die isolierte Uba2-Domäne reichte für die Interaktion mit polyubiquitiniertem p53 aus, während nicht-ubiquitiniertes p53 nicht an die verschiedenen Deletionsmutanten von HHR23A band (Abb. 13A). HHR23A interagierte auch mit oligoubiquitiniertem p53 (Abb. 13B). Die Effizienz der Bindung war jedoch, verglichen mit der von polyubiquitiniertem p53, sehr viel geringer. Auch für die Interaktion mit oligoubiquitiniertem p53 genügte die Uba2-Domäne von HHR23A.

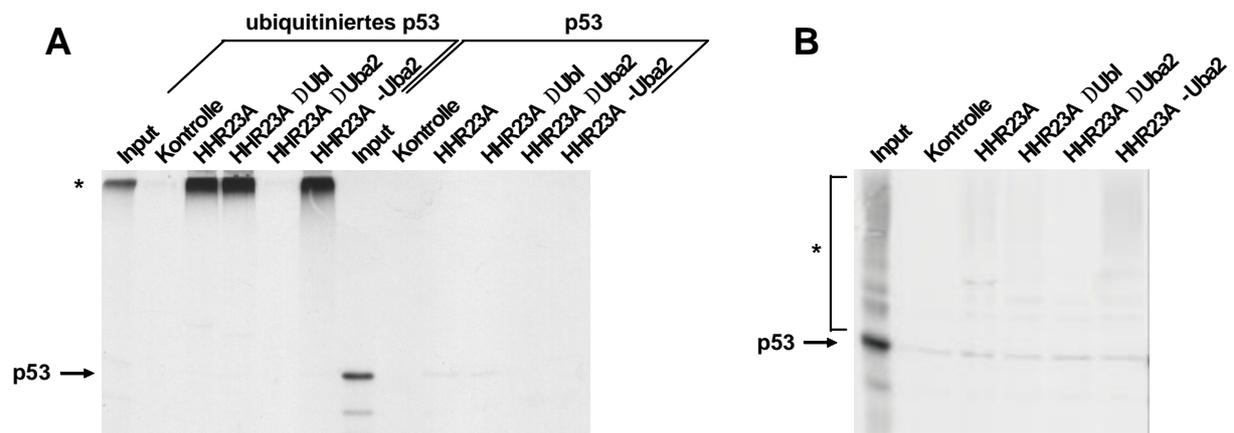


Abb. 13: HHR23A bindet über seine Uba2-Domäne effizient an polyubiquitiniertes, jedoch nur schwach an oligoubiquitiniertes p53. *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) HPV16-E6/E6-AP-abhängig polyubiquitiniert (A) bzw. Hdm2-abhängig oligoubiquitiniert (B). Die Ubiquitinierungen wurden nach 1 h durch Zugabe von EDTA abgestoppt und die Ubiquitinierungsansätze mit an GSH gekoppeltem GST-HHR23A, GST-HHR23A-Deletionsmutanten bzw. GST (Kontrolle) 4 h inkubiert, wie angegeben. Kontrollansätze wurden mit nicht-ubiquitiniertem p53 und den genannten GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Die Fusionsproteine wurden dann präzipitiert. Das Präzipitat wurde gewaschen und die kopräzipitierten radioaktiv markierten Proteine in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. *, ubiquitinierte Proteine (ohne Klammer: polyubiquitiniertes p53; mit Klammer: oligoubiquitiniertes p53). Input, 20 % der in der Präzipitation eingesetzten Ubiquitinierungsreaktion bzw. des eingesetzten *in vitro*-Translatats.

3.2.6 Bindung von polyubiquitinierten Proteinen an Ubl/Uba-Proteine *in vitro*

Im Anschluss wurde getestet, ob außer HHR23A auch CHAP1 und A1Up über ihre Uba-Domänen an polyubiquitiniertes p53 binden können. Dafür wurden die für HHR23A beschriebenen Kopräzipitationsassays mit polyubiquitiniertem p53 ebenfalls mit GST-CHAP1 und GST-A1Up durchgeführt. Auch CHAP1 und A1Up, die im Vergleich zu HHR23A nur über je eine Uba-Domäne verfügen (vgl. Abb. 3), interagierten mit polyubiquitiniertem p53 (Abb. 14A). Versuche mit der Uba-Domäne von CHAP1 zeigten, dass sie in der Bindung von polyubiquitiniertem p53 ähnlich effizient ist wie die isolierte Uba2-Domäne von HHR23A (Abb. 14B). Mit diesen Ergebnissen wurde deutlich, dass die drei getesteten Ubl/Uba-Proteine HHR23A, CHAP1 und A1Up *in vitro* mit vergleichbarer Effizienz an p53-gekoppelte Polyubiquitin-Ketten binden. Im Gegensatz zu HHR23A konnte jedoch weder für CHAP1 noch für A1Up eine Bindung an oligoubiquitiniertes p53 gezeigt werden (nicht gezeigt).

Um zu klären, ob neben polyubiquitiniertem p53 auch andere polyubiquitinierte Proteine an diese Ubl/Uba-Proteine binden können, wurden die Präzipitationsassays auch mit ubiquitiniertem E6-AP durchgeführt. E6-AP kann sich selbst in Gegenwart von rekombinantem E1, UbcH7 und UbcH5 *in vitro* polyubiquitiniieren (Nuber *et al.*, 1998). E6-AP ist zwar im YTH ein Interaktionspartner von allen drei genannten Ubl/Uba-Proteinen, in

Bindungsversuchen *in vitro* konnte aber nur eine Interaktion von HHR23A, nicht jedoch von CHAP1 und A1Up mit E6-AP nachgewiesen werden (vgl. Abb. 8). Sowohl HHR23A als auch CHAP1 und A1Up banden an polyubiquitiniertes E6-AP mit einer Effizienz, die der Interaktion mit polyubiquitiniertem p53 vergleichbar war (Abb. 14C). Interessanterweise interagierte HHR23A bevorzugt mit polyubiquitiniertem E6-AP. Ebenfalls im Versuchsansatz vorliegendes, nicht-ubiquitiniertes E6-AP wurde nicht gebunden. In Abwesenheit von polyubiquitiniertem E6-AP allerdings präzipitierte nicht-modifiziertes E6-AP mit HHR23A (Abb. 14C). Dies könnte auf eine höhere Affinität von HHR23A zu polyubiquitiniertem E6-AP oder allgemein polyubiquitinierten Proteinen als zu nicht-modifiziertem E6-AP hinweisen.

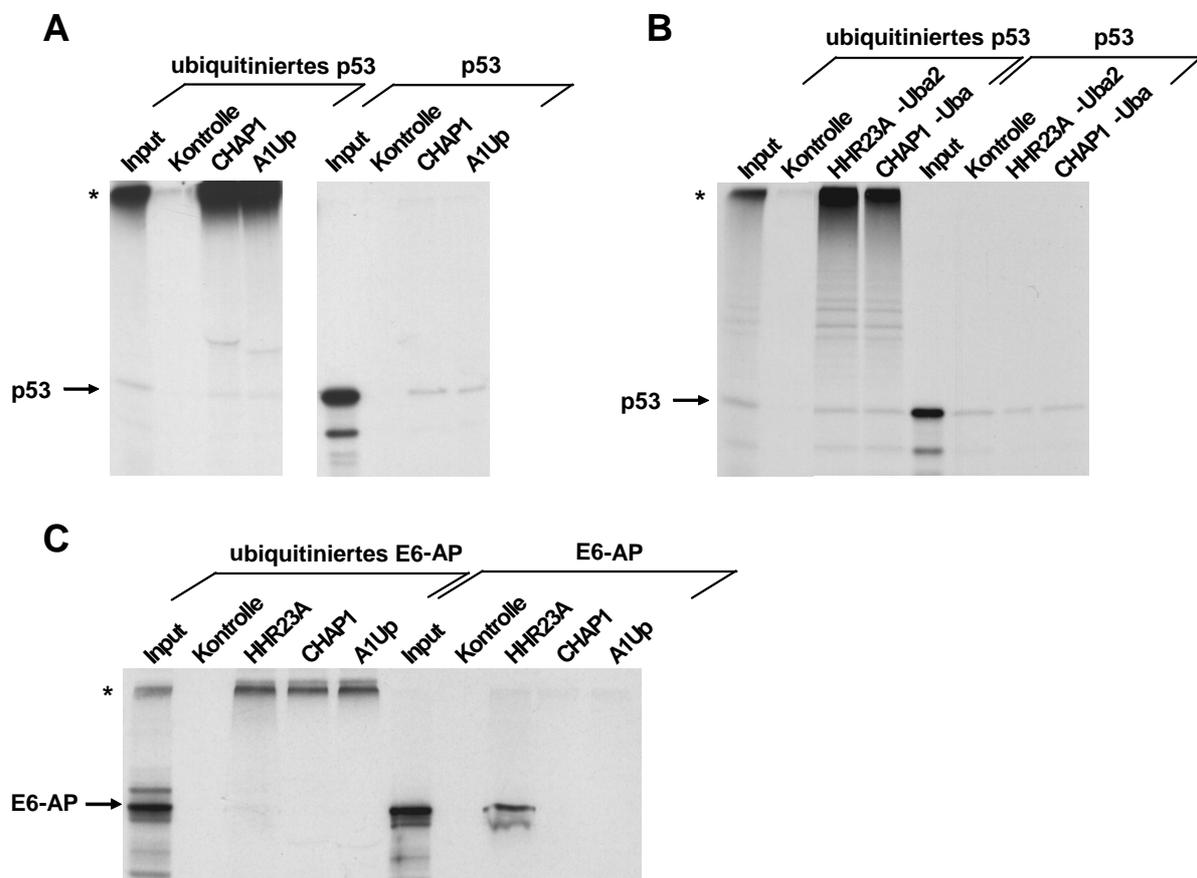


Abb. 14: Nicht nur HHR23A, sondern auch CHAP1 und A1Up binden *in vitro* über ihre Uba-Domänen an polyubiquitinierte Proteine. (A) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde mit HPV16-E6/E6-AP unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) polyubiquitiniert. Als Kontrolle wurde nicht-ubiquitiniertes p53 eingesetzt. Polyubiquitiniertes bzw. nicht-ubiquitiniertes p53 wurden mit GST (Kontrolle), GST-CHAP1 oder GST-A1Up 4 h inkubiert und mit GSH-Sepharose präzipitiert. Die Präzipitationsansätze wurden gewaschen und in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und die kopräzipitierten markierten Proteine fluorographisch sichtbar gemacht. (B) Analog zu (A) erfolgten Kopräzipitationen mit GST (Kontrolle), GST-HHR23A-Uba2 bzw. GST-CHAP1-Uba. (C) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes E6-AP wurde unter Ubiquitinierungsbedingungen durch Zugabe von rekombinantem E1, UbcH7 und UbcH5 autoubiquitiniert. Kopräzipitationsanalysen erfolgten mit autoubiquitiniertem E6-AP bzw. nicht-ubiquitiniertem E6-AP und GST (Kontrolle), GST-HHR23A, GST-CHAP1 und GST-A1Up (vgl. A). Die Auftrennung erfolgte über eine 8% SDS-PAGE. *, polyubiquitinierte Proteine. Input, 20% der in der Präzipitation eingesetzten Ubiquitinierungsreaktion oder des *in vitro*-Translatats.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass es sich bei Uba-Motiven um Domänen handelt, die allgemein eine Interaktion mit polyubiquitinierten Proteinen vermitteln (vgl. 4.2.3).

3.2.7 Einfluss von HHR23A auf den E6/E6-AP-vermittelten Abbau von p53 *in vivo*

Um zu testen, ob HHR23A p53 auch *in vivo* stabilisieren kann, wurden p53-Degradationsversuche in der humanen Bronchialkarzinom-Zelllinie H1299, die kein endogenes p53 enthält, durchgeführt. Ein für p53 kodierendes Expressionsplasmid wurde allein oder gemeinsam mit einem weiteren Konstrukt, das für HPV16-E6 kodiert, transient in H1299-Zellen transfiziert. Daraufhin in der Zelle exprimiertes HPV16-E6 sollte zusammen mit endogen exprimiertem E6-AP zum Abbau von p53 durch das 26S-Proteasom führen (Hengstermann *et al.*, 2001). Um den Einfluss von HHR23A auf diesen Abbau untersuchen zu können, wurde in weiteren Ansätzen zusätzlich ein HA-markiertes HHR23A-Expressionsplasmid kotransfiziert. Jeder Transfektionsansatz enthielt die gleiche Menge eines β -Galactosidase-Expressionsplasmids, welches die Ermittlung der Transfektionseffizienz ermöglichte (vgl. 2.2.12.). 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate, abgeglichen nach Transfektionseffizienzen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde p53 im Westernblot mit einem Antikörper gegen p53 detektiert. In Anwesenheit des HPV16-E6-Onkoproteins wurde p53 wie erwartet abgebaut (Abb. 15). Die zusätzliche Kotransfektion von HA-markiertem HHR23A stabilisierte p53 (Abb. 15). Die Expression von HA-HHR23A wurde im Westernblot nachgewiesen (Abb. 15). Dazu wurden der zuvor mit einem anti-p53-Antikörper dekorierte Blot „gestrippt“ und die Membran im Anschluss mit einem Antikörper gegen HA inkubiert. Mit diesem Ergebnis konnte gezeigt werden, dass HHR23A auch *in vivo* den durch E6/E6-AP induzierten Abbau von p53 inhibieren kann.

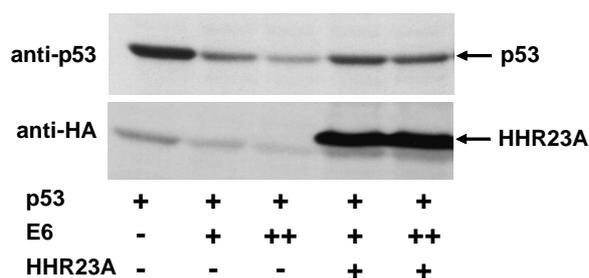


Abb. 15: HHR23A hemmt den HPV16 E6-induzierten Abbau von p53 *in vivo*. H1299-Zellen wurden mit einem p53-kodierenden Expressionsvektor (25 ng pRc/CMV) transient transfiziert. Der p53-Abbau wurde durch die Koexpression von HPV16 E6 erreicht (250 bzw. 500 ng pRc/CMV HPV16 E6). In zwei Ansätzen wurde zusätzlich HA-HHR23A exprimiert (1 μ g pCDNA3 HA-HHR23A), wie angegeben. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate abgeglichen nach Transfektionseffizienzen in einer 10 % SDS PAGE aufgetrennt. Im angeschlossenen Westernblot wurde die Membran zunächst mit einem anti-p53 Antikörper dekoriert. Der Blot wurde dann „gestrippt“, und HA-HHR23A mithilfe eines Antikörpers gegen HA detektiert.

3.2.8 Einfluss von HHR23A auf den Mdm2-vermittelten proteasomalen Abbau von p53 *in vivo*

In normalen (HPV-negativen) Zellen wird p53 durch Hdm2 polyubiquitiniert und so für den proteasomalen Abbau markiert (vgl. 1.4.2.1). Daher wurde als nächstes untersucht, ob HHR23A auch den Hdm2-vermittelten Abbau von p53 in der Zelle blockieren kann. Dazu wurde im beschriebenen Abbausystem *in vivo* (vgl. 3.2.7) statt eines HPV16-E6-Expressionsplasmids ein Mdm2-kodierender Vektor kotransfiziert (aus Expressionsgründen wurde ein Plasmid eingesetzt, das für Mdm2, das Maus-Homolog des humanen Hdm2, kodiert). Die Kotransfektion von Mdm2 resultierte, wie erwartet, in der Degradation von p53 (Abb. 16A). Zusätzlich gegebenes HHR23A-Expressionskonstrukt führte konzentrationsabhängig zu einer Hemmung der p53-Degradation (Abb. 16A). Die Überexpression von HHR23A inhibiert *in vivo* also nicht nur den E6/E6-AP-induzierten Abbau, sondern auch den Abbau von p53 durch Mdm2.

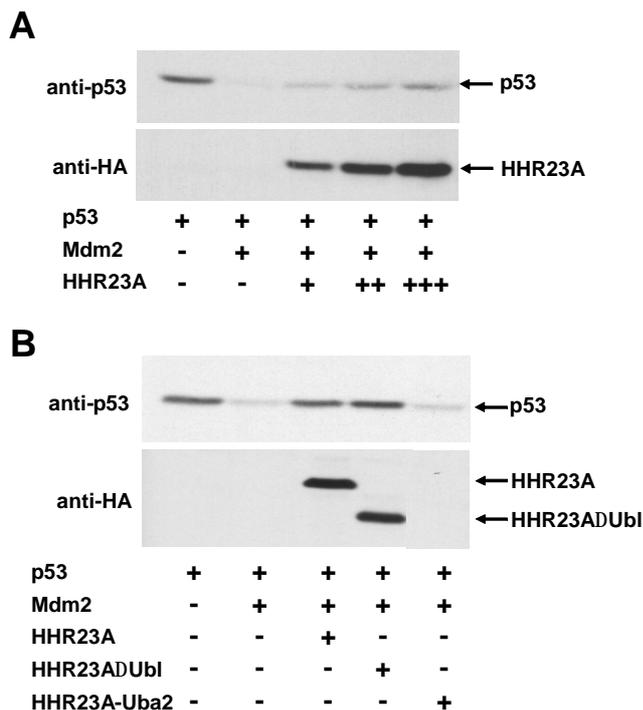


Abb. 16: HHR23A hemmt den Mdm2-induzierten Abbau von p53 *in vivo*. (A) H1299-Zellen wurden mit einem p53-kodierenden Expressionsplasmid (25 ng pRc/CMV) transient transfiziert. Der p53-Abbau wurde durch die Koexpression von Mdm2 erreicht (200 ng pCOC-Mdm2). In drei Ansätzen wurde zusätzlich ein HA-HHR23A-Expressionsplasmid eingebracht (300 ng, 600 ng, 1200 ng pCDNA3 HA-HHR23A). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate, abgeglichen nach Transfektionseffizienzen, in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Im angeschlossenen Westernblot wurde die Membran zunächst mit einem anti-p53-Antikörper, dann mit einem anti-HA-Antikörper dekoriert. (B) Analog zu (A) wurde der Einfluss der Deletionsmutanten HHR23AΔUbl und HHR23A-Uba2 auf den Mdm2-vermittelten Abbau von p53 untersucht, wie angegeben.

In vitro erfolgt die HHR23A-vermittelte Hemmung des p53-Abbaus unabhängig von seiner Ubl-Domäne. Die Uba2-Domäne reicht für die Inhibition allein aus (vgl. 3.2.3.1). Diese Ergebnisse wurden für die Hemmung der Mdm2-abhängigen Degradation von p53 *in vivo* mithilfe HA-markierter HHR23A-Deletionsmutanten überprüft. Die Transfektion von HHR23AΔUbl führte genauso wie die von HHR23A zu einer Stabilisierung von p53 *in vivo* (Abb. 16B). Sie vermittelte bei gleicher Expressionsmenge verglichen mit HHR23A sogar

eine stärkere Hemmung des p53 Abbaus (Abb. 16B). Damit konnte das *in vitro*-Ergebnis der Unabhängigkeit der Abbaueffizienz von der Ubl-Domäne von HHR23A (vgl. 3.2.3.1) *in vivo* bestätigt werden. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Ansätzen konnte *in vivo* jedoch kein Effekt der isolierten Uba2-Domäne gezeigt werden (Abb. 16B). Im angeschlossenen Westernblot ist die Expression der Uba2-Domäne von HHR23A nicht zu erkennen (Abb. 16B), was auf die geringe Größe dieser Mutante zurückzuführen ist. Die generelle Expression von HHR23A-Uba2 wurde aber überprüft (nicht gezeigt). Um den Einfluss von HHR23A und dessen verschiedenen Deletionsmutanten auf den Abbau von p53 *in vivo* vergleichen zu können, wurden die Expressionsmengen der HA-markierten Proteine vor Durchführung der Versuche einander angeglichen. Die pro Transfektionsansatz transient transfizierbare DNA-Menge ist dabei begrenzt (vgl. 2.2.12.). Die Anpassung der HHR23A-Uba2-Expression an die für die Hemmung des p53-Abbaus notwendige Konzentration von HHR23A hätte diese Grenze überschritten. Aus diesem Grund konnte der Einfluss von HHR23A Δ Uba2 auf den Abbau von p53 *in vivo* nicht untersucht werden.

3.2.9 Einfluss von HHR23A auf den RLIM-vermittelten Abbau von CLIM2 *in vivo*

Im Gegensatz zu p53 werden andere Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems (z. B. E6-AP) im Degradationsassay mit RRL *in vitro* nicht oder nur sehr ineffizient abgebaut (eigene Beobachtung). Untersuchungen des Einflusses von HHR23A auf den Abbau anderer Proteine als p53 waren deshalb *in vitro* nicht möglich. Nachdem HHR23A auch *in vivo* die Degradation von p53 hemmen konnte, wurde aber geprüft, ob die Überexpression von HHR23A *in vivo* auch den Abbau anderer Proteine inhibiert. Dazu wurde die Wirkung von HHR23A auf den Abbau des Transkriptionskofaktors CLIM2 untersucht (vgl. 1.4.2.1). Der Kofaktor CLIM2 wird *in vivo* durch RLIM ubiquitiniert und im Anschluss durch das 26S-Proteasom abgebaut (Ostendorff *et al.*, 2002) (vgl. 1.4.2.1). Kotransfektionsexperimente mit RLIM, myc-markiertem CLIM2 und HA-markiertem HHR23A in H1299-Zellen zeigten, dass HHR23A den Abbau von CLIM2 durch RLIM hemmt (Abb. 17). Die Abbaueffizienz war in diesem System allerdings im Vergleich zu der des p53-Abbaus relativ gering. Die Überexpression von HHR23A stabilisierte also *in vivo* zwei unterschiedliche Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems, p53 und CLIM2. Diese Ergebnisse könnten auf eine allgemeine regulatorische Rolle von HHR23A im Ubiquitin-Proteasom-System hinweisen (vgl. 4.2.4).

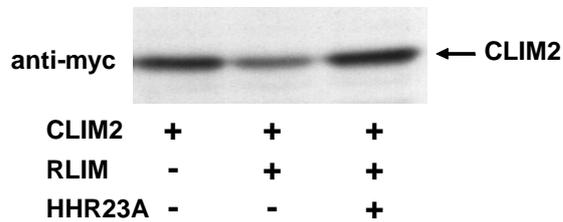


Abb. 17: HHR23A hemmt den RLIM-vermittelten Abbau von CLIM2 *in vivo*. H1299-Zellen wurden mit einem CLIM2-kodierenden Expressionsvektor (200 ng pCDNA myc-CLIM2) transient transfiziert. Der CLIM2-Abbau wurde durch die Kotransfektion eines RLIM-kodierenden Expressionsplasmids erreicht (800 ng pCDNA3 RLIM). Wie angegeben, wurde zusätzlich HHR23A exprimiert. (1 µg pCDNA-HA-HHR23A). Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion lysiert und die nach Transfektionseffizienzen abgeglichenen Zellysate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von CLIM2 erfolgte im Westernblot mit einem anti-myc Antikörper.

3.2.10 Isolierung von Interaktionspartnern des Ubl/Uba-Proteins CHAP1 im YTH

E6-AP interagiert im YTH, ablesbar am Wachstum auf den unterschiedlichen Selektionsplatten, stark mit CHAP1 (vgl. Tabelle 10, 11). Eine Bindung von CHAP1 an (vgl. 3.2.1) oder eine Ubiquitinierung von CHAP1 durch E6-AP (vgl. 3.2.2) waren *in vitro* aber nicht nachweisbar. Um einen Hinweis auf eine mögliche physiologische Relevanz der im YTH detektierten Interaktion zwischen E6-AP und CHAP1 zu erhalten, wurde das in seiner Funktion noch kaum charakterisierte CHAP1 untersucht. Durch die Identifizierung von CHAP1-Bindungspartnern mithilfe des YTH wurden Hinweise auf die Aufgaben von CHAP1 in der Zelle und damit auf seine Verbindung zu E6-AP erhofft.

Im YTH wurde CHAP1 als Bindungspartner von E6-AP sowohl aus der aktivierten T-Zell- als auch aus der fötalen Gehirn-cDNA-Bank isoliert (vgl. 3.1.1). Da die cDNA-Bibliothek aus fötalem Gehirn im Vergleich zu der aus aktivierten T-Zellen über sehr viel mehr unabhängige Klone verfügt und damit eine größere Anzahl von Proteinen abdeckt, wurde sie im YTH mit CHAP1 eingesetzt. Für die primäre Selektion wurde die GAL4-abhängige Histidinsynthese gewählt. Die Ergebnisse des YTH mit CHAP1 sind in Tabelle 12 dargestellt. Insgesamt konnten sechs potentielle Interaktionspartner von CHAP1 identifiziert werden. CHAP1 interagiert im YTH mit sich selbst. Weiterhin enthielten insgesamt sieben isolierte Klone Sequenzen der humanen Myotonin-Protein-Kinase (DMPK = „dystrophia myotonica protein kinase“), einer Serin/Threonin-Kinase unbekannter Funktion mit hoher Expression im Muskel und im Gehirn (Larkin und Fardaei, 2001). Außerdem konnte das UIM-Protein HRS (vgl. 1.7.4) als Bindungspartner von CHAP1 im YTH identifiziert werden. Auch HT2A („human TAT interacting protein 2A“, auch TRIM32 = „tripartite motif-containing protein 32“) interagiert im YTH mit CHAP1. Das TAT-interagierende Proteine HT2A verfügt über eine

RING-Finger-Domäne, weshalb angenommen wird, dass es eine RING-Finger-Ligase ist (Frosk *et al.*, 2002). Zusätzlich konnten Teilbereiche von FLASH („FLICE-associated huge protein“-kodierenden Sequenzen in zwei positiven Klonen nachgewiesen werden. FLASH wurde ursprünglich als Bestandteil des Apoptose-regulierenden DISC („death inducing signalling complex“) beschrieben (Imai *et al.*, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der FLASH-Expression die TNF-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B hemmt (Choi *et al.*, 2001). Zwei Klone enthielten Sequenzen, die für Proteine kodieren, die noch nicht in den Datenbanken verzeichnet sind. Eine offensichtliche Verbindung zu E6-AP war für keines der Proteine erkennbar.

cDNA-Bank ¹	Interaktionspartner	Anzahl positiver Klone	Interaktionsbereich ²	Aktivierte Selektionsmarker		
				HIS3	ADE2	SPO13-URA
Fötale Gehirn 8,7 x 10 ⁶ (5 x 10 ⁶)	DMPK	7	378-639 (639)	+	+	+
	CHAP1	5	217-624 (624)	+	+	+
	HRS	3	156-777 (777)	+	+	+
	FLASH	2	1512-1600 (1982)	+	+	-
	HT2A	2	1-653 (653)	+	+	+
	unbekannt	2	-	+	-	-

Tabelle 12: Isolierte Interaktionspartner von CHAP1 im YTH. Es wurde eine cDNA-Bank aus humanem fötalem Gehirn eingesetzt. Primärer Selektionsmarker war *GAL1-HIS3*. ¹ Die Zahlen bezeichnen die Anzahl der getesteten Klone. In Klammern ist die vom Hersteller angegebene Anzahl repräsentativer Klone der cDNA-Bank vermerkt. ² Die Zahlen geben den Bereich des Proteins in Aminosäuren an, mit dem CHAP1 im YTH interagiert (überlappenden Bereich in allen isolierten Klonen). In Klammern ist die Gesamtlänge des jeweiligen Proteins in Aminosäuren angegeben.

Klone, die E6-AP kodierende Sequenzen enthielten, konnten nicht selektiert werden. Das Fehlen von vollständigen E6-AP-cDNA-Sequenzen in der cDNA-Bank wurde durch einen PCR-Nachweis ausgeschlossen (nicht gezeigt). Die Bindung von E6-AP an CHAP1 auch in anderer Richtung, d. h. die Interaktion des GAL4-AD E6-AP Fusionsproteins mit GAL4-DNA-BD-CHAP1-Fusionsprotein wurde bestätigt (nicht gezeigt). Aus diesem Grund ist die fehlende Selektion E6-AP-positiver Klone wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die cDNA-Bank nicht komplett ausgeschöpft wurde. Es wurden nur 8,7 x 10⁶ der vom Hersteller mit 5 x 10⁶ unabhängigen Klonen angegebenen humanen fötalen Gehirnbibliothek überprüft. Um sicherzustellen, dass mit hinreichender Wahrscheinlichkeit jeder der 5 x 10⁶ Klone im Screen repräsentiert ist, müssten mindestens 15 x 10⁶ Klone getestet werden.

3.2.11 Bindung der identifizierten Interaktionspartner an CHAP1 *in vitro*

Mithilfe von GST-Kopräzipitationsassays wurde überprüft, ob die im YTH isolierten Interaktionspartner auch *in vitro* mit CHAP1 interagieren. Vollständige cDNA-Sequenzen von FLASH und DMPK standen nicht zur Verfügung. Es wurde deshalb mit Deletionsmutanten dieser Proteine gearbeitet, die die für die Bindung an CHAP1 im YTH notwendigen Regionen enthalten. Die Bindungsexperimente wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem DMPK 377-624 (Δ N376-DMPK), HRS, HT2A bzw. FLASH 1543-1868 (Δ N1542 Δ C114-FLASH) sowie GST-CHAP1 durchgeführt. Nur für HRS und HT2A, nicht aber für DMPK 377-624 und FLASH 1543-1868 konnte eine Interaktion mit CHAP1 *in vitro* nachgewiesen werden (Abb. 18A). In Kopräzipitationsassays mit *in vitro* translatiertem CHAP1 und GST-CHAP1 band CHAP1 nicht an CHAP1 (Abb. 18B). Damit konnten *in vitro* nur für HRS und HT2A Interaktionen mit CHAP1 bestätigt werden.

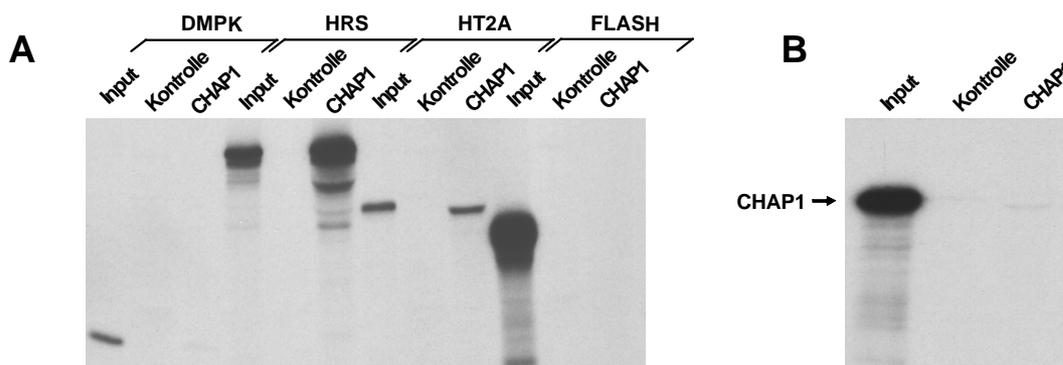


Abb. 18: CHAP1 interagiert *in vitro* mit HRS und HT2A. (A) GST-CHAP1 bzw. GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem DMPK 377-624, HRS, HT2A bzw. FLASH 1543-1868 4 h inkubiert und dann mit GSH-Sepharose präzipitiert (vgl. 2.2.9). Die Präzipitationsansätze wurden gewaschen und in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und radioaktiv markierte Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht. (B) Kopräzipitationsassays wurden analog zu (A) mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem CHAP1 und GST-CHAP bzw. GST (Kontrolle) durchgeführt und analysiert. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten *in vitro*-Translatats.

3.3 UIM-Proteine als Interaktionspartner von Ubl/Uba-Proteinen und als Ubiquitinierungssubstrate

Das Ubl/Uba-Protein CHAP1 interagiert sowohl im YTH als auch *in vitro* mit HRS, welches ein UIM trägt. Interessanterweise ist auch für die Ubl/Uba-Proteine HHR23A und HHR23B die Bindung an zwei Proteine beschrieben, die UIM-Motive tragen (vgl. 1.7.2, 1.7.4). HHR23A und B interagieren über ihre Ubl-Domäne mit dem UIM-Protein Ataxin-3 (Wang *et al.*, 2000). S5a, eine Untereinheit des 19S-Komplexes des 26S-Proteasoms, verfügt über zwei

UIMs (vgl. Abb. 4). Über sein zweites UIM bindet S5a an die Ubl-Domäne von HHR23A und HHR23B (Hiyama *et al.*, 1999). Ausgehend von diesen Befunden stellte sich die Frage, ob UIMs nicht nur Interaktionsmotive für Ubiquitin, sondern auch für Ubl-Domänen sind. Sowohl für CHAP1 als auch für die beiden humanen HHR23-Proteine ist zusätzlich zu ihrer Interaktion mit den UIM-Proteinen HRS bzw. Ataxin-3 und S5a eine Verbindung zu E6-AP gezeigt worden (vgl. 3.1.1; 3.2.1; Kumar *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde weitergehend untersucht, ob zwischen den genannten UIM-Proteinen und E6-AP ein Zusammenhang besteht.

3.3.1 Bindung von UIM-Proteinen an Ubl/Uba-Proteine *in vitro*

Die Frage, ob UIMs allgemeine Interaktionsmotive für Ubl-Domänen darstellen, sollte am Beispiel der Bindung von CHAP1 an HRS bzw. von HHR23A an Ataxin-3 beantwortet werden. Dazu wurden die genannten Interaktionen mithilfe verschiedener Deletionsmutanten *in vitro* charakterisiert.

3.3.1.1 Charakterisierung der Bindung von HRS an CHAP1

Zunächst wurden die notwendigen Domänen für die Interaktion zwischen CHAP1 und HRS *in vitro* bestimmt und die Spezifität der Bindung getestet. Dazu wurden Kopräzipitationsexperimente mit *in vitro* translatiertem HRS und GST-CHAP1, GST-HHR23A sowie den ebenfalls als GST-Fusionsproteine exprimierten Deletionsmutanten CHAP1 Δ Ubl und CHAP1-Ubl, durchgeführt (Abb. 19A). HRS band dabei an CHAP1, nicht jedoch an CHAP1 Δ Ubl (Abb. 19B). CHAP1-Ubl reichte für die Bindung an HRS aus, was auf eine Interaktion von HRS mit der Ubl-Domäne von CHAP1 hinweist. Eine Bindung zwischen HHR23A mit HRS konnte nicht nachgewiesen werden, was andeuten könnte, dass CHAP1 spezifisch mit HRS interagiert (Abb. 19B). Im Anschluss wurden die Sequenzanforderungen an HRS für die Bindung an CHAP1 ermittelt. Da das isolierte UIM von HRS (AS 258-277) für eine Detektion in der SDS-PAGE mit nur 19 Aminosäuren zu klein ist, wurde ein etwas größerer Bereich von HRS kloniert, der das UIM umfasst (AS 245-297) (Abb. 19A). Diese Mutante wird im folgenden Text als HRS-UIM bezeichnet. HRS-UIM genügte für eine Bindung an CHAP1 (Abb. 19C). CHAP1-Ubl konnte im Gegensatz zu CHAP1 Δ Ubl HRS-UIM präzipitieren (Abb. 19C). Damit konnte demonstriert werden, dass CHAP1-Ubl für die Interaktion mit HRS-UIM ausreichte und notwendig ist: Wie schon für HRS gezeigt, interagierte auch HRS-UIM *in vitro* nicht mit HHR23A (Abb. 19C). Dies

unterstreicht die spezifische Bindung von HRS an CHAP1 *in vitro*. Um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Kopräzipitationen auch in anderer Richtung mit *in vitro* translatiertem CHAP1 und CHAP1-Deletionsmutanten durchgeführt. Dabei konnte jedoch keine Interaktion zwischen CHAP1 und CHAP1-Ubl mit GST-HRS oder GST-HRS-UIM gezeigt werden (nicht gezeigt). Warum die Ergebnisse in dieser Richtung nicht reproduziert werden konnten, blieb unklar. Möglicherweise lagen bakteriell exprimiertes GST-HRS und GST-HRS-UIM nicht in einer korrekten Faltung vor.

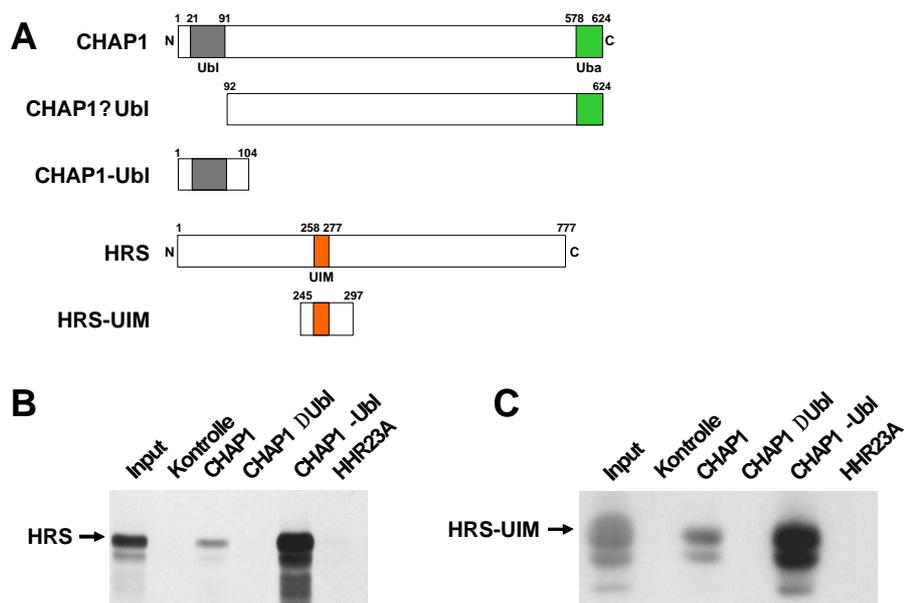


Abb. 19: CHAP1 interagiert über seine Ubl-Domäne spezifisch mit dem UIM von HRS. (A) Übersicht über CHAP1 und die eingesetzten CHAP1-Deletionsmutanten sowie über HRS und HRS-UIM. (B) Kopräzipitationsexperimente erfolgten mit den GST-Fusionsproteinen CHAP1, CHAP1 Δ Ubl, CHAP1-Ubl, HHR23A bzw. GST (Kontrolle) und *in vitro* translatiertem, [35 S]-markiertem HRS-UIM, wie angegeben. Die Präzipitationsansätze wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten kopräzipitierten Proteine fluorographisch sichtbar gemacht. (C) Die unter (B) angegebenen Proteine wurden mit *in vitro* translatiertem, [35 S]-markiertem HRS-UIM inkubiert und präzipitiert. Die Auftrennung erfolgte in einer 15 % SDS-PAGE. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten *in vitro*-Translatats.

3.3.1.2 Charakterisierung der Bindung von Ataxin-3 an HHR23A

Die Charakterisierung der Interaktion zwischen dem UIM-Protein Ataxin-3 und HHR23A wurde mit der Isoform 1c von Ataxin-3, im Folgenden kurz als Ataxin-3 bezeichnet, durchgeführt (Goto *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1998). Drei der mindestens sechs bekannten Isoformen von Ataxin-3 unterscheiden sich in ihren extremen C-Termini (Schmidt *et al.*, 1998). Isoform 1c verfügt im Gegensatz zu den anderen beiden Formen, die nur zwei aufeinanderfolgende UIMs tragen, über ein weiteres UIM am extremen C-Terminus (Abb. 20A). In Kopräzipitationsexperimenten mit *in vitro* translatiertem Ataxin-3 band ein Großteil

des eingesetzten Ataxin-3-Translatats an GST-HHR23A (Abb. 20B). GST-HHR23A Δ Ubl konnte Ataxin-3 nicht präzipitieren (Abb. 20B). GST-HHR23A-Ubl interagiert mit Ataxin-3 (Abb. 20B). Damit konnte die schon von Wang *et al.* (2000) gezeigte Bindung von HHR23A über seine Ubl-Domäne an Ataxin-3 bestätigt werden. Die Effizienz der Bindung von Ataxin-3 an GST-HHR23A-Ubl war höher als die an HHR23A. Ein ähnlicher Effekt war schon für die Interaktion zwischen CHAP1-Ubl und HRS beobachtet worden (vgl. Abb. 19B). *In vitro* translatiertes Ataxin-3 interagiert in Kopräzipitationsassays auch mit CHAP1 (Abb. 20B). Obwohl die Bindung von Ataxin-3 an CHAP1 grundsätzlich schwächer war als an HHR23A, könnte dieses Ergebnis darauf hinweisen, dass neben HHR23A auch CHAP1 ein potentieller Interaktionspartner von Ataxin-3 *in vivo* ist.

Als nächstes wurde überprüft, ob die UIMs von Ataxin-3 für die Interaktion mit HHR23A notwendig sind. Da Wang *et al.* (2000) in ihren Experimenten mit einer Isoform von Ataxin-3 gearbeitet haben, der das UIM am C-Terminus fehlt, wurde geschlossen, dass das dritte UIM für die Bindung an HHR23A nicht gebraucht wird. Um zu testen, ob die beiden aufeinanderfolgenden UIMs (AS 224-263) von Ataxin-3 für die Bindung benötigt werden, wurde eine Ataxin-3-Deletionsmutante kloniert, die die beiden UIMs mit kurzen N- und C-terminalen Verlängerungen umfasst (AS 212-275, Abb. 20A). Diese Mutante wird als 2xUIM von Ataxin-3 (Ataxin-3 2xUIM) bezeichnet. In Bindungsassays wurde *in vitro* translatiertes Ataxin-3 2xUIM mit GST-HHR23A gefällt (Abb. 20C). Ataxin-3 2xUIM genügt damit für eine Bindung an HHR23A. GST-HHR23A Δ Ubl präzipitierte Ataxin-3 2xUIM im Gegensatz zu GST-HHR23A-Ubl nicht (Abb. 20C). Damit wurde deutlich, dass neben den Interaktionen zwischen den HHR23-Proteinen und S5a (Hiyama *et al.*, 1999) sowie CHAP1 und HRS (vgl. 3.4.1.1) auch die Bindung zwischen Ataxin-3 und HHR23A, zumindest *in vitro*, über UIMs und Ubl-Domänen vermittelt wird. Dies lässt vermuten, dass UIMs allgemein Bindemotive für Ubl-Domänen darstellen.

Nur HHR23A, nicht aber CHAP1, interagiert mit Ataxin-3 2xUIM (Abb. 20C). Weiterhin wechselwirkte eine Deletionsmutante von Ataxin-3, der das C-terminale UIM fehlte, nicht mit CHAP1 (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass für die Interaktion von CHAP1 mit Ataxin-3 das C-terminale UIM von Ataxin-3 notwendig ist. Es ist damit denkbar, dass Proteine über verschiedene UIMs mit unterschiedlichen Ubl-Proteinen interagieren können.

Die Ergebnisse der durchgeführten Kopräzipitationen sollten auch in umgekehrter Richtung, d. h. mit *in vitro* translatiertem HHR23A, HHR23A-Deletionsmutatanten bzw. CHAP1 und GST-Ataxin-3-Fusionsprotein bestätigt werden. In diesen Experimenten war allerdings nur der Nachweis der Bindung von HHR23A und HHR23A-Ubl an Ataxin-3 2xUIM möglich (Abb. 20D). Eine Interaktion von HHR23A oder HHR23A-Ubl sowie CHAP1 mit GST-Ataxin-3 konnte nicht gezeigt werden. Dies könnte möglicherweise auf eine nicht vollständig korrekte Faltung des rekombinanten GST-Fusionsproteins Ataxin-3 zurückgeführt werden.

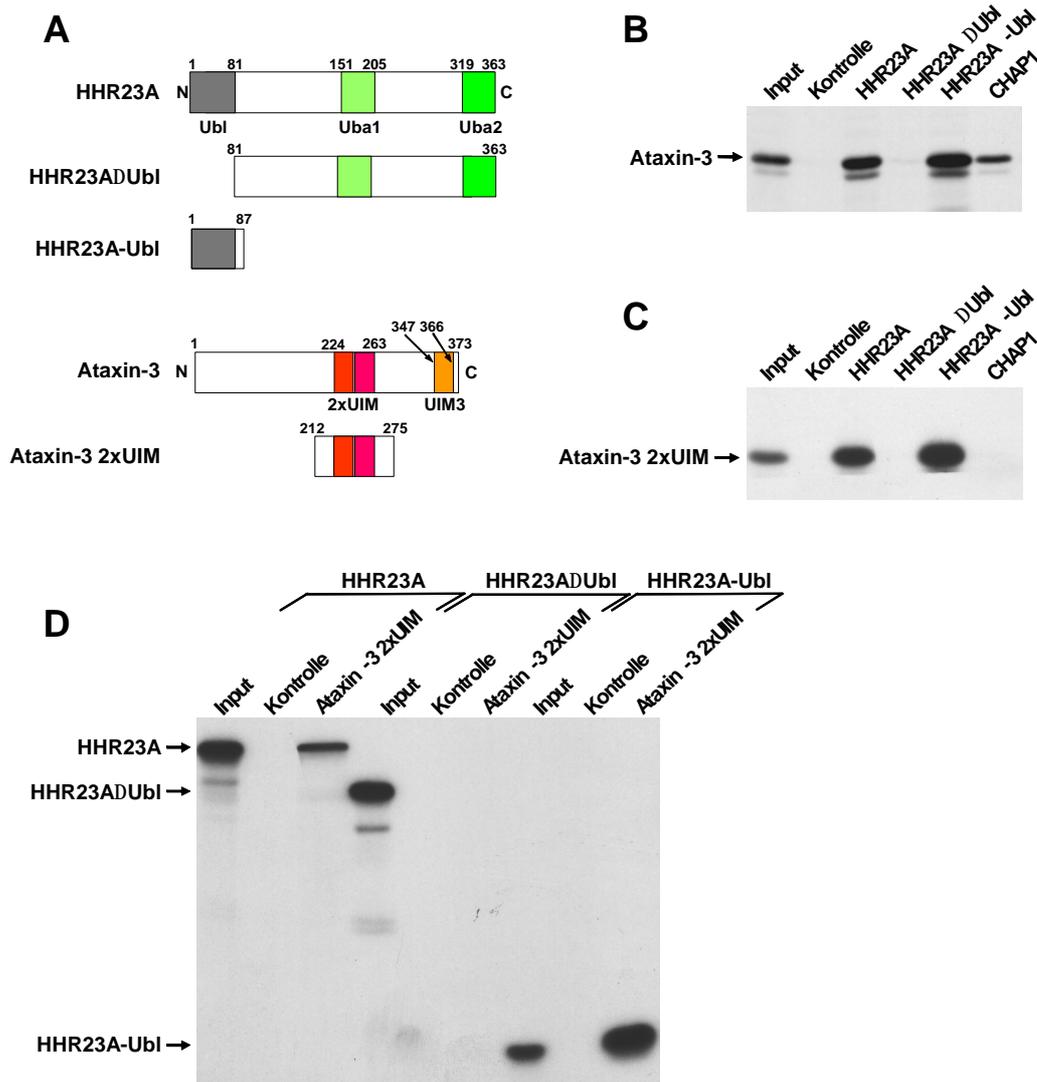


Abb. 20: HHR23A interagiert *in vitro* über seine Ubl-Domäne mit Ataxin-3 2xUIM. (A) Schematische Übersicht über HHR23A und die eingesetzten HHR23A-Deletionsmutanten sowie über Ataxin-3 und Ataxin-3 2xUIM. (B) Die GST-Fusionsproteine HHR23A, HHR23AΔUbl, HHR23A-Ubl, CHAP1 bzw. GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Ataxin-3 4 h inkubiert und dann präzipitiert (vgl. 2.2.9), wie angegeben. Die Ansätze wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und die kopräzipitierten radioaktiv markierten Proteine fluorographisch sichtbar gemacht. (C) Kopräzipitationsexperimente erfolgten analog zu (B) mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Ataxin-3 2xUIM und den unter (B) angegebenen GST-Fusionsproteinen. Die Auftrennung erfolgte in einer 15 % SDS-PAGE. (D) GST-Ataxin-3 2xUIM bzw. GST (Kontrolle) wurde mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem HHR23A, HHR23AΔUbl und HHR23A-Ubl wie in (B) inkubiert und präzipitiert. Die Auftrennung erfolgte in einer 14 % SDS-PAGE. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten Translatats.

3.3.2 Bindung von UIM-Proteinen an Ubiquitin *in vitro*

Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei den UIMs verschiedener Proteine um generelle Ubiquitin-bindende Motive handelt (Hofmann und Falquet, 2001; vgl. 1.7.4). Bis vor kurzem war aber nur die Bindung von Ubiquitin an die beiden UIMs von S5a experimentell nachgewiesen worden (Young *et al.*, 1998). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob HRS und Ataxin-3 über ihre UIMs ausschließlich mit zugeordneten Ubl-Domänen wechselwirken oder ob auch eine Interaktion mit Ubiquitin und/oder Ubiquitin-ähnlichen Proteinen vom Typ I (vgl. 1.7.1) möglich ist. Um diese Frage beantworten zu können, wurden GST-Bindungsassays mit *in vitro* translatiertem HRS, Ataxin-3 sowie S5a und GST-Ubiquitin, GST-SUMO bzw. GST-Nedd8 durchgeführt (Abb. 21A, B). Alle drei getesteten Proteine banden an Ubiquitin, nicht jedoch an SUMO oder Nedd8 (Abb. 21B). Dieses Ergebnis weist auf die Richtigkeit der Vermutung hin, dass UIMs allgemein Ubiquitin-interagierende Motiven sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass UIMs keine Interaktionsmotive für die in ihrer Struktur Ubiquitin sehr ähnlichen Proteine SUMO und Nedd8 sind. Am Beispiel von HRS, das im Gegensatz zu HRS und S5a nur über ein UIM verfügt, wurde deutlich, dass das gleiche UIM sowohl an Ubiquitin als auch an eine zugeordnete Ubl-Domäne binden kann.

Für S5a ist eine Bindung an polyubiquitinierte Proteine über seine UIMs beschrieben (Young *et al.*, 1998). Um zu erfahren, ob auch Ataxin-3 und HRS über ihre UIMs an polyubiquitinierte Proteine binden können, wurden Kopräzipitationsexperimente mit polyubiquitiniertem E6-AP auf der einen und Ataxin-3, HRS bzw. den oben beschriebenen Mutanten Ataxin-3 2xUIM und HRS-UIM auf der anderen Seite durchgeführt. Die Versuchsanordnung entsprach der des Nachweises der Bindung von polyubiquitiniertem E6-AP an die Uba-Domänen von HHR23A und CHAP1 (vgl. 3.2.6). Sowohl Ataxin-3 als auch HRS konnten polyubiquitiniertes E6-AP präzipitieren (Abb. 21C, D). Für Ataxin-3 wurde weiterhin die Bindung auch an polyubiquitiniertes p53 gezeigt (Abb. 21E) und damit eine spezifische Interaktion mit polyubiquitiniertem E6-AP ausgeschlossen. Für die Bindung reichten die verschiedenen Deletionsmutanten (Ataxin-3 2xUIM, HRS-UIM) aus (Abb. 21C, D, E), was vermuten lässt, dass die Interaktionen über UIMs vermittelt wurden. Nicht-ubiquitiniertes E6-AP bzw. p53 band nicht an HRS bzw. Ataxin-3 (Abb. 21C, D, E).

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass die Proteine HRS und Ataxin-3 über ihre UIMs nicht nur mit Ubl-Domänen ihrer zugeordneten Bindungspartner interagieren können, sondern auch mit Ubiquitin und polyubiquitinierten Proteinen. Diese Ergebnisse

verdeutlichen, dass UIMs, zumindest *in vitro*, sowohl Interaktionsmotive für Ubiquitin als auch für Ubl-Domänen sind.

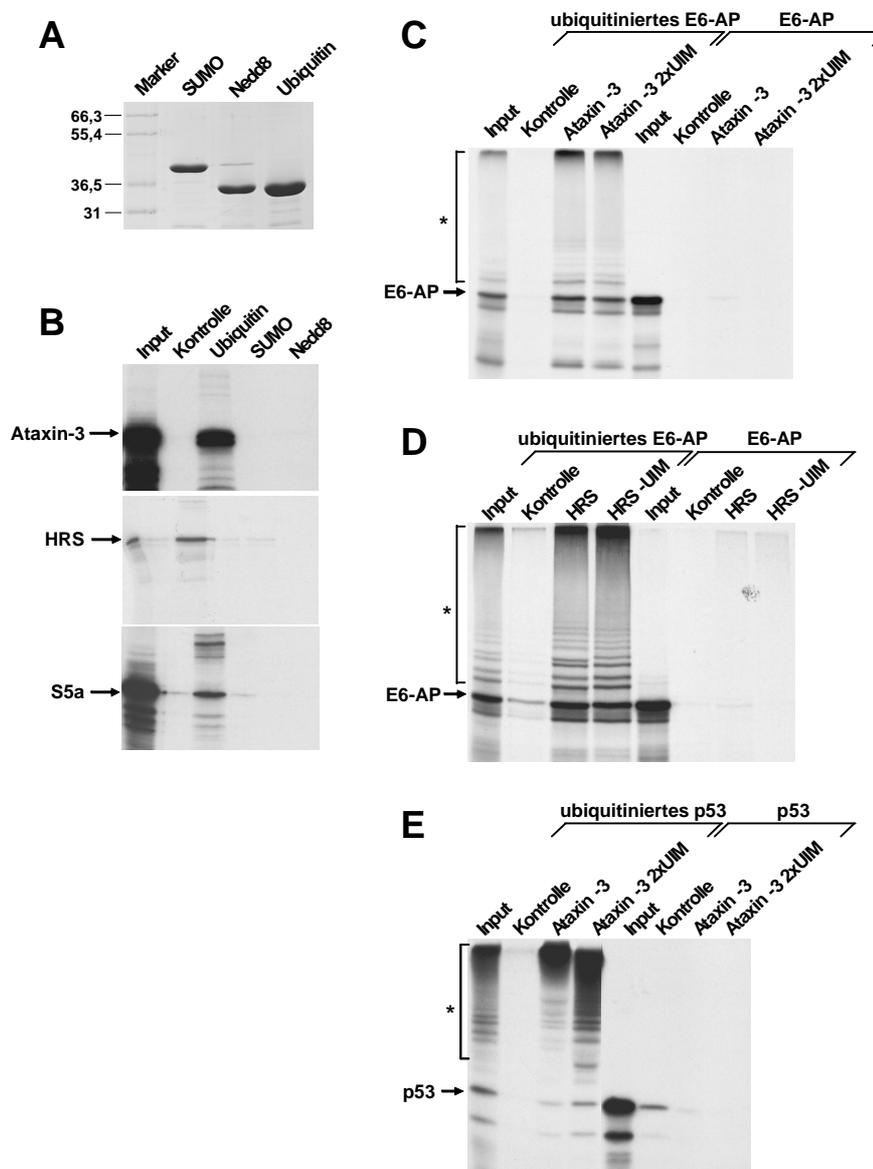


Abb. 21: HRS und Ataxin-3 binden über ihre UIMs an Ubiquitin und ubiquitinierte Proteine, nicht jedoch an SUMO und Nedd8. (A) Über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigtes, in *E. coli* exprimiertes GST-SUMO, GST-Nedd8 und GST-Ubiquitin wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. (B) Die GST-Fusionsproteine Ubiquitin, SUMO und Nedd8 bzw. GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Ataxin-3, HRS oder S5a 4 h inkubiert und dann präzipitiert (vgl. 2.2.9). Die Ansätze wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten kopräzipitierten Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht. (C) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes E6-AP wurde autoubiquitiniert (vgl. 2.2.10) und dann mit GST-Ataxin-3, GST-Ataxin-3 2xUIM bzw. GST (Kontrolle) inkubiert. Nach 4 h wurden die GST-Fusionsproteine mit GSH-Sepharose präzipitiert, wie in (B). Kontrollansätze erfolgten mit nicht-ubiquitiniertem E6-AP. (D) Analog zu (C) wurden Kopräzipitationsexperimente mit GST-HRS, GST-HRS-UIM und GST (Kontrolle) durchgeführt. (E) *In vitro* translatiertes [³⁵S]-markiertes p53 wurde unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) E6/E6-AP-abhängig polyubiquitiniert. Die Ubiquitinierungsansätze wurden dann analog zu (C) inkubiert und präzipitiert. *, ubiquitiniertes E6-AP (C, D) bzw. p53 (E). Input, 20 % der in der Präzipitation eingesetzten Ubiquitinierungsreaktion bzw. des eingesetzten *in vitro*-Translatats.

3.3.3 Einfluss des UIM-Proteins Ataxin-3 auf die Ubiquitinierung und den Abbau von p53 *in vitro*

Der Nachweis der Bindung von Ubiquitin und polyubiquitinierten Proteinen an UIM-Proteine führte zu der Frage, ob diese vielleicht ähnlich wie HHR23A einen Einfluss auf den Abbau von Proteinen haben könnten. Dies wurde *in vitro* am Beispiel der Auswirkung von rekombinantem Ataxin-3 auf den Abbau von p53 überprüft. Steigende Mengen an Ataxin-3 führten im Vergleich zu HHR23A nur zu einer sehr schwachen Hemmung des Abbaus von p53 (Abb. 22A). Um festzustellen, ob diese Abbauehemmung möglicherweise auf eine Inhibition der Ubiquitinierung von p53 durch Ataxin-3 zurückzuführen ist, wurden p53-Ubiquitinierungsassays in Anwesenheit von steigenden Mengen Ataxin-3 durchgeführt. Ataxin-3 führte konzentrationsabhängig zu einer schwachen Abnahme der Ubiquitinierung von p53, die die leichte Hemmung des p53-Abbaus in Gegenwart von Ataxin-3 *in vitro* erklären könnte (Abb. 22B). Dies weist daraufhin, dass Ataxin-3 keine mit HHR23A vergleichbare Wirkung auf den p53-Abbau hat.

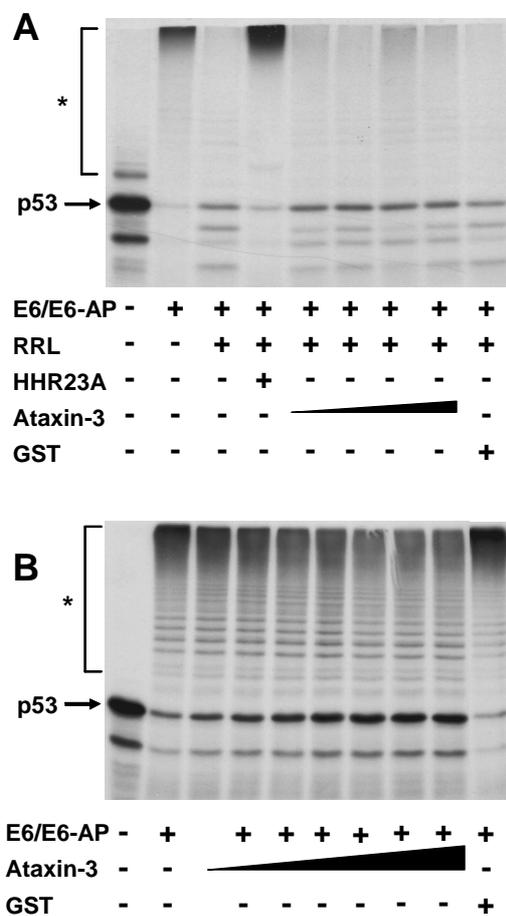


Abb. 22: Einfluss von Ataxin-3 auf den Abbau und die Ubiquitinierung von p53 *in vitro*. (A) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde E6/E6-AP-abhängig unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) ubiquitiniert. Nach 1 h wurde die Ubiquitinierungsreaktion abgestoppt und aufgeköcht bzw. durch Zugabe von RRL in An- und Abwesenheit von GST-HHR23A (Kontrolle), GST (Kontrolle) und ansteigenden GST-Ataxin-3-Konzentrationen Degradationsbedingungen ausgesetzt, wie angegeben. Nach 2 h wurden die Ansätze abgestoppt, in 10 % SDS-PAGEs aufgetrennt und radioaktiv markiertes p53 fluorographisch sichtbar gemacht. (B) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes p53 wurde HPV16-E6/E6-AP abhängig in An- und Abwesenheit von ansteigenden Mengen an GST-Ataxin-3 bzw. GST (Kontrolle) 1 h ubiquitiniert und analysiert, wie in (A) beschrieben. *, ubiquitiniertes p53.

3.3.4 UIM-Proteine als Ubiquitinierungssubstrate

3.3.4.1 Ubiquitinierung von UIM-Proteinen durch E6-AP *in vitro*

E6-AP interagiert in Kopräzipitationsexperimenten nicht mit den UIM-Proteinen HRS, Ataxin-3 oder S5a (vgl. Abb. 21C, D; nicht gezeigt). Bei gleichzeitiger Bindung von Ataxin-3 und E6-AP an HHR23A ist jedoch die Bildung eines ternären Komplexes vorstellbar. Dieser könnte durch die Vermittlung räumlicher Nähe zwischen E6-AP und Ataxin-3 die Ubiquitinierung des UIM-Proteins durch E6-AP ermöglichen. Analog ist die Ubiquitinierung von HRS oder S5a durch E6-AP in Anwesenheit von CHAP1 bzw. HHR23A denkbar. Aufgrund dieser Überlegungen wurde mit den UIM-Proteinen HRS und Ataxin-3 *in vitro* getestet, ob sie in Gegenwart von CHAP1 bzw. HHR23A Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP sind. Dazu wurden Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem HRS bzw. Ataxin-3 und rekombinantem E1, UbcH5, UbcH7 und E6-AP in An- und Abwesenheit von bakteriell exprimiertem GST-CHAP1 bzw. GST-HHR23A durchgeführt. Wie in Abb. 23 gezeigt, wurden Ataxin-3 und HRS *in vitro* in Gegenwart von UbcH5 und UbcH7 bereits in Abwesenheit von rekombinantem E6-AP ubiquitiniert (Abb. 23A, B). Durch die Zugabe von E6-AP wurden die Ubiquitinierungen aber verstärkt (Abb. 23A, B). Das Laufverhalten von ubiquitiniertem HRS und Ataxin-3 in der SDS-PAGE weist darauf hin, dass die beiden Proteine *in vitro* oligoubiquitiniert werden (vgl. 3.2.3.2). Tatsächlich war *in vitro* kein proteasomaler Abbau dieser Proteine möglich (nicht gezeigt). Für die Oligoubiquitinierung war der Zusatz von rekombinantem CHAP1 bzw. HHR23A nicht notwendig (Abb. 23A, B). Im Fall von HHR23A kam es sogar zu einer Hemmung der Oligoubiquitinierung von Ataxin-3 (Abb. 23A), die wahrscheinlich auf dem schon beschriebenen inhibitorischen Effekt von HHR23A auf Oligoubiquitinierungen beruht (vgl. 3.2.3.2). Rekombinantes CHAP1 hatte nur einen sehr schwachen negativen Einfluss auf die Ubiquitinierung von HRS in Gegenwart von E6-AP (Abb. 23B).

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Zugabe von rekombinantem E6-AP für die Ubiquitinierung von Ataxin-3 und HRS nicht notwendig war, stellte sich die Frage, ob die beiden UIM-Proteine auch allein durch E1 und die E2-Enzyme UbcH5 und UbcH7, also E6-AP-unabhängig, ubiquitiniert werden können. Diese Frage konnte anhand des *in vitro*-Ubiquitinierungsassays nicht beantwortet werden, weil das für die *in vitro*-Translationen benutzte RRL geringe Mengen des Kaninchen-Homologs von E6-AP enthält (Scheffner *et al.*, 1993). Es wurden deshalb Ubiquitinierungsassays (vgl. 2.2.10) mit ausschließlich in *E. coli* exprimierten Proteinen (GST-Ataxin-3, GST-HRS, E1, UbcH5 und UbcH7) durchgeführt. (*E.*

coli verfügt über kein Ubiquitin-System, vgl. 1.1). Zusätzlich wurde getestet, ob es sich neben Ataxin-3 und HRS auch bei S5a um ein Ubiquitinierungssubstrat handelt. Ataxin-3, HRS und auch S5a wurden in diesen Experimenten in Gegenwart von E1, UbcH5 und UbcH7 nicht ubiquitiniert (Abb. 23C, D, E). Erst der Zusatz von rekombinantem E6-AP führte zu einer Ubiquitinierung der drei UIM-Proteine (Abb. 23C, D, E). Damit konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitinierungen der drei UIM-Proteine Ataxin-3, HRS und S5a nicht allein durch E1 und E2s vermittelt werden können.

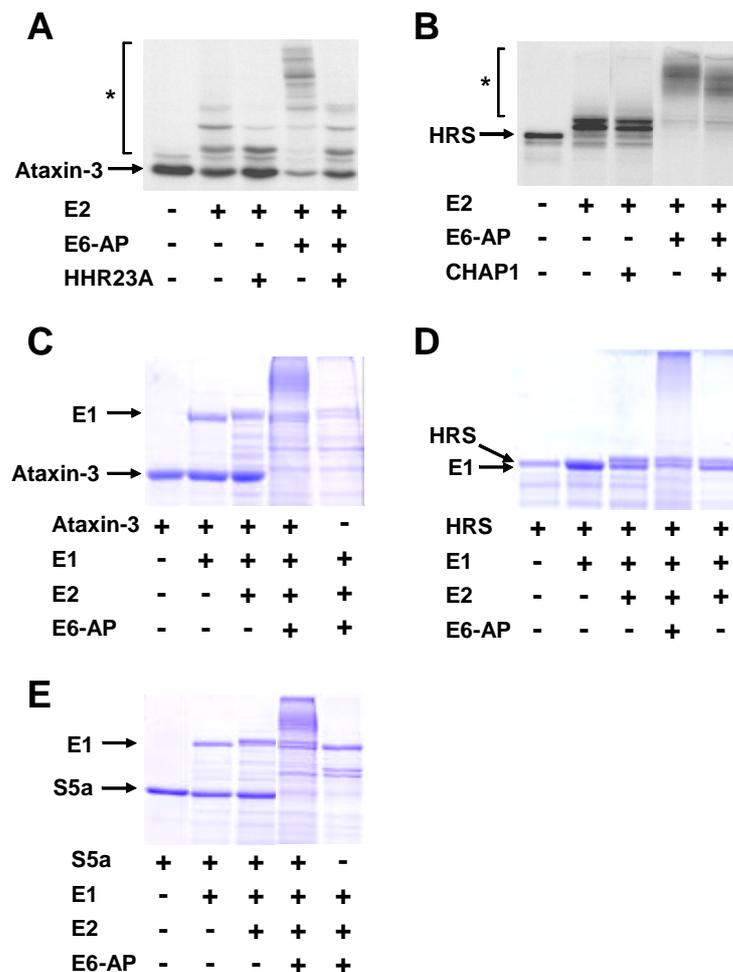


Abb. 23: Ataxin-3, HRS und S5a sind Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP *in vitro*. (A) Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Ataxin-3 wurden in An- und Abwesenheit von in Insektenzellen exprimiertem E6-AP, bakteriell exprimiertem GST-HHR23A und E2 (UbcH5 und UbcH7), wie angezeigt, unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Ubiquitinierungsansätze wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und Ataxin-3 durch Fluorographie sichtbar gemacht. (B) Ubiquitinierungsassays und Analysen mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem HRS erfolgten analog zur Beschreibung in (A). Dabei wurde GST-HHR23A durch GST-CHAP1 ersetzt. (C) GST-Ataxin-3 wurde in *E. coli* exprimiert und über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Ubiquitinierungsassays mit GST-Ataxin-3 erfolgten unter Standardbedingungen in An- und Abwesenheit von in *E. coli* exprimiertem E1, E2 (UbcH5 und UbcH7) und in Insektenzellen exprimiertem E6-AP. Die Ubiquitinierungsansätze wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. (D) Ubiquitinierungsassays und Analyse erfolgten analog zu (C) mit GST-HRS. Die Auftrennung der Proteine der Ubiquitinierungsansätze erfolgte in einer 8 % SDS-PAGE. (E) GST-S5a wurde wie unter (C) beschrieben ubiquitiniert und analysiert. *, ubiquitiniertes Ataxin-3 bzw. HRS.

Mit den drei UIM-Proteinen S5a, Ataxin-3 und HRS konnten somit drei neue, bisher unbekannte Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP *in vitro* identifiziert werden. Ob für die Ubiquitinierungen CHAP1 bzw. HHR23A benötigt werden, bleibt an diesem Punkt unklar. Obwohl den Ubiquitinierungsreaktionen weder CHAP1 noch HHR23A zugesetzt werden mussten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass schon ausreichende Mengen der potentiellen Vermittlerproteine in den Ansätzen vorhanden sind. Es ist denkbar, dass sowohl im RRL als auch in der nur teilweise aufgereinigten Präparation von E6-AP aus Insektenzellen genügend HHR23A und CHAP1 bzw. Homologe dieser Proteine vorliegen. Der beobachtete inhibierende Effekt von HHR23A auf die Oligoubiquitinierung könnte auf eine zu hohe Konzentration des Ubl/Uba-Proteins zurückzuführen sein (vgl. 3.2.3).

3.3.4.2 Ubiquitinierung von UIM-Proteinen durch verschiedene E3-Ligasen *in vitro*

Im Folgenden wurde überprüft, ob es sich bei HRS, Ataxin-3 und S5a um spezifische Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP handelt. Dazu wurden Ubiquitinierungsexperimente mit *in vitro* translatiertem Ataxin-3, HRS, S5a und drei verschiedenen E3-Ligasen, der *S. cerevisiae*-HECT-Ligase Rsp5, der RING-Finger-Ligase Hdm2 und E6-AP durchgeführt (Abb. 24). Dabei ist erneut zu beachten, dass in Ansätzen mit *in vitro*-Translataten Ubiquitinierung bereits in Abwesenheit eines rekombinanten E3-Enzyms möglich ist (vgl. 3.3.4.1). Hdm2 und Rsp5 konnten E6-AP in seiner Funktion als E3 ersetzen. In allen Fällen kam es durch Zugabe der rekombinanten E3-Enzyme zu einer verstärkten Oligoubiquitinierung der UIM-Proteine (Abb. 24), was auf ihre Erkennung als Ubiquitinierungssubstrate von allen getesteten E3-Enzymen hinweist. Die Differenzen in den Ubiquitinierungseffizienzen, die beobachtet wurden, sind möglicherweise auf präparationsbedingte Unterschiede in den Aktivitäten der rekombinanten E3s zurückzuführen (Abb. 24). HRS, Ataxin-3 und S5a sind damit keine ausschließlichen Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse an, dass es sich bei Proteinen mit UIMs zumindest *in vitro* um allgemeine Ubiquitinierungssubstrate handelt, die von verschiedenen E3s ubiquitiniert werden. Wie die verschiedenen Ubiquitinierungen vermittelt werden können, bleibt unklar. Für Rsp5 und Hdm2 konnten in Kopräzipitationsassays genauso wie für E6-AP keine stabilen Interaktionen mit den untersuchten UIM-Proteinen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Weder für Rsp5 noch für Hdm2 konnten Hinweise auf eine durch Ubl/Uba-Proteine vermittelte räumliche Annäherung zwischen E3 und UIM-Protein erhalten werden, die eine Ubiquitinierung erklären könnte.

Sowohl Rsp5 als auch Hdm2 interagierten weder mit HHR23A noch mit CHAP1 in Kopräzitationsanalysen (nicht gezeigt).

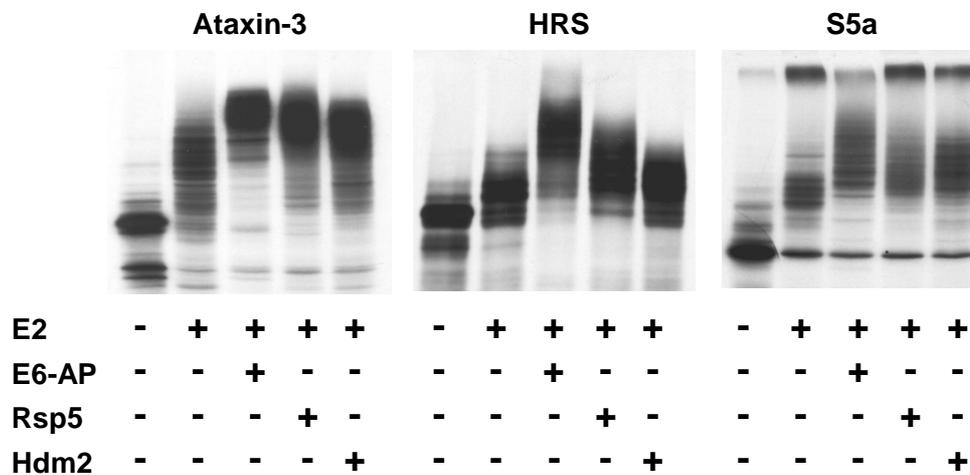


Abb. 24: Die UIM-Proteine Ataxin-3, HRS und S5a werden *in vitro* von verschiedenen E3-Enzymen als Ubiquitinierungssubstrate erkannt und ubiquitiniert. Ubiquitinierungsexperimente wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S] markiertem Ataxin-3, HRS bzw. S5a in Gegenwart von rekombinantem E1, UbcH5 und UbcH7 in An- und Abwesenheit von bakteriell exprimiertem GST-Hdm2 oder in Insektenzellen exprimiertem E6-AP bzw. Rsp5 durchgeführt, wie angegeben. Die Ubiquitinierungsansätze wurden in einer 10 % (Ataxin-3, S5a) bzw. einer 8 % SDS-PAGE (HRS) aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht.

3.3.4.3 UIMs als Ubiquitinierungssignale

Im Anschluss wurde am Beispiel von Ataxin-3 untersucht, welche Rolle die UIMs bei den zuvor *in vitro* beobachteten Ubiquitinierungen spielen. Dazu wurde an einem Ataxin-3-Fragment, welches die beiden zentralen UIMs umfasst, überprüft, ob es noch als Ubiquitinierungssubstrat von verschiedenen E3s erkannt wird. Für diese Experimente konnte nicht auf das in den Kopräzitationsexperimenten benutzte Konstrukt Ataxin-3 2xUIM (vgl. 3.3.1.2, Abb. 20A) zurückgegriffen werden. Ataxin-3 2xUIM verfügt nicht über Lysinreste. Aus diesem Grund wurde ein größeres, die beiden aufeinanderfolgenden UIMs und insgesamt fünf Lysinreste einschließendes Ataxin-3 Fragment kloniert: Ataxin-3 180-291 (Abb. 25A). Ataxin-3 180-291 wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert und unter Ubiquitinierungsbedingungen (vgl. 2.2.10) mit rekombinantem E6-AP oder Hdm2 als E3s inkubiert. Sowohl in Anwesenheit von Hdm2 als auch von E6-AP wurde Ataxin-3 180-291 oligoubiquitiniert (Abb. 25B, C). Abnehmende Mengen an E6-AP führten zu einer Reduktion der Ubiquitinierung; es wurden weniger Ubiquitinmoleküle kovalent an Ataxin-3-180-291 gekoppelt (Abb. 25B). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle der UIMs für die Oligoubiquitinierung von Ataxin-3 hin. Zusätzlich konnte durch die Oligoubiquitinierung von

GST-Ataxin-3 180-291 mit Hdm2 eindeutig gezeigt werden, dass für diese Ubiquitinierung kein Ubl/Uba-Protein als Vermittler benötigt wird: Die Ubiquitinierung von Ataxin-3 durch Hdm2 erfolgte ausschließlich mit bakteriell in *E. coli* exprimierten Proteinen. *E. coli* verfügt nicht über Ubl/Uba-Proteine (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Damit kann vermutlich auch für die Ubiquitinierungen von HRS, Ataxin-3 und S5a *in vitro* eine Beteiligung von Ubl/Uba-Proteinen ausgeschlossen werden.

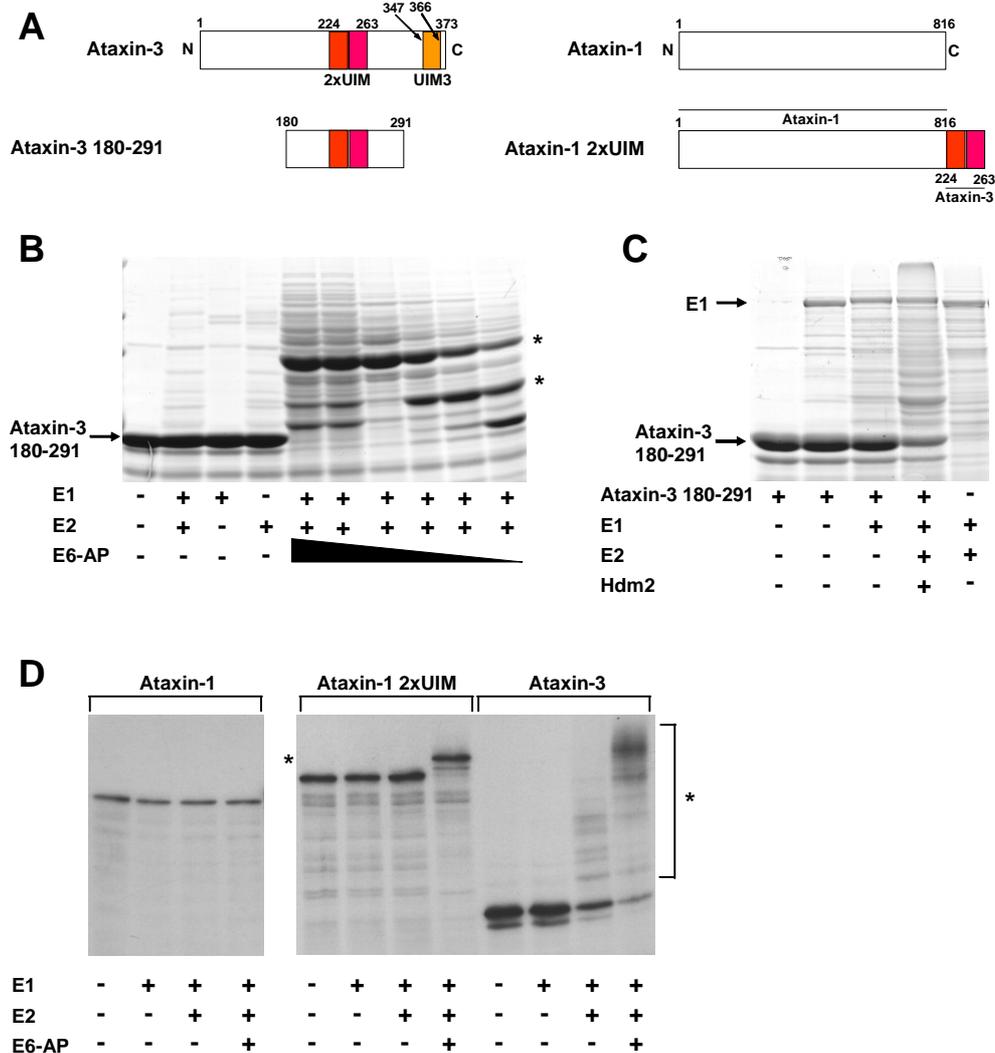


Abb. 25: UIMs sind Ubiquitinierungssignale. (A) Schematische Übersicht über Ataxin-3 und Ataxin-1 sowie die verwendeten Mutanten. (B) Ataxin-3 180-291 wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der Ubiquitinierungsassay wurde in An- und Abwesenheit von E1, E2 (UbcH5 und H7) mit abnehmenden Mengen an in Insektenzellen exprimiertem E6-AP durchgeführt. Die Ubiquitinierungsansätze wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (C) Ubiquitinierungsassays mit GST-Ataxin-3 180-291 erfolgten unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) in An- und Abwesenheit von E1, E2 (UbcH5) und GST-Hdm2, wie angegeben. Die Analyse wurde, wie in (B) beschrieben, durchgeführt. (D) Ubiquitinierungsassays erfolgten mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Ataxin-1 2xUIM bzw. Ataxin-1 oder Ataxin-3 (Kontrollen) unter Bedingungen wie in (B) beschrieben. Die Ansätze wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht. *, Ubiquitinierte Proteine.

Als nächstes wurde überprüft, ob die Fusion von UIMs an ein Protein, das *in vitro* nicht als Ubiquitinierungssubstrat erkannt wird, zu dessen Ubiquitinierung führen kann. Ataxin-1 wird von E6-AP *in vitro* nicht ubiquitiniert (eigene Beobachtung). Ataxin-1 ist ein Protein unbekannter Funktion, das wie Ataxin-3 eine Polyglutamin-Wiederholung enthält, deren Verlängerung eine neurodegenerative Erkrankung, die spinocerebellare Ataxie 1 auslöst (Orr, 2000). In ihrer sonstigen Aminosäuresequenz weisen Ataxin-1 und Ataxin-3 keine Ähnlichkeiten auf. Es wurde eine Ataxin-1-Mutante kloniert, an deren C-Terminus die zwei aufeinanderfolgenden UIMs (AS 224-263) von Ataxin-3 gekoppelt wurden (Ataxin-1 2xUIM) (Abb. 25A). *In vitro* translatiertes Ataxin-1 2xUIM wurde dann in einem Ubiquitinierungsassay mit E6-AP als E3-Enzym getestet. Als Negativkontrolle wurde Ataxin-1, als Positivkontrolle Ataxin-3 eingesetzt. Die Fusion der zwei zentralen UIMs von Ataxin-3, die keine Lysinreste enthalten, an den C-Terminus von Ataxin-1 reichte für die Erkennung des Proteins durch E6-AP und seine Oligoubiquitinierung aus (Abb. 25D). Nahezu das gesamte eingesetzte Ataxin-1 2xUIM wurde ubiquitiniert. An Ataxin-1 2xUIM wurden im Vergleich zu Ataxin-3 allerdings weniger, nur ein oder zwei Ubiquitinmoleküle, kovalent gekoppelt (Abb. 25D). Ataxin-1 wurde nicht ubiquitiniert (Abb. 25D). Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass UIMs nicht nur Interaktionsmotive für Ubl-Domänen oder Ubiquitin sind (vgl. 3.3.1; 3.3.2.), sondern, zumindest *in vitro*, zusätzlich transferable Ubiquitinierungssignale darstellen können. Die für die Ubiquitinierung notwendigen Lysinreste müssen dabei nicht vom UIM bereitgestellt werden.

3.4 HERC2 als Interaktionspartner von E6-AP

E6-AP interagiert im YTH mit der RCC1b-Domäne des humanen HECT-Proteins HERC2 (vgl. 3.1.2). Die Interaktion von HERC2 mit E6-AP wurde im Folgenden genauer untersucht. Aufgrund seiner Größe von 528 kDa war es nicht möglich, HERC2 rekombinant zu exprimieren. In den unterschiedlichen Experimenten wurden deshalb nur isolierte einzelne Domänen und Fragmente von HERC2 eingesetzt (vgl. Abb. 25A).

3.4.1 Bindung von HERC2 an E6-AP

Zunächst wurde die im YTH beobachtete Interaktion zwischen der RCC1b-Domäne von HERC2 und E6-AP (vgl. 3.1.2) *in vitro* überprüft. Dazu wurden Kopräzipitationsexperimente mit einer *in vitro* translatierten HERC2-Deletionsmutante, die ausschließlich die RCC1b-Domäne (AS 2959-3327) von humanem HERC2 umfasst (hu-HERC2-RCC1b) (Abb. 26A),

und GST-E6-AP durchgeführt. HERC2-RCC1b band *in vitro* sehr effizient an E6-AP (Abb. 26B). Im Anschluss wurde das Ergebnis in umgekehrter Richtung, d. h. mit *in vitro* translatiertem E6-AP und GST-HERC2-RCC1b, bestätigt (Abb. 26C). Damit konnte die im YTH detektierte Wechselwirkung zwischen HERC2 und E6-AP auch *in vitro* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden mit E6-AP-Deletionsmutanten (Abb. 26A) die Sequenzanforderungen an E6-AP für die Bindung an HERC2-RCC1b eingegrenzt. Auch E6-AP^ΔHECT interagiert mit HERC2-RCC1b (Abb. 26C). E6-AP-HECT hingegen band nicht an HERC2-RCC1b (Abb. 26C). Damit konnte gezeigt werden, dass die katalytische HECT-Domäne von E6-AP für dessen Interaktion mit HERC2 *in vitro* nicht notwendig ist.

Um nachzuweisen, dass eine Bindung von HERC2 an E6-AP auch in humanen Zellen prinzipiell möglich ist, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente mit überexprimiertem E6-AP sowie einem die RCC1b-Domäne umfassenden humanen HERC2-Fragment (HERC2 2918-3606) (Abb. 26A) durchgeführt. Humane H1299 Zellen wurden mit für FLAG-E6-AP- und HA-HERC2 2918-3606-kodierenden Expressionsvektoren transient kotransfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeschlossen und das FLAG-markierte E6-AP mithilfe eines monoklonalen, an Protein A-Sepharose gekoppelten Antikörpers gegen FLAG immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte ein Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HA, um an FLAG-E6-AP gebundenes HA-HERC2 2918-3606 nachweisen zu können. Die Immunpräzipitation von FLAG-E6-AP wurde mit einem polyklonalen anti-E6-AP-Antikörper im Westernblot überprüft. Tatsächlich wurde HA-HERC2 2918-3606 mit FLAG-E6-AP koimmunpräzipitiert (Abb. 26D). Kontrollen, bei denen nur eines der beiden Expressionskonstrukte oder der leere HA-Expressionsvektor in die Zellen transfiziert wurden, waren negativ (Abb. 26D). Auch in anderer Richtung gelang der Nachweis der Wechselwirkung zwischen E6-AP und HERC2 2918-3606. FLAG-HERC2 2918-3606 wurde mithilfe des anti-FLAG-Antikörpers präzipitiert. Die Koimmunpräzipitation von HA-E6-AP wurde im angeschlossenen Westernblot gezeigt (Abb. 26E). Diese Ergebnisse deuten an, dass eine Interaktion zwischen HERC2 und E6-AP auch in humanen Zellen möglich ist. Das in jeder Spur sichtbare Signal, das unterhalb des HERC2-Fragments bzw. unterhalb von E6-AP erkennbar ist, kann auf die durch den Sekundärantikörper im Westernblot erkannte schwere Kette (ca. 50 kDa) des anti-FLAG-Antikörpers zurückgeführt werden.

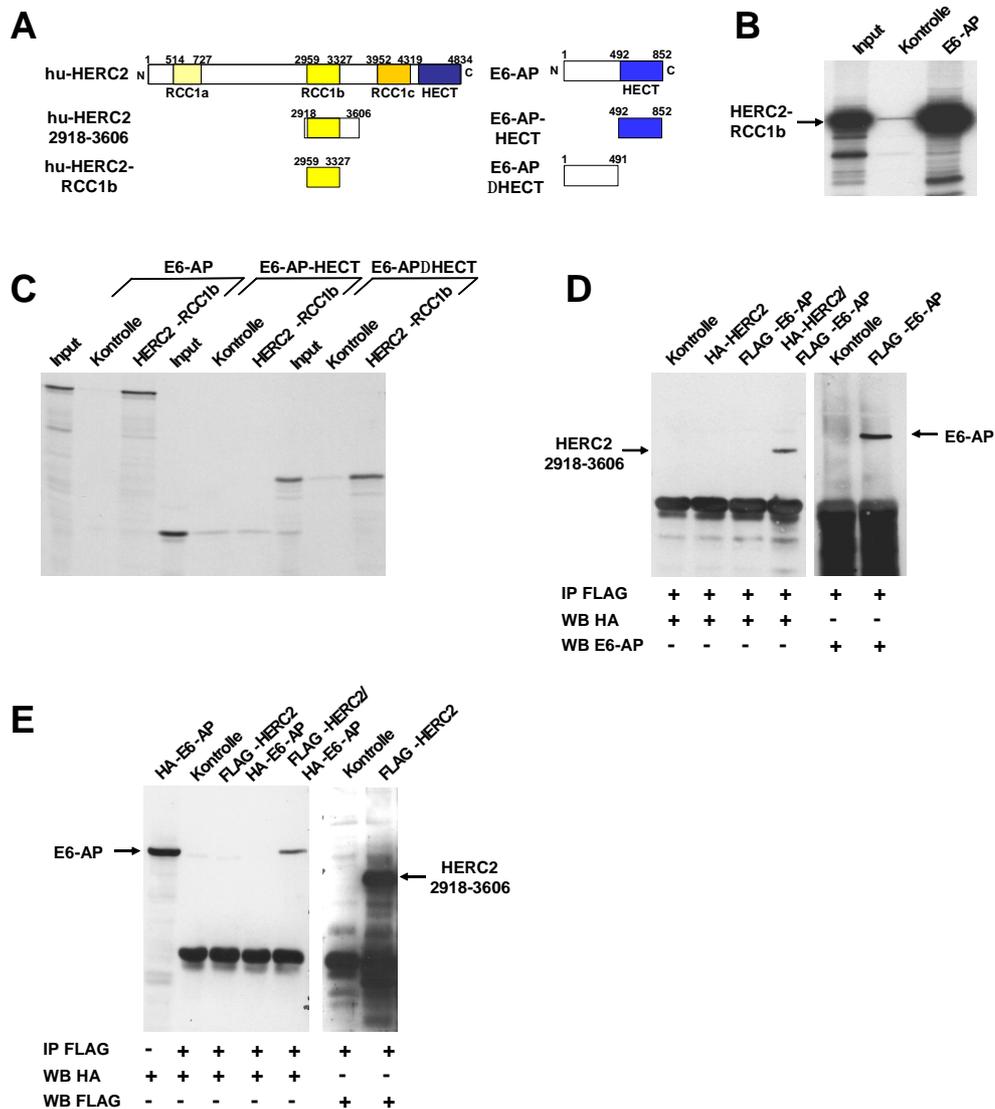


Abb. 26: HERC2 interagiert mit E6-AP über seine RCC1b-Domäne. (A) Schematische Übersicht über humanes HERC2 und E6-AP sowie die eingesetzten Deletionsmutanten. (B) GST-E6-AP bzw. GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem HERC2-RCC1b 4 h inkubiert und dann präzipitiert (vgl. 2.2.9). Die kopräzipitierten radioaktiv markierten Proteine wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. (C) Analog zu (B) wurden GST-RCC1b-HERC2 bzw. GST (Kontrolle) mit *in vitro* translatiertem E6-AP, E6-AP-HECT und E6-APΔHECT inkubiert, präzipitiert und analysiert. (D und E) HA-HERC2 2918-3606 und FLAG-E6-AP (D) bzw. HA-E6-AP und FLAG-HERC2 2918-3606 (E) kodierende Expressionsplasmide wurde in H1299-Zellen transfiziert, wie angegeben. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten sowie nicht transfizierten Zellen (Kontrolle) lysiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper. Die Präzipitate wurden in einer 10 % (D) bzw. 8 % (E) SDS-PAGE aufgetrennt und der angeschlossene Westernblot mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper, einem polyklonalen anti-E6-AP-Antikörper oder einem anti-FLAG-Antikörper dekoriert, wie angegeben. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten *in vitro* Translatats. IP, Immunpräzipitation. WB, Westernblot.

3.4.2 Ubiquitinierung und Abbau von HERC2 *in vitro*

3.4.2.1 Ubiquitinierungen verschiedener HERC2-Fragmente *in vitro*

Nachdem gezeigt worden war, dass E6-AP an die RCC1b-Domäne von HERC2 binden kann (vgl. 3.4.1), wurde überprüft, ob HERC2 ein mögliches Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP

ist. Dazu wurden Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem HERC2 2918-3606 (Abb. 27A) und rekombinantem E1, UbcH5, UbcH7 und E6-AP durchgeführt. HERC2 2918-3606 wurde in diesen Versuchen E6-AP-abhängig ubiquitiniert (Abb. 27B). Die Reaktion benötigte neben rekombinantem E6-AP und Ubiquitin den Zusatz eines der beiden E2-Enzyme UbcH5 oder UbcH7 (Abb. 27B). Das Ubiquitinierungsbild in der SDS-PAGE lässt eine Polyubiquitinierung vermuten, weil hochmolekulare Proteinaggregate am oberen Rand des Trenngels verbleiben. Grundsätzlich wurde nur ein geringer Teil des *in vitro* translatierten HERC2-Fragments ubiquitiniert (vgl. 4.4.2). Trotzdem weisen diese Experimente auf HERC2 als Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP hin.

Analog erfolgten Ubiquitinierungsexperimente mit hu-HERC2-RCC1b (Abb. 27A, C). HERC2-RCC1b wurde im Vergleich zu HERC2 2918-3606 nur sehr schwach in Anwesenheit von rekombinantem E6-AP ubiquitiniert (Abb. 27C). Es wurden nur ein oder zwei Ubiquitinmoleküle an einen geringen Anteil des eingesetzten HERC2-RCC1b gekoppelt (Abb. 27C) (vgl. 4.4.2).

In den beschriebenen Ubiquitinierungsexperimenten wurden humane HERC2-Fragmente eingesetzt, die mittels PCR aus den im YTH isolierten cDNA-Sequenzen kloniert wurden. Humane HERC2-Bereiche, die über die Aminosäuresequenz von HERC2 2918-3606 hinausgingen, konnten nicht kloniert werden, weil die notwendigen menschlichen cDNA-Sequenzen von HERC2 nicht verfügbar waren. Freundlicherweise stellte R. D. Nicholls (University of Pennsylvania, USA) eine vollständige Maus-HERC2-cDNA-Sequenz zur Verfügung. HERC2 der Maus ist in seiner Aminosäuresequenz mit dem humanen HERC2 zu 95 % identisch. Die Ähnlichkeit des menschlichen und des murinen Proteins beträgt 99 % (Ji *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob auch größere Fragmente des HERC2-Proteins Substrate von E6-AP sind, wurde ein Bereich des Maus HERC2 kloniert, der mit der RCC1b-Domäne beginnt und den gesamten C-Terminus einschließt (mu-HERC2 2960-4836) (Abb. 27A). Für die Ubiquitinierung von mu-HERC2 war der Zusatz von rekombinantem E6-AP nicht notwendig (Abb. 27D). Sowohl für das menschliche HERC2 2918-3606 als auch für die isolierte humane HERC2-RCC1b-Domäne konnte nur in zusätzlicher Anwesenheit von rekombinantem E6-AP eine Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Abb. 27B, C). Die E6-AP-unabhängige Ubiquitinierung von mu-HERC2 2960-4836 kann möglicherweise auf eine Autoubiquitinierung dieser Mutante, die als einzige der eingesetzten HERC2-Deletionsmutanten die HECT-Domäne umfasst, zurückgeführt werden. Dieses Ergebnis deutet an, dass es sich bei HERC2 tatsächlich um eine funktionelle HECT-Ligase handelt. Der Zusatz von rekombinantem E6-AP führte zu einer Verstärkung der Ubiquitinierung von

mu-HERC2 2960-4836 (Abb. 27D). Damit konnten weitere Hinweise auf eine E6-AP-abhängige Ubiquitinierung von HERC2 erhalten werden.

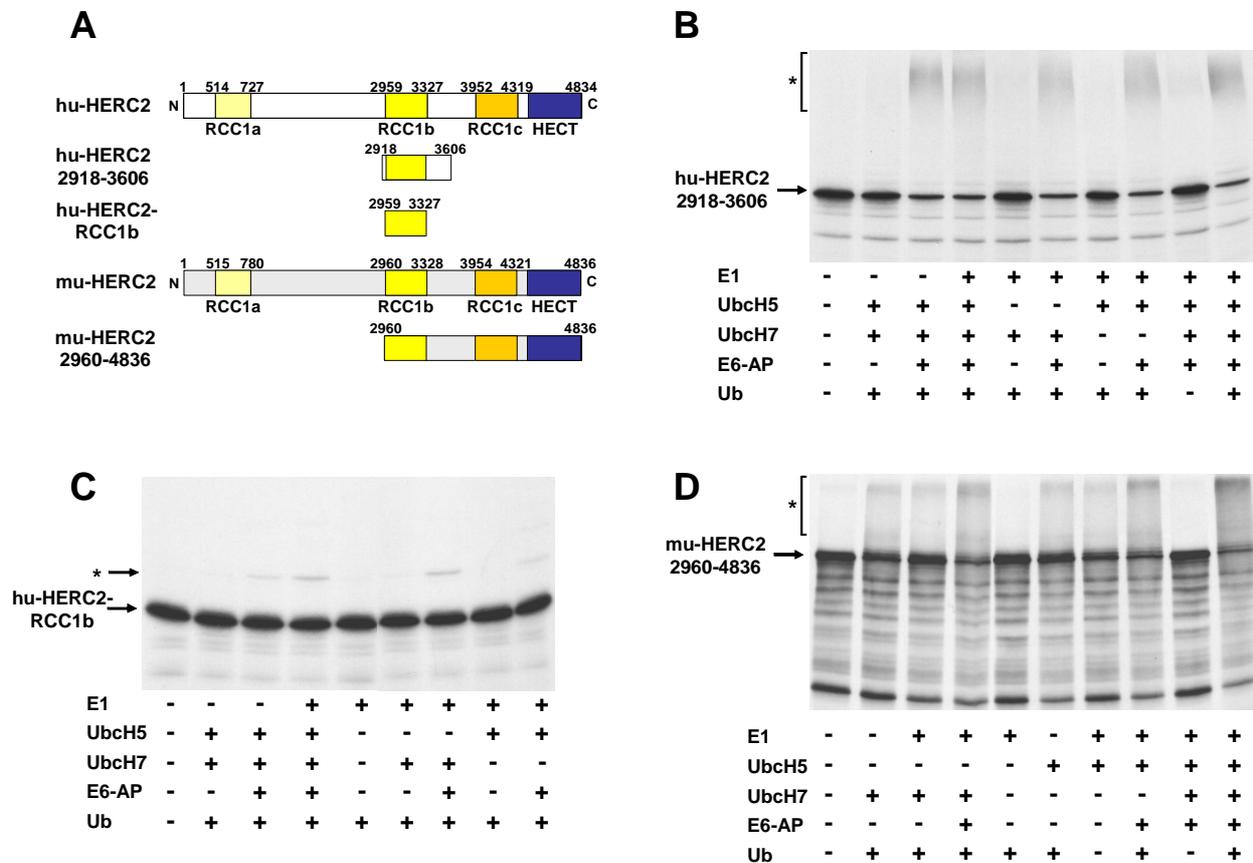


Abb. 27: E6-AP ubiquitiniert HERC2-Deletionsmutanten *in vitro* (A) Schematische Übersicht über humanes und murines HERC2 und die eingesetzten Deletionsmutanten. (B-D) Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem humanem HERC2 2918-3606 (B), humanem HERC2-RCC1b (C) bzw. murinem HERC2 2960-4836 (D) wurden in An- und Abwesenheit von rekombinantem E1, UbcH5, UbcH7, E6-AP sowie Ubiquitin durchgeführt, wie angegeben. Die Ubiquitinierungsansätze wurden in 8 % (B), 10 % (C), 7 % (D) SDS-PAGEs aufgetrennt und die markierten Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht.*, ubiquitinierte HERC2-Deletionsmutanten.

3.4.2.2 Spezifität der E6-AP-abhängigen Ubiquitinierung von HERC2

Es ergab sich die Frage, ob E6-AP in seiner Funktion als E3 für HERC2 durch eine andere Ubiquitin-Protein-Ligase, wie z. B. *in vitro* für HHR23A und Ataxin-3 gezeigt (vgl. 3.3.4.2), ersetzt werden kann. Aus diesem Grund wurden *in vitro*-Ubiquitinierungen von hu-HERC2 2918-3606 mit der *S. cerevisiae*-HECT-Ligase Rsp5 durchgeführt. Gleichzeitig wurde getestet, ob hu-HERC2 2918-3606 auch in Gegenwart von inaktivem E6-AP, bei dem der katalytisch aktive Cysteinrest der HECT-Domäne durch einen Alaninrest ausgetauscht wurde, ubiquitiniert werden kann. Damit sollte ein eindeutiger Hinweis auf die Abhängigkeit der HERC2 2918-3606-Ubiquitinierung von katalytisch aktivem E6-AP erhalten werden. Nur in

Anwesenheit von katalytisch aktivem E6-AP wurde das menschliche HERC2-Fragment ubiquitiniert (Abb. 28). Die schwache Ubiquitinierung, die ohne Zusatz von Ubiquitin zur Reaktion erfolgte, kann auf im RRL vorhandenes Ubiquitin zurückgeführt werden. Im gleichen System exprimiertes Rsp5 vermittelte keine Ubiquitinierung des HERC2-Fragments (Abb. 28). Diese Ergebnisse, zusammen mit der Beobachtung, dass E6-AP an HERC2 bindet, lassen vermuten, dass es sich bei HERC2 um ein spezifisches Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP handelt.

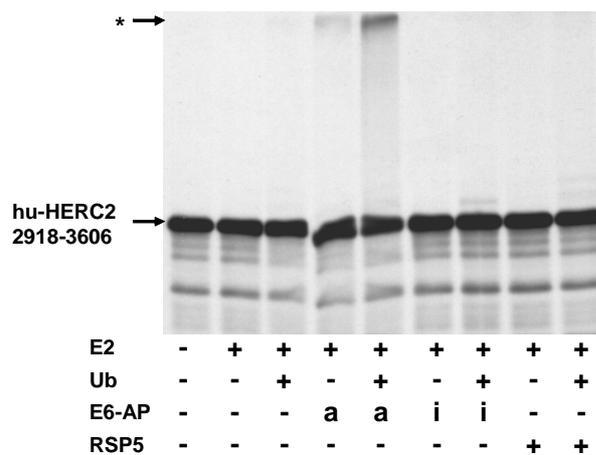


Abb. 28: E6-AP, nicht aber Rsp5, ubiquitiniert HERC2 *in vitro*. Ubiquitinierungsassays wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem humanem HERC2 2918-3606 unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) in An- und Abwesenheit von rekombinantem E2 (UbcH5 und UbcH7), zusätzlichem nativen Ubiquitin, katalytisch aktivem (a) bzw. inaktivem (i) E6-AP oder Rsp5 durchgeführt, wie angegeben. Die Ubiquitinierungsansätze wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und HERC2 2918-3606 fluorographisch sichtbar gemacht. *, ubiquitiniertes HERC2 2918-3606.

3.4.2.3 Abbau von HERC2

Um festzustellen, ob es sich bei der Ubiquitinierung von HERC2 2918-3606 wie vermutet um eine Polyubiquitinierung handelt, wurden Ubiquitinierungsassays mit verschiedenen Ubiquitinmutanten durchgeführt. Getestet wurden Mutanten, bei denen entweder nur der Lysinrest K48 oder neben K48 zusätzlich auch K29 und K63 durch Argininreste ersetzt wurden (R48 bzw. R48/R29/R63), sowie Mutanten, die nur über K48 (K48) oder über keine Lysinreste (K0) verfügen. Die E6-AP-abhängige Ubiquitinierung von hu-HERC2 2918-3606 führte nur in Anwesenheit der K48-Ubiquitinmutante zu einem der Ubiquitinierung mit Wildtyp-Ubiquitin entsprechenden Ubiquitinierungsbild in der SDS-PAGE (Abb. 29A). Die Ubiquitinierungseffizienz war verglichen mit der Ubiquitinierung durch Wildtyp-Ubiquitin allerdings deutlich schwächer. Eine Abnahme der Ubiquitinierungseffizienz ist jedoch häufig zu beobachten, wenn Ubiquitinmutanten verwendet werden, bei denen ein Großteil der Lysinreste ausgetauscht wurden (eigene Beobachtung). Ubiquitinierungen mit den anderen Ubiquitinmutanten, denen das Fehlen von K48 gemeinsam ist, resultierten hingegen nicht in einer Ubiquitin-Kettenbildung an hu-HERC2 2918-3606 (Abb. 29A). Es waren nur eine stärkere Bande, die wahrscheinlich monoubiquitiniertem hu-HERC2 2918-3606 entspricht,

sowie zwei schwächere Banden, die in der SDS-PAGE etwas höher laufen, zu erkennen (Abb. 29A). Diese Ergebnisse sprechen für eine E6-AP-abhängige Ubiquitinierung des HERC2-Fragments durch K48-Ubiquitin-Ketten. K48-Polyubiquitin-Ketten sind proteasomale Abbausignale (Chau *et al.*, 1989; Finley *et al.*, 1994) (vgl. 1.2.1). Aus diesem Grund wurde getestet, ob durch die Zugabe von proteasomhaltigem RRL zu der Ubiquitinierungsreaktion polyubiquitiniertes hu-HERC2 2918-3606 *in vitro* abgebaut werden kann (vgl. 2.2.11). Tatsächlich kam es unter diesen Bedingungen zu einer Degradation der polyubiquitinierten HERC2-Deletionsmutante (Abb. 29B). Da grundsätzlich, wie schon geschildert, nur ein geringer Teil von hu-HERC2 2918-3606 polyubiquitiniert wurde, ist der Abbau nur schwer erkennbar. Auswertungen mit einem Densitometer zeigten in verschiedenen unabhängigen Experimenten jedoch eine eindeutige Reduktion des HERC2-Fragments zwischen 15 und 20 % verglichen mit dem Input. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse *in vitro* auf eine mögliche Regulation der HERC2-Konzentration durch E6-AP in der Zelle hin.

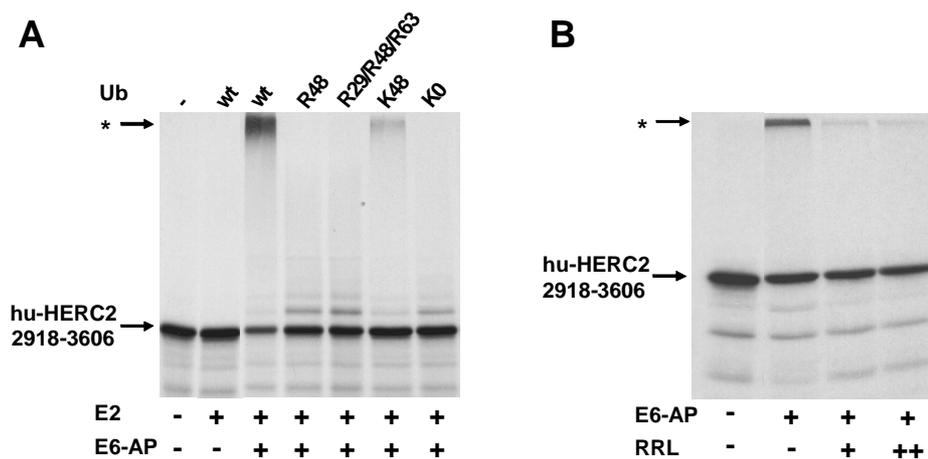


Abb. 29: HERC2 2918-3606 wird *in vitro* polyubiquitiniert und abgebaut. (A) *In vitro* translatiertes [³⁵S]-markiertes humanes HERC2 2918-3606 wurde unter Standardbedingungen E6-AP-abhängig in An- und Abwesenheit verschiedener bakteriell exprimierter Ubiquitinmutanten ubiquitiniert, wie angegeben. Die Ansätze wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und hu-HERC2 2918-3606 fluorographisch sichtbar gemacht. (B) *In vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes humanes HERC2 2918-3606 wurde *in vitro* E6-AP-abhängig ubiquitiniert. Nach 1 h wurde die Ubiquitinierungsreaktion abgestoppt und aufgeköcht (Kontrolle) bzw. in Anwesenheit von frischem RRL als Proteasomquelle bei 30°C für 90 min weiterinkubiert. Die Analyse erfolgte wie in (A) beschrieben. *, polyubiquitiniertes HERC2 2918-3606.

3.4.3 HERC2-spezifische Antikörper

Um die Interaktion von E6-AP und HERC2 auf ihre physiologische Relevanz zu überprüfen, sind *in vivo*-Versuche mit endogenem HERC2 und E6-AP notwendig, für die wiederum spezifische Antikörper gegen HERC2 benötigt werden. Mithilfe eines anti-HERC2-Antikörpers könnte z. B. endogenes HERC2 im Zellysat immunpräzipitiert und so eine

Interaktion von HERC2 mit endogenem E6-AP in der Zelle nachgewiesen werden. Anti-HERC2-Antikörper werden auch für die genauere Charakterisierung des HERC2-Proteins, über dessen Lokalisierung und Funktion in der Zelle nichts bekannt ist, gebraucht. Aus diesen Gründen wurden spezifische Antiseren gegen HERC2 hergestellt. Ziel war es, anti-HERC2-Antikörper zu erhalten, die sowohl humanes als auch murines HERC2 erkennen. Bei der Auswahl eines für die Immunisierung geeigneten HERC2-Peptids wurde deshalb neben seinen immunogenen Eigenschaften auf eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz in Maus und Mensch geachtet. Immunisiert wurde mit einem 16 Aminosäuren langen Peptid (H₂N-CVTELEDVATDSQSGR-COOH). Dieses Peptid entspricht im Maus-HERC2 den Aminosäuren 3593-3608 und im humanen HERC2 den Aminosäuren 3591-3606 und liegt damit in beiden Proteinen zwischen der RCC1b- und der RCC1c-Domäne (vgl. Abb. 27B). Die Ermittlung möglicher immunogener HERC2-Peptide sowie die Synthese des ausgewählten Peptids, die anschließende Immunisierung zweier Kaninchen und die Gewinnung des polyklonalen HERC2-Serums erfolgte durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien).

Zur Charakterisierung der polyklonalen Seren der beiden Kaninchen (nach der Nummerierung der Kaninchen durch Eurogentec als Serum # 910 und # 1094 bezeichnet) wurde zunächst die Sensitivität in Westernblot-Analysen bestimmt. Als Testprotein wurde dazu humanes, bakteriell exprimiertes GST-HERC2 2960-3606, das über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt worden war, verwendet. Verschiedene Mengen an GST-HERC2 2960-3606 (1000 ng, 100 ng, 30 ng, 10 ng, 3 ng) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im angeschlossenen Westernblot mithilfe der polyklonalen Seren detektiert. Als Negativkontrolle wurde Präimmunserum verwendet (nicht gezeigt). Die Seren wurden jeweils in verschiedenen Verdünnungen (1:500, 1:1.000, 1:2.500) getestet (nicht gezeigt). Bei einer Verdünnung von 1:1.000 wurden die besten Ergebnisse erzielt. Die Detektionsgrenze dieser Verdünnung lag bei Serum # 910 über 30 ng, während mit dem Serum # 1094 schon 30 ng gut detektiert werden konnten (Abb. 30A). Der mit dem Präimmunserum inkubierte Blot lieferte kein HERC2-Signal (nicht gezeigt).

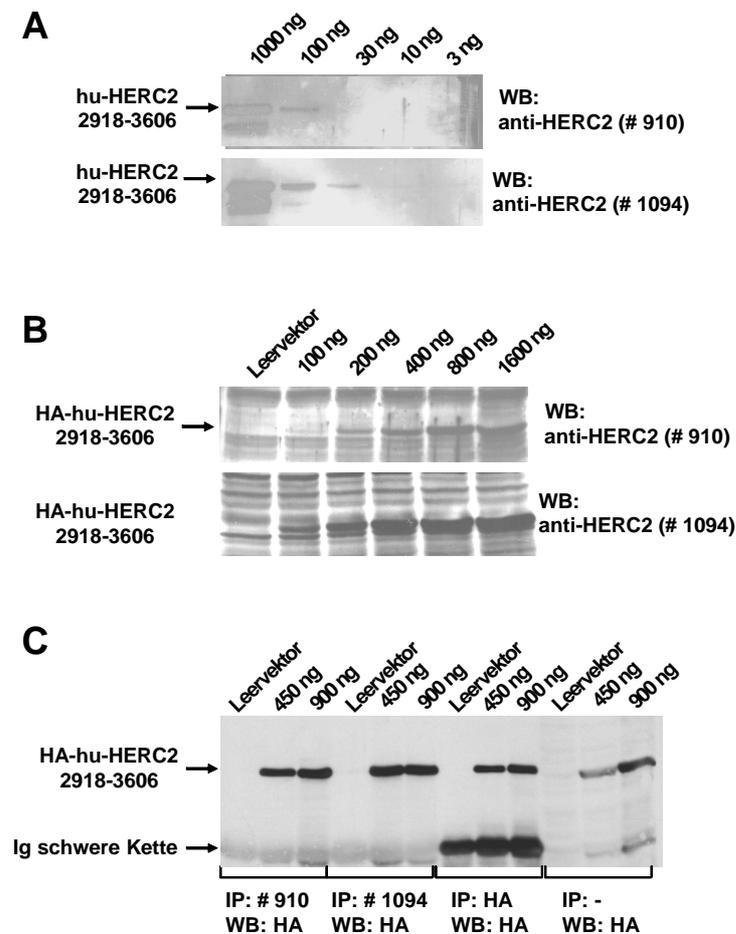


Abb. 30: Charakterisierung der polyklonalen anti-HERC2-Antisera. (A) In *E. coli* als GST-Fusionsprotein exprimiertes und über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigtes HERC2 2918-3606 wurde in verschiedenen Mengen (wie angegeben) in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt. Der angeschlossene Westernblot wurde mit den beiden polyklonalen anti-HERC2-Seren # 910 und # 1094 dekoriert (Verdünnung: 1:1.000). (B) Unterschiedliche Mengen, wie angegeben, eines HA-HERC2 2918-3606 kodierendes Expressionsplasmid wurden in humane H1299-Zellen transient transfiziert. In Kontrollansätzen wurde Leervektor (1600 ng) transient transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h aufgeschlossen und die Lysate in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Im folgenden Westernblot wurden die polyklonalen anti-HERC2-Seren in einer 1:1.000 Verdünnung eingesetzt. (C) H1299-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an HA-HERC2-Expressionsplasmid transient transfiziert und nach 24 h lysiert. Die Zellysate wurden mit jeweils 4 µl polyklonalem anti-HERC2-Serum bzw. 1 µl monoklonalem HA-AK (Kontrolle) sowie Protein A-Sepharose 4 h inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde dann präzipitiert. Das Präzipitat wurde gewaschen und in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Der angeschlossene Westernblot erfolgte mit einem monoklonalen anti-HA-Antikörper (Verdünnung 1:1.000). Kontrollansätze wurden mit Leervektor (900 ng) und mit nicht-präzipitierten Zellysaten durchgeführt, wie angeben. WB, Westernblot. IP, Immunpräzipitation.

Transiente Transfektionsexperimente sollten zeigen, ob auch in Zellen überexprimiertes HERC2 2918-3606 mithilfe der polyklonalen anti-HERC2-Antisera im Zellysat nachgewiesen werden kann. Dazu wurden verschiedene Mengen des HA-HERC2 2918-3606 Expressionskonstruktes in H1299-Zellen transient transfiziert (100 ng, 200 ng, 400 ng, 800 ng, 1.600 ng). Die Zellen wurden nach 24 Stunden lysiert und die Lysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im angeschlossenen Westernblot konnte mit beiden Seren in den Zellysaten vorhandenes HERC2-Fragment detektiert werden (Abb. 30B). Im Zellysat von Zellen, die mit

100 ng des Expressionsvektors transfiziert wurden, konnte durch das Serum # 1094 schon eindeutig HERC2 2918-3606 nachgewiesen werden (Abb. 30B). Im gleichen Zellysat wurde mit dem Serum # 910 nur ein äußerst schwaches HERC2-Signal erhalten (Abb. 30B). Zusammenfassend konnte somit für beide polyklonalen anti-HERC2-Antiseren ihre Eignung für Westernblot-Analysen gezeigt werden. Eine Aufreinigung der polyklonalen Antikörper aus den Seren erscheint jedoch sinnvoll, um den Hintergrund auf den Blot-Membranen zu reduzieren. Das anti-HERC2-Antiserum # 1094 war im Vergleich sensitiver als # 910.

Im Anschluss wurde getestet, ob die beiden Antiseren auch für Immunpräzipitationen geeignet sind (Abb. 30C). Dazu wurden Zellysate von HA-HERC2 2918-3606 überexprimierenden Zellen mit 4 µl des jeweilig getesteten polyklonalen anti-HERC2-Antiserums und Protein A-Sepharose inkubiert und im Anschluss präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im angeschlossenen Westernblot wurde mit einem anti-HA-Antikörper HA-fusioniertes HERC2 2918-3606 detektiert. Als Kontrollen wurden HA-HERC2 2918-3606 auch mit dem anti-HA Antikörper präzipitiert sowie reine Zellysate von Zellen, die HERC2-Fragment überexprimieren, aufgetragen (Abb. 30C). Beide polyklonalen anti-HERC2-Antiseren führten zu einer effizienten Fällung des HA-HERC2 Fragments (Abb. 30C). Damit konnten zwei anti-HERC2-Antiseren aus Kaninchen gewonnen werden, die sich zumindest für den Nachweis von HERC2 2918-3606 im Westernblot und auch für die Immunpräzipitation eignen.

3.5 Isolierung von Bindungspartnern und Substraten von E6-AP in biochemischen Ansätzen

Parallel zum YTH (vgl. 3.1) wurde versucht, Interaktionspartner und Substrate von E6-AP direkt aus dem Lysat humaner Zellen zu isolieren und im Anschluss zu identifizieren. Dazu wurden zwei unterschiedliche biochemische Ansätze gewählt.

3.5.1 Präzipitation von E6-AP-interagierenden Proteinen

Im ersten biochemischen Ansatz sollten aus humanem Zellysat Proteine isoliert werden, die mit E6-AP interagieren. Dazu wurde GST-E6-AP in *S. pombe* exprimiert und an GSH-Sepharose gekoppelt. [³⁵S]-markierte, über Anionenaustauscher-Chromatographie fraktionierte Zellysate der humanen HPV-negativen rektalen Kolonkarzinomzelllinie RKO wurden dann mit an GSH-Sepharose gekoppeltem GST-E6-AP inkubiert, so dass potentielle, in der Zellysatfraktion vorhandene Interaktionspartner an E6-AP binden konnten. Als

Negativkontrolle wurde in einem zusätzlichen Ansatz nur GST gebunden an GSH-Sepharose eingesetzt. Nach 4 h wurden die an GST-E6-AP bzw. an GST gebundenen Proteine präzipitiert und gewaschen. Um zu testen, ob es sich bei den an GST-E6-AP gebundenen Proteinen möglicherweise um Substrate von E6-AP handelt, wurden in einem Präzipitationsansatz durch die Zugabe von rekombinantem E1, UbcH7, UbcH5 sowie ATP Ubiquitinierungsbedingungen für E6-AP eingestellt (vgl. 2.2.10) und so eine Ubiquitinierung der gebundenen Proteine durch GST-E6-AP ermöglicht. Die mit GST-E6-AP präzipitierten, radioaktiv markierten Proteine wurden dann eluiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht (Abb. 31). Potentielle Substrate von E6-AP sind im Ansatz, der im Anschluss an die Präzipitation in Anwesenheit von E6-AP ubiquitiniert wurde, an ihrer veränderten Mobilität in der SDS-PAGE zu erkennen (Abb. 31). Dabei ist z. B. die eindeutige Abnahme der Proteinmenge der prominentesten Proteinbande bei gleichzeitiger Zunahme hochmolekularer ubiquitiniertes Proteinaggregate am oberen Rand des Trenngels unter Ubiquitinierungsbedingungen zu beachten (Abb. 31). Es könnte sich hierbei um ein Substrat von E6-AP handeln. Um die an E6-AP bindenden Proteine identifizieren zu können, ist die Isolierung größerer Mengen nicht-radioaktiv markierten Proteins für eine anschließende massenspektrometrische Analyse notwendig. Es wurde deshalb versucht, die Experimente in einem größeren Maßstab mit einer bis zu 40-fach größeren Menge an fraktioniertem, nicht radioaktiv markiertem Zellysat durchzuführen und die an E6-AP bindenden Proteine in einer Coomassiefärbung sichtbar zu machen. In diesen größeren Ansätzen ist es nicht gelungen, die im kleineren Maßstab in der Fluorographie detektierten Proteine anzureichern und zu isolieren (nicht gezeigt). Möglicherweise ist der Einsatz größerer Mengen an Zellysat notwendig. Damit gelang in diesem Versuchsansatz zwar der Nachweis von potentiellen Substraten von E6-AP im RKO-Zellysat, nicht jedoch ihre Identifizierung.

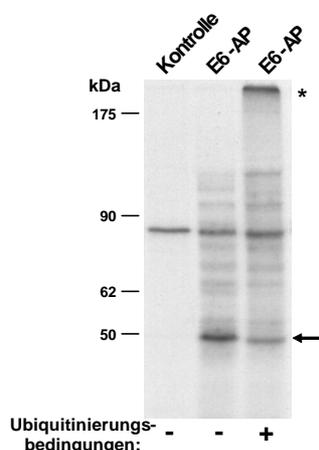


Abb. 31: Präzipitation und Ubiquitinierung von E6-AP-interagierenden Proteinen aus humanem RKO-Zellysat. [³⁵S]-markierte Extrakte von humanen RKO-Zellen wurden über eine MonoQ-Säule chromatographiert. Gebundene Proteine wurden mit 200 mM NaCl eluiert. Das Eluat wurde mit an GSH-Sepharose gekoppeltem, in *S. pombe* exprimiertem GST-E6-AP bzw. nicht fusioniertem GST-Protein (Kontrolle) 4 h inkubiert und dann präzipitiert. Nach erfolgter Präzipitation wurden in einem Versuchsansatz Standardubiquitinierungsbedingungen für E6-AP eingestellt (vgl. 2.2.10). Die an GST-E6-AP gebundenen, radioaktiv markierten Proteine wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. Der Pfeil zeigt die Abnahme der Menge eines E6-AP-interagierenden Proteins unter Ubiquitinierungsbedingungen. *, ubiquitinierte Proteine.

3.5.2 Präzipitation E6-AP-abhängig ubiquitiniertes Proteine

Mithilfe der zweiten angewendeten biochemischen Methode sollten E6-AP-abhängig ubiquitinierte Proteine aus dem Zellysat isoliert werden. Durch die Zugabe von rekombinantem E1, UbcH5, UbcH7, E6-AP sowie GST-Ubiquitin zu Zellysaten der humanen HPV-negativen Zervixkarzinomzelle C33A können E6-unabhängige Substrate von E6-AP mit GST-Ubiquitin ubiquitiniert und im Anschluss mit GSH-Sepharose präzipitiert werden (Scheffner *et al.*, 1993). Ein solcher Ansatz war auch mit RKO-Zellysat möglich (Abb. 32). Als Kontrollen wurden Ubiquitinierungsexperimente mit Zellysat in Abwesenheit von rekombinant exprimiertem E6-AP durchgeführt und gefällt. Dieser Versuchsansatz könnte die Isolierung von Substratproteinen von E6-AP, deren Interaktion mit E6-AP aufgrund einer zu hohen Dissoziationskonstanten (K_D) in Kopräzipitationsansätzen nicht nachzuweisen ist, und ihre nachfolgende Identifizierung in der Massenspektrometrie ermöglichen. Die Identifizierung von Substraten, die durch E6-AP mit langen Ubiquitin-Ketten ubiquitiniert wurden, ist jedoch schwierig. Neben großen Mengen an Ubiquitin würde zusätzlich autoubiquitiniertes rekombinantes E6-AP die Ubiquitinierungssubstrate in der massenspektrometrischen Analyse überdecken (Nuber *et al.*, 1998). Aus diesen Gründen sollte versucht werden, die E6-AP-abhängig ubiquitinierten Proteine nach ihrer Isolierung durch *S. cerevisiae*-UBP1 zu deubiquitiniieren. Nach der Deubiquitinierung sollte eine Auftrennung der einzelnen Proteine in der SDS-PAGE durchführbar und die Isolierung einzelner Banden, die Substraten von E6-AP entsprechen, für die Identifikation in der Massenspektrometrie möglich sein. Die Deubiquitinierung von ubiquitiniertem p53 durch UBP1 ist *in vitro* möglich (vgl. 3.2.4). Für die geplante Isolierung von ubiquitinierten Substraten aus dem Zellysat ist es notwendig, dass auch mit GST-Ubiquitin ubiquitinierte Proteine durch UBP1 deubiquitiniert werden können. Vorversuche zeigten, dass p53, das mit GST-Ubiquitin ubiquitiniert wurde, nicht deubiquitiniert werden kann (nicht gezeigt). Es ist davon auszugehen, dass das große GST-Molekül UBP1 in seiner Funktion behindert. Versuchsansätze, in denen GST-Ubiquitin mit normalem, nicht-markiertem Ubiquitin gemischt wurde, so dass nur ein geringer Teil der Ubiquitinmoleküle die Markierung trägt, führten auch nicht zum Erfolg (nicht gezeigt). Die Versuche wurden deshalb auch mit Ubiquitin, das mit dem im Vergleich zu GST sehr viel kleineren „His-Tag“, einer Abfolge von zehn Histidinen am N-Terminus des Ubiquitins, gekennzeichnet war, wiederholt. Auch hier konnte keine effiziente Deubiquitinierung von p53 durch UBP1 erreicht werden (nicht gezeigt). Dennoch wurde versucht, die im Zellysat mit GST-Ubiquitin bzw. His-Ubiquitin ubiquitinierten Proteine mit UBP1 zu deubiquitiniieren. Eine Deubiquitinierung war unter

diesen Bedingungen auch in Experimenten mit Zellysate nicht möglich (nicht gezeigt). Somit konnten auch in diesem Ansatz keine Substrate von E6-AP identifiziert werden.

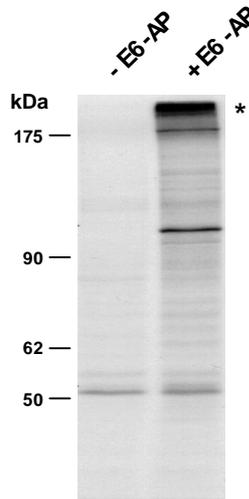


Abb. 32: Präzipitation und Deubiquitinierung von E6-AP-abhängig ubiquitinierten Proteinen aus RKO-Zellysate. [^{35}S]-markierte Lysate von humanen RKO-Zellen wurden in Ubiquitinierungsassays mit rekombinatem, in Insektenzellen exprimiertem E6-AP und mit GST-Ubiquitin unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.10) ubiquitiniert. Die ubiquitinierten Proteine wurden mit GSH-Sepharose gefällt. Die präzipitierten, ubiquitinierten, radioaktiv markierten Proteine wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. *, polyubiquitinierte Proteine.

4 Diskussion

Die humane Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP ubiquitiniert im Komplex mit dem E6-Onkoprotein Krebs-assoziiierter humaner Papillomviren (HPV) den Tumorsuppressor p53 und markiert ihn damit für den proteasomalen Abbau (Scheffner *et al.*, 1993). Dieser Zusammenhang spielt eine kausale Rolle bei der Entstehung maligner Tumoren, insbesondere des Zervixkarzinoms (zur Hausen, 2002). In normalen (HPV-negativen) Zellen ist über die Substrate und die physiologischen Funktionen von E6-AP, dessen Ausfall mit dem erblichen Krankheitsbild des Angelman-Syndroms verbunden ist (Albrecht *et al.*, 1997; Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997), bis heute wenig bekannt. Mit der Identifizierung von Interaktionspartnern von E6-AP im YTH und der anschließenden Charakterisierung dieser Proteine konnten in dieser Arbeit Hinweise auf mögliche physiologisch relevante Substrate von E6-AP sowie die Eigenschaften von Ubl/Uba-Proteinen und UIM-Proteinen erhalten werden.

4.1 Potentielle Interaktionspartner und Substrate von E6-AP

In der Vergangenheit wurden bereits drei im YTH mit einer aktivierten T-Zell-cDNA-Bibliothek isolierte Interaktionspartner von E6-AP beschrieben: das E2-Enzym UbcH8 (Kumar *et al.*, 1997), das Ubl/Uba-Protein HHR23A (Kumar *et al.*, 1999) sowie die Src-Kinase Lck (Oda *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte aus dieser cDNA-Bibliothek neben HHR23A mit CHAP1 ein weiteres Ubl/Uba-Protein isoliert werden, das im YTH mit E6-AP interagiert. UbcH8 und Lck wurden nicht als Bindungspartner von E6-AP gefunden. Dies mag auf unterschiedliche Interaktionsbedingungen in den verschiedenen YTH-Ansätzen zurückzuführen sein (z. B. wurden unterschiedliche Hefestämme verwendet).

Das HECT-Protein HERC2, das Ubl/Uba-Protein A1Up sowie die schwere Kette des Myosins IIA (MyHCIIa), die neben CHAP1 aus den beiden weiteren humanen cDNA-Bibliotheken (fötales Gehirn und Skelettmuskel) isoliert wurden, sind bisher noch nicht als Interaktionspartner von E6-AP beschrieben worden. Der Bereich der MyHCIIa, der als Interaktionsbereich von E6-AP ermittelt wurde, ist charakteristisch für die schwere Kette IIA und findet sich nur in Myosinen muskulärer Zellen. Dies könnte auf eine spezielle Aufgabe von E6-AP im Muskel hinweisen. Dafür spricht auch eine im Northern Blot nachgewiesene, im Vergleich zu anderen Geweben starke Expression von E6-AP im Skelettmuskel (Schwarz *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu MyHCIIa werden HERC2, CHAP1, HHR23A und A1Up auch

im Gehirn exprimiert (van der Spek, 1996; Ji *et al.*, 1999; Davidson *et al.*, 2000) und könnten damit im Zusammenhang mit der Entstehung des Angelman-Syndroms stehen, welches auf das Fehlen von funktionellem E6-AP in bestimmten Bereichen des Gehirns zurückzuführen ist (Albrecht *et al.*, 1997, Rougeulle *et al.*, 1997; Vu und Hoffmann, 1997). Aufgrund dieser Überlegung wurde in der vorliegenden Arbeit eine genauere Charakterisierung der im YTH detektierten Interaktion zwischen E6-AP und MyHCIIa zurückgestellt.

Die gewählten biochemischen Ansätze führten aus technischen Gründen nicht zur Identifizierung von Interaktionspartnern und Substraten von E6-AP (vgl. 3.6).

4.2 Charakterisierung von Ubl/Uba-Proteinen

4.2.1 HHR23A, CHAP1 und A1Up als potentielle Interaktionspartner von E6-AP

Die Identifizierung von HHR23A, CHAP1 und A1Up als Interaktionspartner von E6-AP im YTH weist auf eine Rolle von Ubl/Uba-Proteinen bei E6-AP-abhängigen Prozessen hin. Zwischenzeitlich wurde publiziert, dass E6-AP mit CHAP1 im YTH interagiert und dass E6-AP mit CHAP1 in humanen Zellen koimmunpräzipitiert (Kleijnen *et al.*, 2000). Dies deutet darauf hin, dass die im YTH detektierte Interaktion zwischen E6-AP und CHAP1 physiologisch relevant ist, obwohl in *in vitro*-Kopräzipitationsexperimenten in dieser Arbeit keine Bindung von CHAP1 an E6-AP nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 8). Grund hierfür könnten z. B. falsche oder nicht ausreichende Faltungen der rekombinant exprimierten Bindungspartner sein. Möglich ist auch, dass die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen nicht direkt ist, sondern über andere Proteine vermittelt wird, die im Kopräzipitationsexperiment fehlten. Ähnliche Überlegungen treffen auf A1Up zu, das in seiner Aminosäuresequenz zu 70 % mit CHAP1 übereinstimmt und *in vitro* auch nicht mit E6-AP interagiert.

HHR23A konnte *in vitro* als Bindungspartner und Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP bestätigt werden (vgl. Kumar *et al.*, 1999), während CHAP1 und A1Up *in vitro* nicht durch E6-AP ubiquitiniert wurden (vgl. Abb. 9). Damit handelt es sich bei Ubl/Uba-Proteinen vermutlich nicht um generelle Ubiquitinierungssubstrate von E6-AP. Die Beobachtung, dass HHR23A durch Hdm2 und andere E3s ubiquitiniert wurde, weist daraufhin, dass HHR23A Aminosäuresequenzen oder Strukturen aufweist, die generell als Ubiquitinierungssignal erkannt werden. HHR23A Δ Ubl wurde sowohl durch E6-AP als auch durch Hdm2 deutlich schlechter ubiquitiniert als Wildtyp-HHR23A (vgl. Abb. 9C, D). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Kumar *et al.* (1999), wonach die Ubl-Domäne von HHR23A für dessen

Ubiquitinierung notwendig ist. Für die Bindung von HHR23A an E6-AP wird die Ubl-Domäne nicht gebraucht (Kumar *et al.*, 1999). Somit kann der Rückgang der E6-AP-induzierten Ubiquitinierung nicht auf eine fehlende Interaktion zwischen Substrat und E3 zurückgeführt werden. Möglicherweise werden für die Ubiquitin-Konjugation an HHR23A Lysinreste der Ubl-Domäne genutzt, was das Erfordernis der Ubl-Domäne für eine effiziente Ubiquitinierung erklären würde.

Eine physische Interaktion zwischen E3 und Substrat ist notwendige Voraussetzung für die Ubiquitinierung eines Substrats (Glickman und Ciechanover, 2002). Im Gegensatz zu E6-AP scheint Hdm2 im Kopräzipitationsassay nicht an HHR23A zu binden (nicht gezeigt). Dies deutet an, dass eine Interaktion von Hdm2 mit E6-AP mit einer höheren K_D , die im Kopräzipitationsassay nicht nachgewiesen werden kann, für eine Ubiquitinierung von HHR23A durch Hdm2 ausreichend ist. Inwiefern Ubiquitinierungen von HHR23A durch unterschiedliche E3-Ligasen *in vivo* möglich und relevant sind, ist noch zu klären. Aufgrund der nachgewiesenen Bindung von E6-AP an HHR23A erscheint eine Ubiquitinierung von HHR23A durch E6-AP aber *in vivo* am wahrscheinlichsten.

Die durch E6-AP induzierte Oligoubiquitinierung von HHR23A (vgl. Abb. 9) könnte andeuten, dass diese Ubiquitinierung HHR23A nicht für den proteasomalen Abbau markiert, sondern andere Funktionen übernimmt. Allerdings kann das Fehlen von zusätzlichen in der Zelle vorliegenden Faktoren in den *in vitro*-Ansätzen, die für eine Polyubiquitinierung von HHR23A durch E6-AP notwendig sein könnten, nicht ausgeschlossen werden. Kumar *et al.* (1999) zeigten einen Anstieg der HHR23A Konzentration in der Zelle durch Überexpression von katalytisch inaktivem E6-AP. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass katalytisch aktives E6-AP für den Abbau von HHR23A notwendig ist. Allerdings lag in der Kontrolle im Vergleich eine deutlich geringere Konzentration an katalytisch aktivem E6-AP vor. Somit ist anhand der vorliegenden Daten kein Rückschluss darüber möglich, welche tatsächliche Funktion die E6-AP-vermittelte Ubiquitinierung von HHR23A in der Zelle übernehmen könnte.

4.2.2 Einfluss von HHR23A auf Ubiquitinierungsreaktionen

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand mehrerer Beispiele gezeigt, dass HHR23A und HHR23B *in vitro* Oligo- nicht aber Polyubiquitinierungsreaktionen hemmen (vgl. Abb. 11, für HHR23B nicht gezeigt). Diese Befunde stehen im scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen von Ortolan *et al.* (2000), die eine Hemmung der Ausbildung von Ubiquitin-

Ketten durch *S. cerevisiae*-Rad23 und HHR23B beschreiben. Ortolan *et al.* (2000) beobachteten, dass die Ubiquitinierung von H2B in Anwesenheit der Ubiquitinmutanten K48 und K0 gehemmt ist. Im Gegensatz dazu wurde mit der Ubiquitinmutante R48 ein dem Ubiquitinierungsbild mit Wildtyp-Ubiquitin vergleichbares Ergebnis erhalten (Ortolan *et al.*, 2000). Daraus wurde geschlossen, dass H2B Ubc2-abhängig durch Ubiquitin-Ketten, die nicht K48-verknüpft sind, modifiziert wird und nicht, wie beschrieben, durch einzelne oder multiple Monoubiquitinierungen (Jason *et al.*, 2002). Es wurde deshalb ein negativer Einfluss von Rad23-Proteinen auf Ubiquitin-Kettenbildungen postuliert (Ortolan *et al.*, 2000). Ubiquitinierungsexperimente mit Ubiquitinmutanten, bei denen ein Großteil der Lysinreste durch Argininreste ersetzt wurde, können jedoch zu falschen Ergebnissen führen. So konnte in der Massenspektrometrie z. B. die Modifizierung von autoubiquitiniertem E6-AP durch K48-Polyubiquitin-Ketten eindeutig nachgewiesen werden, während die Selbstubiquitinierung von E6-AP in Anwesenheit der Ubiquitinmutante K48 nicht möglich war (nicht gezeigt). Somit ist denkbar, dass auch die Charakterisierung der Ubc2-abhängigen Ubiquitinierung von H2B mit den Ubiquitinmutanten K0 und K48 zu falschen Ergebnissen führt. Vermutlich wird also H2B Ubc2-abhängig oligoubiquitiniert. Ihre Hemmung wäre mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar.

Der Mechanismus der Inhibition der Oligoubiquitinierung durch Rad23-Proteine, für die die Uba2-Domäne notwendig, aber nicht ausreichend ist (vgl. Abb. 11G), ist noch unklar. Nach Ablauf der Ubiquitinierungsreaktionen hatte HHR23A keinen negativen Einfluss auf den Ubiquitinierungsgrad von oligoubiquitiniertem p53 *in vitro* (nicht gezeigt). Somit besitzen Rad23-Proteine vermutlich keine deubiquitinierenden Eigenschaften. Ob Rad23-Proteine auch *in vivo* die Oligoubiquitinierung von Proteinen hemmen können und welche Konsequenzen solche Hemmungen haben könnten, bleibt zu klären. Weder CHAP1 noch A1Up hatten *in vitro* einen negativen Einfluss auf Oligoubiquitinierungen (nicht gezeigt). Dies weist daraufhin, dass es sich bei der Hemmung der Oligoubiquitinierung möglicherweise um eine spezifische Eigenschaft von Rad23-Proteinen handelt.

4.2.3 Uba-Domänen als Bindemotive für ubiquitinierte Proteine

Zu Beginn dieser Arbeit wurde angenommen, dass Uba-Domänen allgemein die Eigenschaft aufweisen, Ubiquitin zu binden (Hofmann und Bucher, 1996). Experimentell nachgewiesen war aber nur die Wechselwirkung von Ubiquitin mit der Uba-Domäne des sogenannten Proteins 62, eines Interaktionspartners der Src-Tyrosinkinase Lck (Vadlamudi, 1996). In der

vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass HHR23A, CHAP1 und A1UP in Kopräzipitationsexperimenten über ihre C-terminalen Uba-Domänen mit polyubiquitinierten Proteinen interagieren. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme von Uba-Domänen als Ubiquitin-Bindemotive. Weiterhin deuten sie eine Aufgabe von Proteinen mit Uba-Domänen als Interaktionspartner von ubiquitinierten Proteinen in der Zelle an. In der Zwischenzeit wurde auch von anderen Gruppen die Wechselwirkung von Proteinen mit Uba-Domänen mit Ubiquitin bestätigt. So wurde sowohl für die Homologe von CHAP1 und HHR23A in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* sowie für das Ubl/Uba-Protein Ddi (*S. cerevisiae*)/Mud1 (*S. pombe*) die Bindung an Ubiquitin und Ubiquitin-Ketten beschrieben (Bertolaet *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001; Elder *et al.*, 2002; Funakoshi *et al.*, 2002; Rao und Sastry, 2002; Saeki *et al.*, 2002). Allerdings interagiert HHR23A über seine Uba2-Domäne nicht nur mit Ubiquitin sondern auch mit anderen Proteinen, wie z. B. dem Basen-Exzisionsreparatur-Enzym Methyladenin-DNA-Glycosylase (Miao *et al.*, 2000) oder der Deglykosylase Png1 (Suzuki *et al.*, 2001). Somit handelt es sich bei Uba-Domänen zumindest nicht in allen Fällen um ausschließliche Ubiquitin-Interaktionsmotive. Die Beobachtung, dass die Interaktionen von HHR23A, CHAP1 und A1Up mit oligoubiquitiniertem p53 oder GST-Ubiquitin sehr viel schwächer oder überhaupt nicht nachweisbar war (vgl. Abb. 13, nicht gezeigt), lässt vermuten, dass Uba-Domänen bevorzugt mit Ubiquitin-Ketten wechselwirken. Diese Annahme wird durch Ergebnisse anderer Gruppen unterstützt, die zeigen, dass Rad23 und Mud1 Tetraubiquitin mit höherer Affinität binden als Monoubiquitin (Wilkinson *et al.*, 2001; Rao und Sastry, 2002). Für Rad23 und das CHAP1-Homolog Dsk2 in *S. cerevisiae* wird weiterhin eine Bindung an K29- und K48-Ubiquitin-Ketten, nicht aber an K63-Ubiquitin-Ketten gezeigt (Funakoshi *et al.*, 2002; Rao und Sastry, 2002). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse die bevorzugte Wechselwirkung dieser Ubl/Uba-Proteine mit ubiquitinierten Proteinen an, die für den Abbau bestimmt sind (K29- oder K48-Ubiquitin-Ketten, vgl. 1.2).

Ob alle Uba-Domänen die Interaktion mit Polyubiquitin-Ketten favorisieren oder ob sich die Uba-Domänen verschiedener Proteine in ihren Eigenschaften unterscheiden, ist noch nicht bekannt. Allerdings wurde am Beispiel der beiden Uba-Domänen von HHR23A gezeigt, dass die strukturelle Variabilität von Uba1 und Uba2 trotz großer Differenzen in den Aminosäuresequenzen der beiden Bereiche sehr gering ist (Mueller und Feigon, 2002). Dies könnte bedeuten, dass verschiedene Uba-Domänen nur geringe Strukturunterschiede aufweisen (Mueller und Feigon, 2002). Somit könnten Uba-Domänen auch in ihrer Funktion hochkonserviert sein und allgemein Polyubiquitin-Ketten binden. Allerdings interagierte

HHR23A? Uba2 im Kopräzipitationsassay nicht mit polyubiquitinierten Substraten. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die Uba1-Domäne von HHR23A nicht für Ubiquitin zugänglich ist und andere Funktionen übernimmt. Andererseits ist auch eine unvollständige bzw. nicht korrekte Faltung der in den Experimenten eingesetzten bakteriell exprimierten Deletionsmutante von HHR23A, die zu einem Funktionsverlust der Uba1-Domäne führt, nicht auszuschließen. Für diese Überlegung spricht, dass die in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlichen Homologe von HHR23A in *S. cerevisiae* und *S. pombe* über ihre Uba1-Domänen mit Ubiquitin wechselwirken können (Bertolaet *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2001; Rao und Sastry, 2002). Aus diesem Grund sollten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die mit dieser HHR23A-Deletionsmutante erhalten wurden, kritisch bewertet werden.

4.2.4 Ubl/Uba-Proteine als Vermittler zwischen Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau

HHR23A hemmte *in vitro* den Abbau von p53 und stabilisierte p53 und CLIM2 *in vivo* (vgl. Abb. 10A, 16, 17). Polyubiquitinierungen wurden durch HHR23A *in vitro* nicht beeinflusst (vgl. 4.2.2). Die HHR23A-vermittelte Hemmung des proteasomalen Abbaus *in vitro* und *in vivo* kann deshalb vermutlich nicht auf eine Inhibition der Ubiquitinierung von p53 und CLIM2 zurückgeführt werden. Allerdings wurde in dieser Arbeit *in vivo* nur die Stabilisierung von nicht-ubiquitiniertem p53 und CLIM2 gezeigt, während *in vitro* der Nachweis von polyubiquitiniertem p53 gelang. Grund hierfür ist vermutlich, dass die Zellen nicht unter stark denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen wurden und es somit während der Aufarbeitung zur Deubiquitinierung kommen konnte. Für diese Vermutung spricht die Akkumulation von ubiquitiniertem p53 unter Überexpression von HHR23A in einem Ubiquitinierungsassay *in vivo*, der in Kooperation mit C. Blattner (Forschungszentrum Karlsruhe) durchgeführt wurde und bei dem die Zellen denaturierend aufgebrochen wurden (Abb. 33).

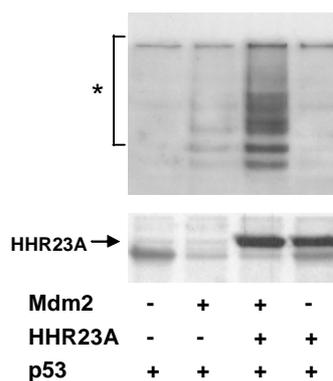


Abb. 33: Die Überexpression von HHR23A führt in Anwesenheit von Mdm2 zur Stabilisierung von ubiquitiniertem p53 *in vivo*. p53, Mdm2 und HHR23A kodierende Expressionsplasmide wurden transient in den angegebenen Kombinationen in H1299-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde in allen Ansätzen ein His-Ubiquitin kodierendes Expressionkonstrukt transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen unter stark denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen und ubiquitinierte Proteine über Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im angeschlossenen Westernblot wurde mit einem anti-p53 Antikörper ubiquitiniertes p53 detektiert. Das Experiment wurde durchgeführt und die Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von C. Blattner (Forschungszentrum Karlsruhe). *, ubiquitiniertes p53.

HHR23A sowie seine Homologe in *S. cerevisiae* und *S. pombe* interagieren über ihre Ubl-Domäne mit der 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms (Schauber *et al.*, 1998; Hiyama *et al.*, 1999; Elsasser *et al.*, 2002; Saeki *et al.*, 2002) und über ihre Uba-Domäne mit polyubiquitinierten Proteinen (vgl. 4.2.3). Es wird deshalb gegenwärtig davon ausgegangen, dass Rad23-Proteine polyubiquitinierte Proteine binden und zum 26S-Proteasom transportieren (Chen und Madura, 2002; Rao und Sastry, 2002). In *S. cerevisiae* konnte bereits demonstriert werden, dass Rad23 (gemeinsam mit dem CHAP1-Homolog Dsk2) eine Rolle beim Abbau verschiedener Proteine spielt (Chen und Madura, 2002; Funakoshi *et al.*, 2002; Rao und Sastry, 2002). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HHR23A die Deubiquitinierung von polyubiquitiniertem p53 durch *S. cerevisiae* UBP1 hemmt. Dies könnte zusätzlich darauf hinweisen, dass polyubiquitinierte Proteine auf dem Weg zum Proteasom durch ihre Bindung an Rad23-Proteine vor Deubiquitinierung geschützt sind. Das vorgestellte Modell von Rad23-Proteinen als Zulieferer von ubiquitinierten Substraten zum Proteasom ist in Abb. 34 schematisch dargestellt. Auf den ersten Blick widerspricht es den Ergebnissen dieser Arbeit, die *in vitro* eine Hemmung des proteasomalen Abbaus von p53 und *in vivo* eine Stabilisierung von p53 und CLIM2 zeigten. Es muss dabei jedoch beachtet werden, dass HHR23A in den verschiedenen Experimenten *in vivo* überexprimiert und damit in sehr hohen Konzentrationen in der Zelle vorlag. Die vermutete Vermittlerfunktion von HHR23A könnte somit inhibiert sein, weil die HHR23A-Bindestellen am Proteasom sowie an Polyubiquitin-Ketten, die an Substrate gekoppelt sind, durch unterschiedliche HHR23A-Moleküle abgesättigt sind. Eine gleichzeitige Bindung von HHR23A an den 19S-Komplex des Proteasoms über seine Ubl-Domäne und an polyubiquitinierte Proteine über seine Uba-Domäne wäre damit nicht möglich. Für die Vermutung, dass die Ubl-abhängige Bindung von HHR23A-Molekülen den Zugang für polyubiquitinierte Proteine zum Proteasom blockieren kann, spricht die Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen in *S. cerevisiae*-Zellen, die die Ubl-Domäne von Rad23 überexprimieren (Chen und Madura, 2002). Auf der anderen Seite könnte die Stabilisierung von p53 durch HHR23A Δ Ubl *in vivo* damit erklärt werden, dass überexprimiertes HHR23A Δ Ubl polyubiquitiniertes p53 bindet, aber aufgrund der fehlenden Ubl-Domäne nicht zum Proteasom weiterleiten kann. Auch die Überexpression von HHR23A-Uba2 sollte aufgrund dieser Überlegungen zu einer Stabilisierung von p53 *in vivo* führen. Dies konnte *in vivo* jedoch nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf eine nicht korrekte Lokalisierung der überexprimierten Deletionsmutante zurückzuführen.

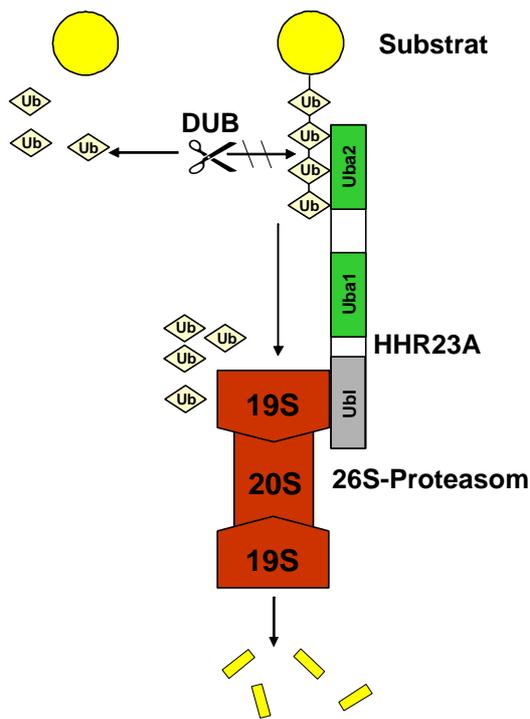


Abb. 34: Hypothetisches Modell der Funktion von HHR23A als Zulieferer von polyubiquitinierten Proteinen zum Proteasom. HHR23A bindet über seine Uba2-Domäne an polyubiquitinierte Proteine und über seine Ubl-Domäne an den 19S-Partikel des 26S-Proteasoms. Durch die Bindung an die Uba2-Domäne von HHR23A werden polyubiquitinierte Proteine vor dem Angriff deubiquitinierender Enzyme (DUB) geschützt.

Auch die Hemmung des proteasomalen Abbaus von p53 *in vitro* könnte auf zu hohen Konzentrationen an HHR23A in den Versuchsansätzen beruhen und ähnlich diskutiert werden wie die Stabilisierung von p53 durch HHR23A *in vivo*. Neben HHR23A und HHR23A Δ Ubl hemmt *in vitro* auch die isolierte Uba2-Domäne den Abbau von p53. Einerseits könnte dies im Einklang mit dem vorgestellten Modell damit erklärt werden, dass durch die Bindung von Uba2 an das polyubiquitinierte p53 ein Transport zum 26S-Proteasom nicht mehr möglich ist. Andererseits könnten die Ergebnisse aber auch unabhängig von dem in Abb. 34 gezeigten Modell diskutiert werden. So ist denkbar, dass die Bindung von Uba2 an die Polyubiquitin-Ketten das proteasomale Abbausignal maskiert. Diese Interpretation kann auch die Hemmung des Abbaus von polyubiquitiniertem p53 durch HHR23A bzw. HHR23A Δ Ubl *in vitro* und *in vivo* erklären.

Es wurde beobachtet, dass die Deletionsmutante HHR23A Δ Uba2, deren Einfluss auf die Konzentration von p53 in der Zelle wegen technischer Probleme (i. e. zu geringe Expression) *in vivo* nicht untersucht werden konnte, den Abbau von p53 *in vitro* nicht hemmt. Dies steht im Gegensatz zum vorgestellten Modell. Möglicherweise kann diese Mutante aufgrund einer nicht vollständig korrekten Faltung seiner Ubl-Domäne nicht an das 26S-Proteasom binden, was erklären würde, warum sie keine Hemmung des Abbaus bewirkt. Andererseits ist auch denkbar, dass für den Transport von ubiquitinierten Substraten zum Proteasom *in vitro* aufgrund der hohen Konzentration von Substrat und Proteasom und/oder der räumlichen Nähe im Reaktionsgefäß keine Vermittlerproteine gebraucht werden. Ausgehend von dieser

Überlegung würde die Absättigung von Bindestellen für HHR23A am 19S-Komplex den Abbau von p53 nicht stören. Innerhalb dieses Erklärungsansatzes müsste allerdings vorausgesetzt werden, dass der postulierte „Vermittler-unabhängige“ Abbau *in vitro* nur möglich ist, wenn die Ubiquitin-Ketten frei (d. h. nicht gebunden an HHR23A bzw. HHR23A-Deletionsmutanten, die über die Uba2-Domäne verfügen) vorliegen.

In vivo und *in vitro* ist die Abbauhemmung von p53 durch HHR23A Δ Ubl stärker als durch HHR23A (vgl. Abb. 10C, Abb. 15). Auch in *S. cerevisiae* resultierte die Überexpression von Rad23[?]Ubl in einer stärkeren Stabilisierung von Modellsubstraten des Ubiquitin-Proteasom-Systems als Rad23 (Ortolan *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse könnten auf die Richtigkeit des vorgestellten Modells von HHR23A als Zulieferer des Proteasoms hinweisen. Polyubiquitiniertes p53, das an HHR23A gebunden vorliegt, könnte prinzipiell noch abgebaut werden (wenn auch mit verlangsamter Kinetik), während die Bindung an HHR23A Δ Ubl den Abbau komplett unmöglich macht, da diese Deletionsmutante nicht mit dem 26S-Proteasom wechselwirken kann. Die beobachteten Hemmungen des proteasomalen Abbaus durch HHR23A bzw. Rad23 erlauben weiterhin die Spekulation, dass die Zelle über die Regulation des Spiegels von HHR23A bzw. Rad23 kontrollierend in die Proteindegradation eingreifen kann.

In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass auch das Ubl/Uba-Protein und CHAP1-Homolog Dsk2 eine Rolle im proteasomalen Abbau spielt (Funakoshi, 2002; Rao und Sastry, 2002). Kleijnen *et al.* (2000) beschreiben eine Hemmung des Abbaus von p53 und I β B durch die Überexpression von CHAP1 in humanen Zellen. Der Befund, dass p53 durch CHAP1 stabilisiert wird, konnte in dieser Arbeit *in vivo* bestätigt werden (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass auch CHAP1 und das in seiner Aminosäuresequenz sehr ähnliche A1Up Funktionen im proteasomalen Abbau übernehmen können. *In vitro* inhibierten CHAP1 bzw. die Uba-Domäne von CHAP1 die Degradation von p53 jedoch nicht, obwohl CHAP1 genauso wie HHR23A *in vitro* mit polyubiquitiniertem p53 interagiert (vgl. Abb. 14A, B) und über seine Ubl-Domäne an den 19S-Partikel des Proteasom binden kann (Walters *et al.*, 2002). Auch ein Schutz vor Deubiquitinierung durch UBP1 war in Anwesenheit von CHAP1 bzw. CHAP1-Uba nicht möglich. Eine Erklärung dieser Ergebnisse könnte einerseits sein, dass bakteriell exprimiertes CHAP1 nicht richtig gefaltet ist und deshalb *in vitro* keine Effekte zu beobachten sind. Gegen diese Vermutung spricht die Beobachtung, dass CHAP1 *in vitro* mit polyubiquitinierten Proteinen interagieren konnte (vgl. Abb.14). Vorausgesetzt, dass überexprimiertes CHAP1 *in vivo* durch seine Ubl-abhängige Bindung an den 19S-Komplex hemmend wirkt, ist andererseits denkbar, dass ein

solcher Mechanismus *in vitro* aufgrund der Verzichtbarkeit von Zulieferproteinen nicht greift, wie ähnlich schon im Zusammenhang mit HHR23A diskutiert. Warum die alleinige Uba-Domäne von CHAP1 trotz der nachgewiesenen Bindung an polyubiquitiniertes p53 im Gegensatz zur Uba2-Domäne von HHR23A keinen Effekt auf den Abbau und die Deubiquitinierung von p53 hatte, blieb unklar. Möglicherweise reicht die alleinige Bindung der Uba-Domäne von CHAP1 an die Polyubiquitin-Ketten von p53 für die inhibierenden Effekte nicht aus. Für HHR23A ist gezeigt worden, dass es über seine Uba-Domänen auch spezifisch mit anderen Proteinen interagiert (vgl. 4.2.3). Es ist vorstellbar, dass die Uba2-Domäne von HHR23A ihren inhibierenden Einfluss auf Deubiquitinierung und den proteasomalen Abbau erst entfalten kann, wenn neben polyubiquitiniertem p53 ein weiteres Protein an die Uba-Domäne bindet. Uba-Domänen könnten also allgemeine Polyubiquitin-Interaktionsmotive darstellen, sich aber in ihren sonstigen Eigenschaften unterscheiden. Dies könnte erklären, warum sich die Uba2-Domäne von HHR23A und die Uba-Domäne von CHAP1 in ihrem Einfluss auf die Degradation und die Deubiquitinierung von p53 *in vitro* unterscheiden.

Abschließend kann vermutet werden, dass neben HHR23A und CHAP1 möglicherweise weitere Ubl/Uba-Proteine Vermittlerfunktionen zwischen ubiquitinierten Substraten und dem Proteasom übernehmen. HHR23A und seine Homologe sind nukleär lokalisiert, im Zytosol könnten andere Ubl/Uba-Proteine ähnliche Funktionen übernehmen. Verschiedenen Ubl/Uba-Proteinen könnten unterschiedliche Substrate zugeordnet sein. So wurde z. B. gezeigt, dass in *S. cerevisiae*-Zellen, denen sowohl Rad23 als auch Dsk2 fehlt, ein Modellsubstrat der „N-end rule“ noch abgebaut wird (Rao und Sastry, 2002). Vielleicht werden für die Degradation von „N-end rule“-Substraten andere Ubl/Uba-Proteine eingesetzt oder keine Ubl/Uba-Proteine benötigt.

4.2.5 Interaktionspartner von CHAP1

Bisher sind nur Stch, ein in seiner genauen Funktion noch nicht charakterisiertes Mitglied der Hsp70-Familie, der Plasmamembranrezeptor IAP („integrin associated protein“) und S5a als Bindungspartner von CHAP1 in der Literatur beschrieben (Wu *et al.*, 1999; Kaye *et al.*, 2000; Walters *et al.*, 2002). Mit der Serin/Threonin-Kinase DMPK, dem UIM Protein HRS, dem Fas-bindenden Protein FLASH sowie CHAP1 wurden im YTH potentielle, noch unbekannte Interaktionspartner von CHAP1 isoliert.

Für die im YTH isolierten Teilfragmente von DMPK oder FLASH konnte *in vitro* keine Bindung an CHAP1 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 18). Damit sind weitere Experimente notwendig, um zu klären, ob es einen Zusammenhang zwischen DMPK bzw. FLASH und CHAP1 gibt. Denkbar sind neben direkten Interaktionen der beiden Proteine mit CHAP1 auch Bindungen, die über andere Proteine vermittelt werden. Die Beobachtung, dass CHAP1 sein eigener Bindungspartner im YTH ist, steht im Einklang mit der bereits bekannten Bindung von Dsk2, dem CHAP1 Homolog in *S. cerevisiae*, an sich selbst (Rao und Sastry, 2002). GST-CHAP1 aber interagiert nicht mit *in vitro* translatiertem CHAP1 (vgl. Abb. 18). Auch die Dsk2-Dsk2 Wechselwirkung ist bisher nur im YTH gezeigt (Rao und Sastry, 2002). Ob es zur Ausbildung von CHAP1- bzw. Dsk2-Dimeren oder auch -Multimeren kommen kann oder ob für die im YTH detektierten Interaktionen Vermittlerproteine notwendig sind, bleibt zu klären. Auch falsch positive Ergebnisse im YTH sind nicht auszuschließen.

Die Ergebnisse im YTH und *in vitro* weisen auf HT2A und HRS als physiologisch relevante Interaktionspartner von CHAP1 hin. HT2A, über dessen Funktion in der Zelle nichts bekannt ist, verfügt über ein RING-Finger-Motiv, weshalb angenommen wird, dass es eine RING-Finger-Ligase ist (Frosk *et al.*, 2002). Ubiquitinierungsexperimente *in vitro* zeigten allerdings keine E3-Aktivität von HT2A (nicht gezeigt). Es wurden aber auch nur zwei verschiedene E2s (UbcH5 und UbcH7) getestet, die möglicherweise nicht mit HT2A interagieren. Weiterhin ist vorstellbar, dass HT2A Bestandteil einer RING-Finger Ligase ist, die sich aus mehreren Proteinen zusammensetzt und allein nicht aktiv ist (vgl. 1.4.2.2). Mutationen im HT2A-Gen sind mit einer seltenen Form muskulärer Dystrophie (Limb-Girdle muskuläre Dystrophie 2H) assoziiert (Frosk *et al.*, 2002). Auch eine zu geringe Genaktivität des DMPK kodierenden Gens führt zu einer muskulären Dystrophie (DM1 (Dystrophia myotonica 1) (Eriksson *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 1993). Ausgehend von der Beobachtung, dass sowohl DMPK als auch HT2A im YTH mit CHAP1 interagierten und beide Proteine im Zusammenhang mit muskulären Dystrophien stehen, wäre es interessant zu untersuchen, ob es eine Verbindung zwischen DMPK und HT2A gibt. Denkbar wäre z. B. dass CHAP1, DMPK und HT2A in einem Komplex vorliegen.

Die Herstellung eines Zusammenhanges zwischen den identifizierten Interaktionspartnern von CHAP1 und E6-AP war in Kopräzipitationsexperimenten und Ubiquitinierungssays nicht möglich. Zwar wurde HRS in Anwesenheit von E6-AP *in vitro* ubiquitiniert. E6-AP konnte dabei jedoch durch andere E3-Ligasen ersetzt werden (vgl. Abb. 24). Ob CHAP1, E6-AP sowie weitere im YTH detektierte Interaktionspartner von CHAP1 gemeinsam in Multiproteinkomplexen vorliegen können, gilt es noch zu untersuchen.

4.3 Charakterisierung von UIM-Proteinen

4.3.1 UIMs als Interaktionsmotive für Ubiquitin und Ubl-Domänen

Bis vor kurzem war nur für S5a eine Interaktion mit Ubiquitin über seine UIMs beschrieben (Young *et al.*, 1998; Hiyama *et al.*, 1999). Für die UIMs zahlreicher anderer Proteine wurde eine Bindung an Ubiquitin zwar vermutet, aber experimentell nicht nachgewiesen (Hofmann und Falquet, 2001). Der Nachweis der Bindung von Ataxin-3 und HRS an Ubiquitin bzw. ubiquitinierte Proteine in dieser Arbeit legt nahe, dass es sich bei UIMs tatsächlich um allgemeine Ubiquitininteraktionsmotive handelt. Die zu Ubiquitin in ihrer Sequenz und Struktur sehr ähnlichen Proteine SUMO und NEDD8 banden nicht an UIMs. Zwischenzeitlich wurde die Ubiquitin-Bindung von HRS auch von anderen Gruppen bestätigt (Bishop *et al.*, 2002; Polo *et al.*, 2002; Raiborg *et al.*, 2002; Shekhtman und Cowburn, 2002). Weiterhin wurde für verschiedene andere UIM-haltige Proteine eine Interaktion mit Ubiquitin gezeigt (Bilodeau *et al.*, 2002; Polo *et al.*, 2002; Shih *et al.*, 2002).

Am Beispiel der Interaktion von HRS mit CHAP1 bzw. HHR23A mit Ataxin-3 wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen, dass UIMs zumindest *in vitro* nicht nur an Ubiquitin, sondern auch an Ubl-Domänen binden (vgl. Abb. 36). Bisher war nur für S5a bekannt, dass es UIM-abhängig mit den Ubl-Domänen von HHR23A und CHAP1 interagiert (Hiyama *et al.*, 1999; Walters *et al.*, 2002). Einschränkend sollte jedoch festgehalten werden, dass der Nachweis der Bindung von CHAP1 an HRS bzw. von HHR23A an Ataxin-3 *in vitro* jeweils nur in einer Richtung gelang. Eine nicht vollständig korrekte Faltung mindestens eines der rekombinant exprimierten Bindungspartner könnte dafür verantwortlich sein.

Die Interaktion zwischen Ataxin-3 und HHR23A wurde ursprünglich im YTH entdeckt (Wang *et al.*, 2000). Der Einsatz von Deletionsmutanten von Ataxin-3 im YTH zeigte, dass für die Bindung von Ataxin-3 an HHR23A die N-terminalen 133 Aminosäuren von Ataxin-3 ausreichend sind (Wang *et al.*, 2000). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtung, dass die beiden zentralen UIMs von Ataxin-3 mit HHR23A interagieren. Die N-terminalen 133 Aminosäuren von Ataxin-3 beinhalten kein UIM. Möglicherweise kann diese Diskrepanz damit erklärt werden, dass Ataxin-3 mehrere Bindestellen für HHR23A besitzt. Es sollte deshalb überprüft werden, ob auch *in vitro* die Bindung des N-terminalen Bereichs von Ataxin-3 an HHR23A gezeigt werden kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Interaktionen, die über UIMs und Ubl-Domänen vermittelt werden, selektiv sind (d. h. bestimmte UIMs interagieren mit bestimmten Ubl-Domänen). Das UIM von HRS interagiert *in vitro* mit CHAP1, nicht jedoch

mit HHR23A (vgl. Abb. 19B, C). Die Ergebnisse der Kopräzipitationsexperimente mit Ataxin-3 lassen vermuten, dass Ataxin-3 über seine beiden zentralen UIMs mit HHR23A interagiert, während die zusätzlich beobachtete Wechselwirkung mit CHAP1 über das C-terminale UIM von Ataxin-3 vermittelt wird (vgl. 3.4.1.2). Humanes S5a verfügt über zwei UIMs und kann sowohl an HHR23A als auch an CHAP1 binden (Hiyama *et al.*, 1999; Walters *et al.*, 2002). Für HHR23A ist die Bindung an das zweite UIM von S5a beschrieben worden (Young *et al.*, 1998; Hiyama *et al.*, 1999). Das Homolog von S5a in *S. cerevisiae*, Rpn10, trägt nur ein UIM. Ein Analog zum zweiten UIM von S5a fehlt. Interessanterweise band Rpn10 *in vitro* nicht an HHR23A, während eine Wechselwirkung von CHAP1 mit Rpn10 möglich war (nicht gezeigt). Wahrscheinlich interagiert CHAP1 im Gegensatz zu HHR23A über das erste UIM mit S5a.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt einen konservierten Glutaminrest an Position 15 bei den UIMs von S5a und Ataxin-3, die mit HHR23A interagieren. Dieser Glutaminrest ist bei den UIMs, die mit CHAP1 wechselwirken, durch andere Aminosäurereste ersetzt (Abb. 35). Ausgehend von dieser Beobachtung wäre es interessant zu überprüfen, ob der Austausch des konservierten Glutaminrestes der verschiedenen UIMs, die mit HHR23A wechselwirken, gegen eine andere Aminosäure ihr Bindeverhalten verändert. UIMs sind mit 20 Aminosäuren nur sehr kurze Sequenzmotive, die wahrscheinlich keine unabhängigen Domänen entstehen lassen (Hofmann und Falquet, 2001). Vermutlich bilden sie kurze α -Helices aus, die Bestandteil unterschiedlicher Faltungsdomänen sind (Hofmann und Falquet, 2001). Es ist deshalb auch denkbar, dass bestimmte übergeordnete Strukturen, in denen die UIMs auftreten, zur Spezifität der Bindung an bestimmte Proteine mit verschiedenen Ubl-Domänen beitragen. Somit könnte man spekulieren, dass die an HHR23A bindenden UIMs von S5a und Ataxin-3 in einer ähnlichen Gesamtstruktur präsentiert werden, die für die Ubl-Domäne von HHR23A, nicht aber für die von CHAP1 zugänglich ist. Die CHAP1-interagierenden UIMs von HRS und S5a würden andererseits so präsentiert, dass sie nur von der Ubl-Domäne von CHAP1 erkannt werden. Voraussetzung für diese Hypothese ist, dass die eingesetzten, UIM-umfassenden Deletionsmutanten HRS-UIM und Ataxin-3 2xUIM, für die spezifische Interaktionen mit CHAP1 bzw. HHR23A gezeigt wurden, die UIMs in der jeweils richtigen Struktur präsentieren. Dies erscheint möglich, weil beide Deletionsmutanten neben den UIMs noch zusätzliche Bereiche umfassen (vgl. Abb. 19A, 20A).

263	LQLALALSQSE	HRS	} ← CHAP1
340	LQAAVTMSLET	Ataxin-3 (UIM-3)	
216	LALALRVSMEE	S5a (UIM-1)	
<hr/>			
229	LQRALALSRQE	Ataxin-3 (UIM-1)	} ← HHR23A
249	LRRTIQLSMQG	Ataxin-3 (UIM-2)	
287	IAYAMQMSLQG	S5a (UIM-2)	
<hr/>			
	ØXXAXXXSXX?	KONSENSUS	

Abb. 35: Sequenzvergleich der konservierten Kernbereiche der UIMs von HRS, Ataxin-3 und S5a. Die Aufteilung erfolgt in zwei Gruppen. Es werden UIMs unterschieden, die mit der Ubl-Domäne von CHAP1 bzw. der Ubl-Domäne von HHR23A interagieren. Zusätzlich ist die Konsensussequenz von UIMs angegeben. Die fast invarianten Positionen für A und S sind rot hervorgehoben. Auffallend ist ein konserviertes Q an vorletzter Stelle bei UIMs, die mit HHR23A interagieren (gelb unterlegt). Dieser Aminosäurerest ist bei CHAP1-bindenden UIMs, durch einen anderen ersetzt (grün unterlegt). Ø, hydrophober Aminosäurerest; ?, saurer Aminosäurerest; X, nicht konservierter Aminosäurerest.

Über die Funktionen, die UIMs als Bindemotive für Ubiquitin und Ubl-Domänen übernehmen, kann nur spekuliert werden. Für Proteine mit mehreren UIMs ist denkbar, dass sie mit verschiedenen Ubl-Domänen bzw. ubiquitinierten Proteinen gleichzeitig interagieren. Desweiteren könnten verschiedene UIM-Proteine um die Bindung an eine Ubl-Domäne konkurrieren. HHR23A kann über seine Ubl-Domäne sowohl an S5a als auch an Ataxin-3 binden (Hiyama *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000). Ausgehend von der Hypothese, dass HHR23A ein Vermittler zwischen ubiquitiniertem Substrat und Proteasom ist (vgl. 4.2.4), ermöglicht die Wechselwirkung mit S5a vielleicht einen Zugang zum Proteasom. Im Gegensatz dazu könnte die Bindung von Ataxin-3 die Ubl-Domäne maskieren, dadurch die Interaktion von HHR23A mit dem Proteasom verhindern und den proteasomalen Abbau inhibieren. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob die Überexpression von Ataxin-3 den Abbau von z. B. p53 *in vivo* hemmen kann. (*In vitro* wurde im Rahmen dieser Arbeit nur ein schwach hemmender Effekt von Ataxin-3 auf den Abbau von p53 beobachtet (vgl. Abb. 22A). Wie schon in anderem Zusammenhang diskutiert, kann es sein, dass *in vitro* im Gegensatz zur *in vivo*-Situation keine Zulieferproteine des Proteasom benötigt werden (vgl. 4.2.4). Ausgehend von dieser Annahme wäre es *in vitro* nicht möglich, einen Einfluss von Ataxin-3 auf den Abbau nachzuweisen. Die schwache Hemmung des Abbaus von p53 in Anwesenheit hoher Konzentrationen an Ataxin-3 kann *in vitro* auf eine Abnahme der Ubiquitinierung zurückgeführt werden (vgl. Abb. 22). Vermutlich konkurrieren die Ubiquitinierungssubstrate p53 und Ataxin-3 um limitierende Komponenten im Ubiquitinierungsansatz.

Weiterhin ist es möglich, dass Ubiquitin und Proteine mit Ubl-Domänen um die Bindung an UIMs konkurrieren. Kürzlich ist eine Rolle von HRS bei der Sortierung von ubiquitinierten Membranproteinen in frühe Endosomen beschrieben worden (Raiborg *et al.*, 2002). Vermutlich ist dafür die Bindung von HRS über sein UIM an die ubiquitinierten Membranproteine notwendig (Raiborg *et al.*, 2002). Es könnte somit spekuliert werden, dass CHAP1 ein negativer Regulator dieses Vorgangs ist. Die Bindung von CHAP1 an das einzige UIM von HRS könnte die Interaktion von HRS mit ubiquitinierten Membranproteinen blockieren und damit deren Sortierung in frühe Endosomen und ihren anschließenden lysosomalen Abbau hemmen. Anhaltspunkte für die Richtigkeit dieser Vermutung gibt es derzeit jedoch nicht.

4.3.2 UIMs als Ubiquitinierungssignale

In dieser Arbeit konnte anhand von Ubiquitinierungsexperimenten mit HRS, Ataxin-3 und S5a gezeigt werden, dass UIM-Proteine zumindest *in vitro* Ubiquitinierungssubstrate und UIMs transferable Ubiquitinierungssignale sind. Dabei müssen die für die Ubiquitinierung notwendigen Lysinreste nicht im UIM enthalten sein. Diese Befunde wurden vor kurzem von einer anderen Gruppe *in vivo* bestätigt. Oldham *et al.* (2002) haben gezeigt, dass die Fusion der UIMs von Epsin, einem an der Endozytose beteiligten Protein, an GST zu einer Ubiquitinierung des Fusionsproteins *in vivo* führt. Ein Austausch der zwei Lysinreste der zwei UIMs von Epsin resultierte dabei nicht in einem Rückgang der Ubiquitinierung. Weiterhin konnte für verschiedene an der Endozytose beteiligte UIM-Proteine, darunter HRS, kürzlich nachgewiesen werden, dass sie nach Stimulation von Zellen mit EGF ubiquitiniert werden (Klapisz *et al.*, 2002; Oldham *et al.*, 2002; Polo *et al.*, 2002). Für die Ubiquitinierungen waren die UIMs der Proteine notwendig. Ob auch S5a und Ataxin-3 *in vivo* teilweise ubiquitiniert vorliegen, gilt es noch zu klären. Ataxin-3, HRS und S5a wurden *in vitro* oligoubiquitiniert, das Ataxin-1-UIM Fusionsprotein wurde mono- oder diubiquitiniert. *In vivo* wurden bisher ausschließlich einfache Monoubiquitinierungen von HRS und anderen UIM-Proteinen beobachtet (Polo *et al.*, 2002; Klapisz *et al.*, 2002; Oldham *et al.*, 2002). Damit markieren die UIM-abhängigen Ubiquitinierungen Proteine vermutlich nicht für den proteasomalen Abbau. Wahrscheinlich sind UIMs ausschließlich Mono- bzw. Oligoubiquitinierungssignale. Abb. 36 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften von UIMs.

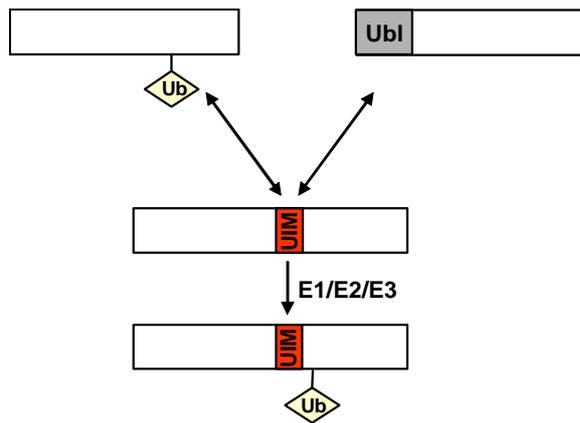


Abb. 36: Eigenschaften von UIMs. UIMs interagieren sowohl mit Ubiquitin als auch spezifisch mit Ubl-Domänen. Weiterhin stellen UIMs in Anwesenheit von E1-, E2- und E3-Enzymen Ubiquitinierungssignale dar.

Welche Funktionen den oligo- oder monoubiquitinierten UIM-Proteinen zugeordnet sind, ist noch zu klären. Denkbar ist, dass eine Monoubiquitinierung von UIM-Proteinen, ähnlich wie für andere Proteinmodifikationen (wie z. B. Phosphorylierung) gezeigt, zu einer Konformationsänderung des Proteins führt und so dessen Aktivität direkt beeinflusst. Möglicherweise hemmt Ubiquitinierung von UIM-Proteinen deren Wechselwirkung mit anderen Proteinen. In diesem Zusammenhang wäre es z. B. interessant zu untersuchen, ob ubiquitiniertes S5a, Ataxin-3 oder HRS noch mit ubiquitinierten Proteinen bzw. den zugeordneten Ubl/Uba-Proteinen interagieren können. Andererseits könnte die Ubiquitinierung von UIM-Proteinen deren Interaktion mit anderen Proteinen erst ermöglichen. Monoubiquitinierung der zytoplasmatischen Domänen von zahlreichen Membranproteinen resultiert in der Internalisierung in primäre endozytische Vesikel, was zum lysosomalen Abbau führt (Hicke, 2001). Es wird vermutet, dass dafür die Bindung mindestens eines UIM-Proteins an das ubiquitinierte Membranprotein notwendig ist (Bilodeau *et al.*, 2002; Polo *et al.*, 2002). EGF führt z. B. zur gleichzeitigen Monoubiquitinierung von verschiedenen UIM-Proteinen, die eine Rolle in der Endozytose spielen (s. o.). Diese Signal-abhängige Monoubiquitinierung könnte den einzelnen UIM-Proteinen ermöglichen, miteinander zu interagieren. Monoubiquitinierte UIM-Proteine könnten an die UIMs anderer UIM-Proteine binden und so die Ausbildung eines für die Endozytose wichtigen aktiven Multiproteinkomplexes oder Netzwerkes von Proteinen induzieren.

Schließlich könnte spekuliert werden, dass UIMs Interaktionsmotive für Ubiquitin-Protein-Ligasen darstellen. Möglicherweise führt die EGF-Signaltransduktion zur spezifischen Ubiquitinierung (z. B. Monoubiquitinierung) eines E3. Das so aktivierte E3 könnte daraufhin mit verschiedenen UIM-Proteinen wechselwirken und sie ubiquitinieren. Ein solches Modell könnte erklären, warum UIM-Proteine *in vitro* durch verschiedene E3s ubiquitiniert werden

können, obwohl eine direkte Interaktion zwischen den Substraten und Ubiquitin-Protein-Ligasen nicht nachzuweisen ist. Die in dieser Arbeit eingesetzten E3s besitzen die Fähigkeit zur Selbstubiquitinierung und liegen damit vermutlich in den Ubiquitinierungsansätzen *in vitro* zum Teil ubiquitiniert vor. Sie könnten über ihre Ubiquitin-Ketten mit den UIM-Proteinen interagieren und diese ubiquitinieren.

4.4 HERC2 und E6-AP

4.4.1 HERC2 als Interaktionspartner von E6-AP

HERC2 zählt mit einer molekularen Masse von 528 kDa zu den größten bekannten Proteinen. Das HERC2-kodierende Gen liegt auf Chromosom 15q11-q13 und ist damit in der gleichen chromosomalen Region lokalisiert wie das E6-AP-kodierende Gen *UBE3A* (Ji *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu *UBE3A* liegt es aber außerhalb des in bestimmten Regionen des Gehirns stillgelegten Bereichs des väterlichen Allels und wird von beiden Allelen exprimiert (Gabriel *et al.*, 1998; 1999; Ji *et al.*, 1999). Wie schon in der Einleitung ausgeführt, sind Mutationen im *HERC2*-homologen Gen in der Maus mit diversen Entwicklungs- sowie Fertilitätsstörungen assoziiert (Lehman *et al.*, 1998; Walkowicz *et al.*, 1999). Insgesamt verfügt HERC2 neben seiner HECT-Domäne über drei verschiedene RCC1-ähnliche Domänen (vgl. Abb. 27A), so dass HERC2 sowohl als GEF als auch als E3 agieren könnte (Lehman *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 1999). Für HERC1, welches HERC2 in seinem Aufbau und seiner Sequenz ähnlich ist, wurde bereits eine Funktion als GEF gezeigt. Eine der beiden RCC1-Domänen von HERC1 stimuliert den Nukleotidaustausch der kleinen GTPasen ARF1, Rab3A und Rab5, für die andere RCC1-Domäne ist eine Interaktion mit Clathrin gezeigt worden, was auf eine Aufgabe von HERC1 im Vesikeltransport hinweist (Rosa *et al.*, 1996; Rosa *et al.*, 1998). Für welche kleinen GTPasen die RCC1-Domänen von HERC2 eine Funktion als GEF übernehmen könnten, ist unklar. Der Nachweis von sekretorischen Defekten bei der Spermatogenese und im Nervensystem von Mäusen mit Jfd2 bzw. Rjs-Syndrom könnte auch für HERC2 eine Rolle im Vesikeltransport andeuten (Rinchik *et al.*, 1995; Lehman *et al.*, 1998; Ji *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine spezifische Interaktion zwischen E6-AP und HERC2 hin, die über die RCC1b-Domäne von HERC2 vermittelt wird und für die die katalytische HECT-Domäne von E6-AP nicht gebraucht wird. In GST-Kopräzipitationsassays konnte weder eine Bindung der RCC1a- noch der RCC1c-Domäne von HERC2 an E6-AP gezeigt werden (nicht gezeigt). Weiterhin war eine Bindung der einzigen RCC1-ähnlichen

Domäne von HERC3 an E6-AP nicht nachweisbar (nicht gezeigt). Damit stellen RCC1-ähnliche Domänen keine generellen Bindungsmotive für E6-AP dar. Der Bereich, der bei HERC2 die RCC1b-Domäne umfasst, ist bei HERC1 durch ein anderes Proteininteraktionsmotiv ersetzt. Auch eine Wechselwirkung von E6-AP mit HERC1 ist damit unwahrscheinlich. Allerdings kann eine Interaktion von E6-AP mit RCC1-ähnlichen Domänen anderer Proteine nicht generell ausgeschlossen werden.

4.4.2 HERC2 als Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP

In vitro-Ubiquitinierungsexperimente mit HERC2-Deletionsmutanten zeigten HERC2 als spezifisches Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP. *In vitro* wurde HERC2 2918-3606 E6-AP-abhängig polyubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt (vgl. Abb. 29). In transienten Transfektionsassays, d. h. *in vivo*, konnte ein möglicher E6-AP-induzierter Abbau von HERC2 2918-3606 nicht überprüft werden, da E6-AP die Expression der kotransfizierten β -Galactosidase erheblich verstärkte und somit eine Angleichung der Transfektionseffizienzen nicht möglich war.

Auffällig war, dass grundsätzlich nur ca. 30-40 % des angebotenen HERC2-Substrats *in vitro* ubiquitiniert wurden. Dies könnte auf einen limitierenden Faktor in den Ubiquitinierungsansätzen hinweisen. Weiterhin könnten Modifikationen von HERC2, wie z. B. Phosphorylierungen oder Hydroxylierungen, Voraussetzung für die Erkennung als Ubiquitinierungssubstrat durch E6-AP notwendig sein (vgl. 1.5). I β Ba wird z. B. von einem spezifischen SCF-Komplex nur dann als Ubiquitinierungssubstrat identifiziert, wenn es an Serin-32 und Serin-36 phosphoryliert ist (Yaron *et al.*, 1998). Möglicherweise ist nur ein geringer Teil der im Ubiquitinierungsassay eingesetzten HERC2-Deletionsmutanten für eine Ubiquitinierung durch E6-AP ausreichend modifiziert. Umgekehrt ist auch vorstellbar, dass die angebotenen HERC2-Substrate zum großen Teil modifiziert vorliegen und deshalb nicht erkannt werden. Die Degradation des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 durch das Ubiquitin-Proteasomsystem wird z. B. erst durch seine Dephosphorylierung möglich (Dimmeler *et al.*, 1999). Es ist auch nicht auszuschließen, dass der beobachtete Effekt auf Artefakte zurückzuführen ist, die aufgrund des Einsatzes von HERC2-Deletionmutanten bzw. der unphysiologischen Situation *in vitro* entstehen.

Die isolierte RCC1b-Domäne wurde im Vergleich zu HERC2 2918-3606, welches die RCC1b-Domäne mit C- und N-terminalen Verlängerungen umfasst, nur sehr ineffizient ubiquitiniert, und es wurden keine Polyubiquitin-Ketten am Substrat ausgebildet. Da die

RCC1b-Domäne von HERC2 21 Lysinreste enthält, kann die ineffiziente Ubiquitinierung nicht auf einen Mangel an potentiellen Ubiquitinierungsstellen zurückgeführt werden. Vermutlich werden v. a. Lysinreste außerhalb der RCC1b-Domäne für die Ubiquitinierung von HERC2 durch E6-AP benutzt.

Die N-terminale Deletionsmutante HERC2 2960-4836, die die gesamte HECT-Domäne umfasst (vgl. Abb. 27A), wird im Gegensatz zu Mutanten von HERC2, denen die HECT-Domäne fehlt, schon in Anwesenheit von E1 und einem adäquaten E2-Enzym ubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung ist möglicherweise auf eine Autoubiquitinierung der Deletionsmutante zurückzuführen. Dies weist daraufhin, dass die HECT-Domäne von HERC2 katalytisch aktiv ist und somit HERC2 eine aktive HECT-Ligase darstellt. Autoubiquitinierungen sind auch für E6-AP und Rsp5 beschrieben worden und wahrscheinlich eine allgemeine Eigenschaft von HECT-Ligasen (Huibregtse *et al.*, 1995; Nuber *et al.*, 1998). Damit kann der HERC2-Abbau vermutlich nicht nur durch E6-AP sondern auch durch HERC2 selbst induziert werden. Aufgrund dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, wie die unterschiedlichen Abbaumechanismen reguliert sein könnten. E6-AP ubiquitiniert sich bevorzugt selbst, wenn es nicht mit einem Substrat interagiert und in hohen Konzentrationen vorliegt (Nuber *et al.*, 1998). Somit werden wahrscheinlich nur E6-AP-Moleküle abgebaut, die nicht aktiv an Ubiquitinierungen beteiligt sind (Nuber *et al.*, 1998). Es ist denkbar, dass auch HERC2 sich nur dann autoubiquitiniert, wenn es nicht an ein Zielprotein gebunden vorliegt. Im Gegensatz dazu kann E6-AP vielleicht auch HERC2-Moleküle ubiquitinieren, die mit Proteinen interagieren und so aktiv in zelluläre Vorgänge eingreifen. Damit könnte E6-AP einen direkten hemmenden Einfluss auf die durch HERC2 regulierten Prozesse in der Zelle haben. Dieser negative Einfluss würde in Zellen, die kein E6-AP exprimieren, fehlen und vermutlich zu einer Deregulation der durch HERC2 gesteuerten Ereignisse in der Zelle führen. Das Fehlen von E6-AP in hippocampalen Neuronen und Purkinje-Zellen führt zum Angelman-Syndrom (Albrecht *et al.*, 1997). Ausgehend von der Annahme, dass HERC2 die Funktion eines GEFs für bestimmte kleine GTPasen übernimmt, kann z. B. eine verstärkte Aktivität dieser GTPasen in den betroffenen Zellen in Abwesenheit von E6-AP vorliegen. Interessanterweise kann die Überexpression eines GEFs in der Zelle ähnliche Auswirkungen haben wie die Überexpression der zugeordneten aktiven kleinen GTPase (Blomquist *et al.*, 2000).

Mitglieder der Rho-Familie kleiner GTPasen sind Schlüsselregulatoren für die Ausbildung neuronaler Netzwerke (Negishi und Katoh, 2002). Verschiedene neurologische Erkrankungen, die wie das Angelman-Syndrom mit mentalen Retardierungen assoziiert sind,

können auf Störungen in den Signaltransduktionswegen kleiner Rho-GTPasen zurückgeführt werden (Negishi und Katoh, 2002). So kann z. B. eine Mutation in einem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) bestimmter Rho-GTPasen Ursache für die X-Chromosom-assoziierte mentale Retardierung (MRX) sein (Billuart *et al.*, 1998). Rho-GTPasen übernehmen u. a. Funktionen bei der Regulation stachelartiger Fortsätze an den Dendriten, den sogenannten „spines“, die charakteristisch für die Dendriten von zerebellären Purkinje-Zellen und bestimmten kortikalen und hippocamponalen Neuronen sind (Nakayama *et al.*, 2000; Harris und Kater, 1994). „Spines“ spielen eine wichtige Rolle bei der „long term potentiation“ (LTP) (Engert und Bonhoeffer, 1999; Toni *et al.*, 1999). Die Überexpression der aktiven Rho-GTPase Rac1 in Purkinje-Zellen der Maus resultierte in einer Veränderung der Morphologie der „Spines“ (Luo *et al.*, 1996). Interessanterweise weisen Mäuse, denen das maternale E6-AP-Gen fehlt, einen LTP-Defekt auf (Jiang *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass Störungen in der LTP zu der mentalen Retardierung von Angelman-Patienten beitragen (Jiang *et al.*, 1998). Ausgehend von diesen Überlegungen könnte postuliert werden, dass HERC2 ein GEF für bestimmte Rho-GTPasen darstellt. In Abwesenheit von E6-AP könnte es zu höheren HERC2-Konzentrationen und damit zu einer verstärkten Aktivierung der Rho-GTPasen kommen. Die erhöhte Aktivität der Rho-GTPase in hippocamponalen Neuronen und Purkinje-Zellen würde die Ausbildung von neuronalen Netzwerken stören und damit die mentale Retardierung von Angelman-Patienten erklären. Es wäre interessant zu untersuchen, ob auch Mäuse mit *jfd*- bzw. *rjs*-Syndrom Störungen in der LTP aufweisen. Zwar sind neurologische Defekte dieser Mäuse bekannt, sie wurden bisher aber nicht genauer charakterisiert. Möglich ist auch, dass es in Abwesenheit von E6-AP zu einem verstärkten Abbau von Substraten der HECT-Ligase HERC2 kommt. Es ist deshalb von großem Interesse, Ubiquitinierungssubstrate von HERC2 zu isolieren.

5 Literaturverzeichnis

Alarcon-Vargas D, Ronai Z. 2002. p53-Mdm2 – the affair that never ends. *Carcinogenesis* **23**:541-547

Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanaach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL. 1997. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, Ube3a, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* **17**:75-78.

Aravind L, Koonin EV. 2000. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* **10**:R132-R134.

Aravind L. 2001. The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem Sci* **26**:273-275.

Bach I, Carriere C, Ostendorff HP, Andersen B, Rosenfeld MG. 1997. A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. *Genes Dev* **11**:1370-1380.

Bach I, Rodriguez-Esteban C, Carriere C, Bhushan A, Kronen A, Rose DW, Glass CK, Andersen B, Izpisua Belmonte JC, Rosenfeld MG. 1999. RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nat Genet* **22**:394-399.

Bach I. 2000. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev* **91**:5-17.

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

Baer R, Ludwig T. 2002. The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Opin Genet Dev* **12**:86-91.

Balint EE, Vousden KH. 2001. Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. *Br J Cancer* **85**:1813-1823.

Beaudenon SL, Huacani MR, Wang G, McDonnell DP, Huijbregtse JM. 1999. Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**:6972-6979.

Bertolaet BL, Clarke DJ, Wolff M, Watson MH, Henze M, Divita G, Reed SI. 2001. UBA domains of DNA damage-inducible proteins interact with ubiquitin. *Nat Struct Biol* **8**:417-422.

Biggins S, Ivanovska I, Rose MD. 1996. Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center. *J Cell Biol* **133**:1331-1346.

Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Roest Crolius H, Carrie A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J. 1998. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature* **392**:923-926.

- Bilodeau PS, Urbanowski JL, Winistorfer SC, Piper RC. 2002. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol* **4**:534-539.
- Bischoff FR, Ponstingl H. 1991. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**:80-82.
- Bishop N, Horman A, Woodman P. 2002. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J Cell Biol* **157**:91-101.
- Blomquist A, Schworer G, Schablowski H, Psoma A, Lehnen M, Jakobs KH, Rumenapp U. 2000. Identification and characterization of a novel Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. *Biochem J* **352**:319-325.
- Braspenning J, Manetti R, Zumbach K, Meschede W, Gissmann L, Tommasino M. 1997. A general purification protocol for E7 proteins from "high- and low-risk" human papillomavirus types expressed in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Protein Expr Purif* **10**:192-201.
- Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, Hoppe-Seyler F. 2000. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6693-6697.
- Cassidy SB, Dykens E, Williams CA. 2000. Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders. *Am J Med Genet* **97**:136-146.
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**:1576-1583.
- Chen A, Kleiman FE, Manley JL, Ouchi T, Pan ZQ. 2002. Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **277**:22085-22092.
- Chen L, Shinde U, Ortolan TG, Madura K. 2001. Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep* **2**:933-938.
- Chen L, Madura K. 2002. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol* **22**:4902-4913.
- Choi YH, Kim KB, Kim HH, Hong GS, Kwon YK, Chung CW, Park YM, Shen ZJ, Kim BJ, Lee SY, Jung YK. 2001. FLASH coordinates NF-kappa B activity via TRAF2. *J Biol Chem* **276**:25073-25077.
- Chung CH, Baek SH. 1999. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:633-640.
- Chung CT, Niemela SL, Miller RH. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2172-2175.

- Cruz C, Ventura F, Bartrons R, Rosa JL. 2001. HERC3 binding to and regulation by ubiquitin. *FEBS Lett* **488**:74-80.
- Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C. 2002. Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci* **27**:368-375.
- Davidson JD, Riley B, Burright EN, Duvick LA, Zoghbi HY, Orr HT. 2000. Identification and characterization of an ataxin-1-interacting protein: A1Up, a ubiquitin-like nuclear protein. *Hum Mol Genet* **9**:2305-2312.
- Davletov BA, Südhof TC. 1993. A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J Biol Chem* **268**:26386-26390.
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. 1997. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature* **388**:548-554.
- Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. 1999. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* **189**:1815-1822.
- Dohmen RJ, Strasser AW, Honer CB, Hollenberg CP. 1991. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**:691-692.
- Drebin JA, Hartzell SW, Griffin C, Campbell MJ, Niederhuber JE. 1995. Molecular cloning and chromosomal localization of the human homologue of a B-lymphocyte specific protein tyrosine kinase (blk). *Oncogene* **10**:477-486.
- Elder RT, Song XQ, Chen M, Hopkins KM, Lieberman HB, Zhao Y. 2002. Involvement of rhp23, a Schizosaccharomyces pombe homolog of the human HHR23A and Saccharomyces cerevisiae RAD23 nucleotide excision repair genes, in cell cycle control and protein ubiquitination. *Nucleic Acids Res* **30**:581-591.
- Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Müller B, Feng MT, Tübing F, Dittmar GA, Finley D. 2002. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* **4**:725-730.
- Engert F, Bonhoeffer T. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**:66-70.
- Eriksson M, Hedberg B, Carey N, Ansved T. 2001. Decreased DMPK transcript levels in myotonic dystrophy 1 type IIA muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* **286**:1177-1182.
- Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM. 2000. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* **275**:8945-8951.
- Ferrell K, Deveraux Q, van Nocker S, Rechsteiner M. 1996. Molecular cloning and expression of a multiubiquitin chain binding subunit of the human 26S protease. *FEBS Lett* **381**:143-148.

- Fields S, Song O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
- Finley D, Sadis S, Monia BP, Boucher P, Ecker DJ, Crooke ST, Chau V. 1994. Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* **14**:5501-5509.
- Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J. 1991. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* **64**:483-484.
- Frosk P, Weiler T, Nylén E, Sudha T, Greenberg CR, Morgan K, Fujiwara TM, Wrogemann K. 2002. Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet* **70**:663-672.
- Funakoshi M, Sasaki T, Nishimoto T, 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.
- Gabriel JM, Gray TA, Stubbs L, Saitoh S, Ohta T, Nicholls RD. 1998. Structure and function correlations at the imprinted mouse Snrpn locus. *Mamm Genome* **9**:788-793.
- Galan JM, Haguenaer-Tsapis R. 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* **16**:5847-5854.
- Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, Wazer DE, Band V. 1999. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol Cell Biol* **19**:733-744.
- Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L. 1999. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* **18**:5487-5496.
- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD. 2001. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* **7**:249-262.
- Gietz RD, Woods RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**:87-96.
- Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**:373-428.
- Glockzin G, von Knethen A, Scheffner M, Brüne B. 1999. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. *J Biol Chem* **274**:19581-19586.
- Görlich D, Pante N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR. 1996. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* **15**:5584-5594.
- Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del Sal G. 1999. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* **18**:6462-6471.

- Goto J, Watanabe M, Ichikawa Y, Yee SB, Ihara N, Endo K, Igarashi S, Takiyama Y, Gaspar C, Maciel P, Tsuji S, Rouleau GA, Kanazawa I. 1997. Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res* **28**:373-377.
- Grompe M, D'Andrea A. 2001. Fanconi anemia and DNA repair. *Hum Mol Genet* **10**:2253-2259.
- Gross-Mesilaty S, Reinstein E, Bercovich B, Tobias KE, Schwartz AL, Kahana C, Ciechanover A. 1998. Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8058-8063.
- Haas AL, Siepmann TJ. 1997. Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J* **11**:1257-1268.
- Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R. 1998. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* **26**:205-213.
- Harris KM, Kater SB. 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* **17**:341-371.
- Hatfield PM, Vierstra RD. 1992. Multiple forms of ubiquitin-activating enzyme E1 from wheat. Identification of an essential cysteine by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem* **267**:14799-14803.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**:296-299.
- Hengstermann A, Whitaker NJ, Zimmer D, Zentgraf H, Scheffner M. 1998. Characterization of sequence elements involved in p53 stability regulation reveals cell type dependence for p53 degradation. *Oncogene* **17**:2933-2941.
- Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1218-1223
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**:8206-8214.
- Hicke L. 1999. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* **9**:107-112.
- Hicke L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:195-201.
- Hiyama H, Yokoi M, Masutani C, Sugawara K, Maekawa T, Tanaka K, Hoeijmakers JH, 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.

- Hofmann K, Bucher P. 1996. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci* **21**:172-173.
- Hofmann K, Falquet L. 2001. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* **26**:347-350.
- Honda R, Yasuda H. 2000. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* **19**:1473-1476.
- Hoppe T, Matuschewski K, Rape M, Schlenker S, Ulrich HD, Jentsch S. 2000. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**:577-586.
- Hu G, Zhang S, Vidal M, Baer JL, Xu T, Fearon ER. 1997. Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* **11**:2701-2714.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* **10**:4129-4135.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* **13**:775-784.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:2563-2567.
- Huibregtse JM, Yang JC, Beaudenon SL. 1997. The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:3656-3661.
- Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S. 1999. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* **398**:777-785.
- Isaksson A, Peverali FA, Kockel L, Mlodzik M, Bohmann D. 1997. The deubiquitination enzyme fat facets negatively regulates RTK/Ras/MAPK signalling during Drosophila eye development. *Mech Dev* **68**:59-67.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**:464-468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**:468-472.
- Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* **10**:429-439.

- James P, Halladay J, Craig EA. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**:1425-1436.
- Jason LJ, Moore SC, Lewis JD, Lindsey G, Ausio J. 2002. Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* **24**:166-174.
- Jentsch S, Seufert W, Sommer T, Reins HA. 1990. Ubiquitin-conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* **15**:195-198.
- Jentsch S. 1992. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* **26**:179-207.
- Jentsch S, Pyrowolakis G. 2000. Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* **10**:335-342.
- Ji Y, Walkowicz MJ, Buiting K, Johnson DK, Tarvin RE, Rinchik EM, Horsthemke B, Stubbs L, Nicholls RD. 1999. The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* **8**:533-542.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL. 1998. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* **21**:799-811.
- Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J, Tsai TF, Beaudet AL. 1999. Genetics of Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **65**:1-6.
- Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A. 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**:17442-17456.
- Kaiser P, Flick K, Wittenberg C, Reed SI. 2000. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**:303-314.
- Kao WH, Beaudenon SL, Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. 2000. Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J Virol* **74**:6408-6417.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A. 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* **8**:221-228.
- Kay BK, Williamson MP, Sudol M. 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**:231-241.
- Kaye FJ, Modi S, Ivanovska I, Koonin EV, Thress K, Kubo A, Kornbluth S, Rose MD. 2000. A family of ubiquitin-like proteins binds the ATPase domain of Hsp70-like Stch. *FEBS Lett* **467**:348-355.

- Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. 1997. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**:70-73.
- Klapisz E, Sorokina I, Lemeer S, Pijnenburg M, Verkleij AJ, van Bergen en Henegouwen PM. 2002. A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *J Biol Chem* **277**:30746-30753.
- Kleijnen MF, Shih AH, Zhou P, Kumar S, Soccio RE, Kedersha NL, Gill G, Howley PM. 2000. The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol Cell* **6**:409-419.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**:635-644.
- Komada M, Soriano P. 1999. Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes Dev* **13**:1475-1485.
- Kozlov G, Trempe JF, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I, Gehring K. 2001. Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4409-4413.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**:299-303.
- Kühne C, Banks L. 1998. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem* **273**:34302-34309.
- Kumar S, Kao WH, Howley PM. 1997. Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *J Biol Chem* **272**:13548-13554.
- Kumar S, Talis AL, Howley PM. 1999. Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. *J Biol Chem* **274**:18785-18792.
- Kwon YT, Kashina AS, Davydov IV, Hu RG, An JY, Seo JW, Du F, Varshavsky A. 2002. An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science* **297**:96-99.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lai Z, Ferry KV, Diamond MA, Wee KE, Kim YB, Ma J, Yang T, Benfield PA, Copeland RA, Auger KR. 2001. Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *J Biol Chem* **276**:31357-31367.
- Lalande M, Minassian BA, DeLorey TM, Olsen RW. 1999. Parental imprinting and Angelman syndrome. *Adv Neurol* **79**:421-429.
- Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM. 2002. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* **416**:763-767.

- Lammer D, Mathias N, Laplaza JM, Jiang W, Liu Y, Callis J, Goebel M, Estelle M. 1998. Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev* **12**:914-926.
- Larkin K, Fardaei M. 2001. Myotonic dystrophy--a multigene disorder. *Brain Res Bull* **56**:389-395.
- Lehman AL, Nakatsu Y, Ching A, Bronson RT, Oakey RJ, Keiper-Hrynko N, Finger JN, Durham-Pierre D, Horton DB, Newton JM, Lyon MF, Brilliant MH. 1998. A very large protein with diverse functional motifs is deficient in rjs (runty, jerky, sterile) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9436-9441.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**:323-331.
- Liakopoulos D, Busgen T, Brychzy A, Jentsch S, Pause A. 1999. Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:5510-5515.
- Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS. 1993. Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2112-2116.
- Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, Lu KP. 1999. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**:1325-1328.
- Luo L, Hensch TK, Ackerman L, Barbel S, Jan LY, Jan YN. 1996. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* **379**:837-840.
- Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R. 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* **1**:565-574.
- Masutani C, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T, Takio K, Tanaka K, van der Spek PJ, Bootsma D. 1994. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J* **13**:1831-1843.
- Mastrandrea LD, You J, Niles EG, Pickart CM. 1999. E2/E3-mediated assembly of lysine 29-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem* **274**:27299-27306.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL. 1997. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**:74-77.
- Miao F, Bouziane M, Dammann R, Masutani C, Hanaoka F, Pfeifer G, O'Connor TR. 2000. 3-Methyladenine-DNA glycosylase (MPG protein) interacts with human RAD23 proteins. *J Biol Chem* **275**:28433-28438.
- Mitsui K, Nakanishi M, Ohtsuka S, Norwood TH, Okabayashi K, Miyamoto C, Tanaka K, Yoshimura A, Ohtsubo M. 1999. A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-

like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:115-122.

Morimoto M, Nishida T, Honda R, Yasuda H. 2000. Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1). *Biochem Biophys Res Commun* **270**:1093-1096.

Müller S, Matunis MJ, Dejean A. 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* **17**:61-70.

Mueller TD, Feigon J. 2002. Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions. *J Mol Biol* **319**:1243-1255.

Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T, Tanaka K. 2001. CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* **2**:1133-1138.

Nakao M, Sutcliffe JS, Durtschi B, Mutirangura A, Ledbetter DH, Beaudet AL. 1994. Imprinting analysis of three genes in the Prader-Willi/Angelman region: SNRPN, E6-associated protein, and PAR-2 (D15S225E). *Hum Mol Genet* **3**:309-315.

Nakagawa S, Huibregtse JM. 2000. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* **20**:8244-8253.

Nakayama AY, Luo L. 2000. Intracellular signaling pathways that regulate dendritic spine morphogenesis. *Hippocampus* **10**:582-586.

Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1999. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* **19**:1182-1189.

Negishi M, Katoh H. 2002. Rho family GTPases as key regulators for neuronal network formation. *J Biochem (Tokyo)* **132**:157-166.

Nuber U, Schwarz SE, Scheffner M. 1998. The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur J Biochem* **254**:643-649.

Oda H, Kumar S, Howley PM. 1999. Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:9557-9562.

Ohh M, Kim WY, Moslehi JJ, Chen Y, Chau V, Read MA, Kaelin WG Jr. 2002. An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep* **3**:177-182.

Ohsumi Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:211-216.

Oldham CE, Mohny RP, Miller SL, Hanes RN, O'Bryan JP. 2002. The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol* **12**:1112-1116.

- Orr HT. 2000. The ins and outs of a polyglutamine neurodegenerative disease: spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1). *Neurobiol Dis* **7**:129-134.
- Ortolan TG, Tongaonkar P, Lambertson D, Chen L, Schaubert C, Madura K. 2000. The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nat Cell Biol* **2**:601-608.
- Ostendorff HP, Peirano RI, Peters MA, Schlüter A, Bossenz M, Scheffner M, Bach I. 2002. Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. *Nature* **416**:99-103.
- Peters JM. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**:931-943.
- Pickart CM, Rose IA. 1985. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. *J Biol Chem* **260**:7903-7910.
- Pickart CM. 1998. Polyubiquitin Chains. In: Ubiquitin and the biology of the Cell, ed by Peters JM, Harris JR, Finley D. Plenum Press, New York, p 19-63.
- Pickart CM. 2000. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* **25**:544-548.
- Pickart CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**:503-533.
- Podust VN, Brownell JE, Gladysheva TB, Luo RS, Wang C, Coggins MB, Pierce JW, Lightcap ES, Chau V. 2000. A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4579-4584.
- Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G, Chen H, De Camilli P, Di Fiore PP. 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* **416**:451-455.
- Prakash S, Prakash L. 2000. Nucleotide excision repair in yeast. *Mutat Res* **451**:13-24.
- Pringa E, Martinez-Noel G, Müller U, Harbers K. 2001. Interaction of the ring finger-related U-box motif of a nuclear dot protein with ubiquitin-conjugating enzymes. *J Biol Chem* **276**:19617-19623.
- Raiborg C, Bache KG, Gillooly DJ, Madshus IH, Stang E, Stenmark H. 2002. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol* **4**:394-398.
- Rao H, Uhlmann F, Nasmyth K, Varshavsky A. 2001. Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* **410**:955-959.
- Rao H, 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.

Read MA, Brownell JE, Gladysheva TB, Hottel M, Parent LA, Coggins MB, Pierce JW, Podust VN, Luo RS, Chau V, Palombella VJ. 2000. Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta-TrCP)-dependent ubiquitination of IkappaBalpha. *Mol Cell Biol* **20**:2326-2333.

Rinchik EM, Carpenter DA, Handel MA. 1995. Pleiotropy in microdeletion syndromes: neurologic and spermatogenic abnormalities in mice homozygous for the p6H deletion are likely due to dysfunction of a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:6394-6398.

Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT. 1999. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* **18**:6455-6461.

Rosa JL, Casaroli-Marano RP, Buckler AJ, Vilaro S, Barbacid M. 1996. p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins. *EMBO J* **15**:4262-4273.

Rosa JL, Barbacid M. 1997. A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70. *Oncogene* **15**:1-6.

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

Rougelle C, Glatt H, Lalande M. 1997. The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. *Nat Genet* **17**:14-15.

Saeki Y, Saitoh A, Toh-e A, Yokosawa H. 2002. Ubiquitin-like proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun* **293**:986-992.

Saeki Y, Sone T, Toh-e A, Yokosawa H. 2002. Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **296**:813-819.

Scarafia LE, Winter A, Swinney DC. 2000. Quantitative expression analysis of the cellular specificity of HECT-domain ubiquitin E3 ligases. *Physiol Genomics* **4**:147-153.

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

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129-1136.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**:495-505.

Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. 1994. Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:8797-801.

- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. 1995. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**:81-83.
- Scheffner M, Smith S, Jentsch S. 1998. The Ubiquitin-conjugation System. In: Ubiquitin and the biology of the Cell, ed by Peters JM, Harris JR, Finley D. Plenum Press, New York, p 65-98.
- Schiaffino S, Reggiani C. 1994. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* **77**:493-501.
- Schild L, Lu Y, Gautschi I, Schneeberger E, Lifton RP, Rossier BC. 1996. Identification of a PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J* **15**:2381-2387.
- Schmidt T, Landwehrmeyer GB, Schmitt I, Trottier Y, Auburger G, Laccone F, Klockgether T, Volpel M, Epplen JT, Schols L, Riess O. 1998. An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol* **8**:669-679.
- Schwarz SE, Rosa JL, Scheffner M. 1998. Characterization of human hect domain family members and their interaction with Ubch5 and Ubch7. *J Biol Chem* **273**:12148-12154.
- Shekhtman A, Cowburn D. 2002. A ubiquitin-interacting motif from Hrs binds to and occludes the ubiquitin surface necessary for polyubiquitination in monoubiquitinated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **296**:1222-1227.
- Shih SC, Katzmann DJ, Schnell JD, Sutanto M, Emr SD, Hicke L. 2002. Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol* **4**:389-393.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* **25**:302-305.
- Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D. 1995. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* **15**:1265-1273.
- Spence J, Gali RR, Dittmar G, Sherman F, Karin M, Finley D. 2000. Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* **102**:67-76.
- Springael JY, Galan JM, Haguenaer-Tsapis R, Andre B. 1999. NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J Cell Sci* **112**:1375-1383.
- Stephen D, Jones C, Schofield JP. 1990. A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* **18**:7463-7464.
- Suzuki T, Park H, Kwofie MA, Lennarz WJ. 2001. Rad23 provides a link between the Png1 deglycosylating enzyme and the 26 S proteasome in yeast. *J Biol Chem* **276**:21601-21607.

- Thomas M, Banks L. 1999. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* **80**:1513-1517.
- Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, Banks L. 2002. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* **21**:5088-5096.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**:94-102.
- Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D. 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* **402**:421-425.
- Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J. 1996. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **271**:20235-20237.
- Van Nocker S, Sadis S, Rubin DM, Glickman M, Fu H, Coux O, Wefes I, Finley D, Vierstra RD. 1996. The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol* **16**:6020-6028.
- Van der Spek PJ, Visser CE, Hanaoka F, Smit B, Hagemeyer A, Bootsma D, Hoeijmakers JH. 1996. Cloning, comparative mapping, and RNA expression of the mouse homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* nucleotide excision repair gene RAD23. *Genomics* **31**:20-27.
- Vidal M, Braun P, Chen E, Boeke JD, Harlow E. 1996. Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10321-10326.
- Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ. 1987. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **194**:531-544.
- Vu TH, Hoffman AR. 1997. Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat Genet* **17**:12-13.
- Walkowicz M, Ji Y, Ren X, Horsthemke B, Russell LB, Johnson D, Rinchik EM, Nicholls RD, Stubbs L. 1999. Molecular characterization of radiation- and chemically induced mutations associated with neuromuscular tremors, runting, juvenile lethality, and sperm defects in *jdf2* mice. *Mamm Genome* **10**:870-878.
- Walters KJ, Kleijnen MF, Goh AM, Wagner G, Howley PM. 2002. Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry* **41**:1767-1777.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**:346-351.

- Wang G, Sawai N, Kotliarova S, Kanazawa I, Nukina N. 2000. Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum Mol Genet* **9**:1795-1803.
- Watkins JF, Sung P, Prakash L, Prakash S. 1993. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol Cell Biol* **13**:7757-7765.
- Weissman AM. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:169-178.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**:76-79.
- Wilkinson CR, Seeger M, Hartmann-Petersen R, Stone M, Wallace M, Semple C, Gordon C. 2001. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* **3**:939-943.
- Wilkinson KD. 2000. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **11**:141-148.
- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JH, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, et al. 1995. Angelman syndrome: consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am J Med Genet* **56**:237-238.
- Wu AL, Wang J, Zheleznyak A, Brown EJ. 1999. Ubiquitin-related proteins regulate interaction of vimentin intermediate filaments with the plasma membrane. *Mol Cell* **4**:619-625.
- Yamamoto Y, Huibregtse JM, Howley PM. 1997. The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing. *Genomics* **41**:263-266.
- Yaron A, Gonen H, Alkalay I, Hatzubai A, Jung S, Beyth S, Mercurio F, Manning AM, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. 1997. Inhibition of NF-kappa-B cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *EMBO J* **16**:6486-6494.
- Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y. 1998. Identification of the receptor component of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *Nature* **396**:590-594.
- Yoshida Y, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, Ito Y, Matsuoka K, Yoshida M, Tanaka K, Tai T. 2002. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* **418**:438-442.
- You J, Cohen RE, Pickart CM. 1999. Construct for high-level expression and low misincorporation of lysine for arginine during expression of pET-encoded eukaryotic proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **27**:950-954.
- You J, Pickart CM. 2001. A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains. *J Biol Chem* **276**:19871-19878.

Young P, Deveraux Q, Beal RE, Pickart CM, Rechsteiner M. 1998. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem* **273**:5461-5467.

Zur Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. **2**:342-350.

6 Zusammenfassung

Die menschliche Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP gehört zur Familie der HECT-Ligasen und ubiquitiniert im Komplex mit dem E6-Onkoprotein Krebs-assoziiertes humanes Papillomvirus (HPV) den Tumorsuppressor p53 und markiert ihn damit für den proteasomalen Abbau. In normalen (HPV-negativen) Zellen ist aber über Substrate und Interaktionspartner von E6-AP nur wenig bekannt. Mutationen im E6-AP-kodierenden Gen *UBE3A* führen zu einer schweren neurologischen Erbkrankheit, dem Angelman-Syndrom. In dieser Arbeit wurden Interaktionspartner von E6-AP im „Yeast Two Hybrid“-System identifiziert und nachfolgend charakterisiert. Dabei konnten Hinweise auf das HECT-Domänen Protein HERC2 als physiologisch relevantes Substrat von E6-AP erhalten werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das E6-AP-interagierende Protein HHR23A einen Einfluss auf das Ubiquitin-Proteasom-System hat und *in vitro* über seine Ubiquitin-assoziierte (Uba) Domäne an polyubiquitinierte Proteine bindet und sie vor Deubiquitinierung schützt. Für die Ubiquitin-ähnlichen (Ubl= ubiquitin like) Domänen von HHR23A und CHAP1 konnten spezifische Wechselwirkungen mit Ubiquitin-interagierenden Motiven (UIMs) verschiedener Proteine demonstriert werden. Somit sind UIMs neben Ubiquitin- auch spezifische Ubl-Domänen-Interaktionsmotive. Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass UIMs, zumindest *in vitro*, Ubiquitinierungssignale darstellen, die transferabel sind und von verschiedenen Ubiquitin-Protein-Ligasen erkannt werden.

7 Abstract

E6-AP is a member of the family of HECT ubiquitin protein ligases (E3). In complex with the E6 oncoprotein of cancer associated human papillomaviruses (HPV), E6-AP induces the degradation of the tumor suppressor protein p53. However, the physiological substrates and interaction partners of E6-AP in normal (i. e. HPV-negative) cells remain unclear. Interestingly, mutations in the E6-AP gene *UBE3A* that inactivate the E3 properties of E6-AP have been reported to be the cause of the Angelman syndrome, an inherited neurological disease that results in severe mental retardation. In this work, potential interaction partners of E6-AP were identified in yeast two hybrid screens. Evidence was obtained that the HECT domain protein HERC2 is a physiological substrate of E6-AP. Furthermore, an influence of the E6-AP interacting protein HHR23A on the ubiquitin-proteasome system could be shown. HHR23A was demonstrated to bind to polyubiquitinated proteins via its carboxyterminal ubiquitin associated (Uba) domain and to shield them from deubiquitination. Additionally, it was found that the ubiquitin like (Ubl) domains of HHR23A and CHAP1 specifically interact with ubiquitin-interacting motifs (UIMs) of different proteins. This reveals that UIMs are not only ubiquitin-interacting but also Ubl-interacting motifs. UIMs were also shown to be (at least *in vitro*) transferable ubiquitination signals.

8 Lebenslauf

Name und Anschrift	Sandra Glockzin Bachemer Str. 42 50931 Köln Telefon: 0221 /420 25 39	
Geboren am	11. Mai 1971 in Hamburg	
Staatsangehörigkeit	Deutsch	
Schulzeit	Grundschule in Wentorf bei Hamburg	09/77-08/81
	Hansa-Gymnasium, Hamburg	09/81-08/90
Hochschule	Studium der Betriebswirtschaft Universität Lüneburg, Vordiplom	10/90-09/92
	Studium der Biologie Universität Konstanz, Diplom Diplomarbeitsthema: „Proteasomaktivität und Apoptose“ angefertigt als externe Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Brüne in der Medizinischen Klinik IV der Universität Erlangen-Nürnberg	10/92-04/98
	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am DKFZ, Heidelberg, in der Arbeitsgruppe „Tumovirusbiochemie“ unter der Leitung von Prof. Dr. M. Scheffner	10/98-12/99
	Promotion, Universität zu Köln Promotionsthema: „Identifizierung und Charakterisierung von potentiellen Interaktionspartnern der Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP“. Durchführung der Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Scheffner am Institut für Biochemie I, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln. Betreuung der Promotion durch Prof. Dr. R. J. Dohmen, Institut für Genetik, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität zu Köln	ab 01/00

9 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jürgen Dohmen betreut worden.

(Sandra Glockzin)