

Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems unter proteotoxischem Stress

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Franziska Sotzny,

M.Sc. Biochemie und Molekulare Biologie

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Elke Krüger
2. Prof. Dr. Zoya Ignatova
3. Prof. Dr. Andreas Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2015

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
1. Einleitung	1
1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	1
1.1.1. <i>Die Ubiquitinierungskaskade</i>	1
1.1.2. <i>Aufbau des 20S Proteasoms</i>	4
1.1.3. <i>Regulatorkomplexe des 20S Proteasoms</i>	6
1.1.4. <i>Die Biogenese des 26S Proteasoms</i>	8
1.1.5. <i>Chemische Proteasominhibitoren</i>	10
1.2. Die zelluläre Stressantwort	11
1.2.1. <i>Die ER-Qualitätskontrolle (ERQC) und das ER-assoziierte Degradationssystem (ERAD)</i>	11
1.2.2. <i>Die unfolded proteine response (UPR)</i>	13
1.2.3. <i>Oxidativer Stress und die antioxidative Stressantwort</i>	15
1.2.3.1. <i>Funktion und Regulation des antioxidativen Systems</i>	17
1.2.3.2. <i>Das Proteasom als Bestandteil der antioxidativen Stressantwort</i>	18
1.3. Regulation der Genexpression des UPS	18
1.3.1. <i>Regulation der Expression des UPS von Hefe bis zu Mammalia</i>	19
1.3.1.1. <i>Der Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1</i>	20
1.3.1.2. <i>Der Transkriptionsfaktor Nrf2</i>	24
1.3.2. <i>Regulation der Genexpression des Immunoproteasoms</i>	25
1.4. Ziel der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1. Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien	27
2.2. Zellbiologische Methoden	28
2.2.1. <i>Kultivierung und Ernten von Säugetierzellen</i>	28
2.2.2. <i>Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen</i>	29
2.2.3. <i>Differenzierung von SH-SY5Y Zellen</i>	30
2.2.4. <i>Transfektion von Säugetierzellen mit Plasmid-DNA</i>	30
2.2.5. <i>Transfektion von Säugetierzellen mit siRNA</i>	31
2.2.6. <i>Cycloheximid-Abbau-Experiment</i>	32
2.2.7. <i>Metabolische [³⁵S]-Markierung</i>	32
2.2.8. <i>Messung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Durchflusszytometrie</i>	33

2.2.9.	<i>Immunozytochemie</i>	33
2.2.10.	<i>Bestimmung der Zellviabilität</i>	34
2.2.10.1.	Apoptose Assay	34
2.2.10.2.	XTT Assay	34
2.3.	Molekularbiologische Methoden	35
2.3.1.	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	35
2.3.2.	<i>Transformation von Plasmid-DNA in E. coli</i>	35
2.3.3.	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	35
2.3.4.	<i>Phenol/Chloroform/Ethanol DNA-Präzipitation</i>	36
2.3.5.	<i>Isolierung von RNA aus Säugetierzellen</i>	36
2.3.6.	<i>cDNA Synthese</i>	36
2.3.7.	<i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	36
2.3.8.	<i>Quantitative Real-Time PCR</i>	38
2.3.9.	<i>Agarosegelelektrophorese (Agarose-GE)</i>	38
2.3.10.	<i>Reportergen-Assay</i>	39
2.3.11.	<i>Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)</i>	39
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	41
2.4.1.	<i>Zellyse und subzelluläre Fraktionierung</i>	41
2.4.1.1.	Denaturierende und nicht-denaturierende Zellyse	41
2.4.1.2.	Fraktionierung von nicht-nukleären und nukleären Proteinen.....	42
2.4.1.3.	Fraktionierung von cytosolischen, Membran- und nukleären Proteinen	42
2.4.1.4.	Subzelluläre Fraktionierung	42
2.4.2.	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	43
2.4.3.	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	43
2.4.4.	<i>NATIV-Polyacrylamidgelelektrophorese (NATIV-PAGE) und in Gel</i> <i>Aktivitätsmessung</i>	43
2.4.5.	<i>Immunoblot</i>	44
2.4.6.	<i>OxyBlot</i>	46
2.4.7.	<i>Immunopräzipitation von 20S Proteasomen</i>	47
2.5.	Statistische Analyse	47
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Die Abnahme der Proteasomaktivität resultiert in einer TCF11/Nrf1-abhängigen Induktion der proteasomalen Genexpression in verschiedenen Zelltypen	48
3.1.1.	<i>Die Aktivierung von TCF11/Nrf1 durch Proteasominhibition stellt einen genereller</i> <i>Regulationsmechanismus dar</i>	48
3.1.2.	<i>Die Aktivierung von TCF11/Nrf1 durch Proteasominhibition in SH-SY5Y Zellen</i>	53

3.1.3.	<i>Die Depletion der 26S/30S Komplexe stabilisiert TCF11/Nrf1 und induziert die Expression proteasomaler Untereinheiten.....</i>	59
3.2.	Regulation der TCF11/Nrf1-abhängigen Genexpression.....	61
3.2.1.	<i>TCF11/Nrf1-abhängige Regulation der Proteasomexpression unter ER-Stress..</i>	61
3.2.1.1.	Proteasominhibition führt zur Anschaltung der UPR.....	61
3.2.1.2.	Die TCF11/Nrf1-abhängige Proteasomexpression wird nicht durch Thapsigargin und Tunicamycin aktiviert.....	63
3.2.2.	<i>TCF11/Nrf1-abhängige Regulation der Proteasomexpression unter oxidativem Stress.....</i>	64
3.2.2.1.	Proteasominhibition verursacht intrazellulären oxidativen Stress.....	64
3.2.2.2.	Intrazellulärer oxidativer Stress fördert die TCF11/Nrf1-abhängige Induktion der PSMB6/β1 Genexpression.....	66
3.2.3.	<i>Das Pro-Oxidans Rotenon induziert eine frühe TCF11/Nrf1-vermittelte Expression proteasomaler Untereinheiten.....</i>	70
3.2.3.1.	Rotenon verursacht intrazellulären oxidativen und proteotoxischen Stress.....	70
3.2.3.2.	Eine kurze Rotenonbehandlung induziert die nukleäre Lokalisation von TCF11/Nrf1.....	72
3.2.3.3.	TCF11/Nrf1 induziert die Proteasomexpression in Rotenon-behandelten SH-SY5Y Zellen.....	73
3.2.3.4.	Nrf2 ist neben TCF11/Nrf1 an der Regulation der Rotenon-induzierten Expression proteasomaler Untereinheiten beteiligt.....	79
3.2.3.5.	Eine lang andauernde Rotenonbehandlung führt zu der Abnahme der TCF11/Nrf1 Proteinmenge.....	80
3.2.3.6.	TCF11/Nrf1 schützt vor Rotenon-induziertem Zelltod.....	82
4.	Diskussion.....	84
4.1.	Ein autoregulatorischer Rückkopplungsmechanismus gewährleistet die Aufrechterhaltung der Proteasom Homöostase in verschiedenen Zelltypen.....	84
4.2.	Das Proteasomsystem in neuronalen Zellen.....	88
4.3.	Intrazellulärer oxidativer Stress, aber nicht Thapsigargin- oder Tunicamycin-induzierter ER-Stress, fördert die TCF11/Nrf1-abhängige Expression proteasomaler Untereinheiten.....	90
4.3.1.	<i>Thapsigargin und Tunicamycin induzieren nicht die TCF11/Nrf1-vermittelte Expression proteasomaler Untereinheiten.....</i>	91
4.3.2.	<i>Oxidativer Stress fördert die Proteasominhibitor-induzierte Expression proteasomaler Untereinheiten.....</i>	92

4.4. Die Expression proteasomaler Untereinheiten wird durch das Pro-Oxidans Rotenon in SH-SY5Y Zellen induziert	94
4.4.1. <i>TCF11/Nrf1 reguliert die Rotenon-induzierte Proteasomexpression</i>	95
4.4.2. <i>Andauernde Rotenonexposition führt zu zellulären Stress und Zelltod</i>	97
4.4.3. <i>Die Wechselbeziehung zwischen TCF11/Nrf1 und Nrf2 in der Regulation der Expression proteasomaler Untereinheiten.....</i>	100
4.5. Fazit der Arbeit	103
5. Literaturverzeichnis	104
6. Abkürzungsverzeichnis	119
7. Anhang.....	122
8. Lebenslauf	124
9. Veröffentlichungen	125
10. Danksagung.....	126
11. Eidesstattliche Erklärung	127

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) stellt neben dem lysosomalen Proteinabbau eines der wichtigsten zellulären Abbausysteme dar. Es vermittelt die Degradation fehlgefalteter, beschädigter sowie regulatorischer Proteine. Folglich ist es essentiell für die Proteinqualitätskontrolle und für eine Vielzahl zellulärer Prozesse, beispielsweise dem Zellzyklus, der Zelldifferenzierung sowie der Stress- und Immunantwort. Eine Störung des UPS steht im engen Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen und malignen Tumoren.

Adaptive Mechanismen ermöglichen es der Zelle das UPS an den stetig schwankenden Bedarf proteolytischer Aktivität anzupassen. So wirkt eine erhöhte Expression proteasomaler Gene einem Abfall der proteasomalen Aktivität entgegen. Als Hauptregulator dieses adaptiven Regulationsmechanismus wurde der Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 identifiziert. Unter physiologischen Bedingungen ist TCF11/Nrf1 in der ER-Membran lokalisiert und wird zügig über das ER-assoziierte Degradationssystem (ERAD) abgebaut. In Antwort auf Proteasominhibition wird der Transkriptionsfaktor über einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus aktiviert und in den Nucleus transferiert. Hier vermittelt er durch Bindung der regulatorischen *antioxidative response elements* (ARE) die Genexpression proteasomaler Untereinheiten und schließlich die Neubildung von Proteasomkomplexen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass es sich bei diesem autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus um einen generellen adaptiven Regulationsmechanismus in Mammalia handelt. Da das UPS sehr wichtig für die Entwicklung und Funktion von Neuronen ist, wurden die dopaminergen SH-SY5Y Zellen hinsichtlich der TCF11/Nrf1-abhängigen Regulation der Proteasomsynthese in Antwort auf Proteasominhibition charakterisiert. Zudem ergaben Untersuchungen dieser Arbeit, dass der durch Proteasominhibition hervorgerufene oxidative Stress, die TCF11/Nrf1-vermittelte Aktivierung der Expression proteasomaler Gene fördert. Die induzierende Wirkung von oxidativem Stress wurde ferner unter Verwendung des Pro-Oxidans Rotenon bekräftigt. Dieses Neurotoxin, welches in Modellen zur Erforschung von Morbus Parkinson verwendet wird, induziert die Transkription proteasomaler Untereinheiten und folglich die Neubildung aktiver Proteasomkomplexe. Die Rotenon-induzierte Adaptation des Proteasomsystems war dabei abhängig von TCF11/Nrf1. Der Transkriptionsfaktor förderte ferner die Zellviabilität Rotenon-behandelter Zellen.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die TCF11/Nrf1-vermittelte Genexpression proteasomaler Untereinheiten einen bedeutenden Bestandteil der antioxidativen Stressantwort darstellt. Die Stress-induzierte Zunahme der Proteasomsynthese ermöglicht einen verstärkten Abbau oxidierter sowie fehlerhafter Proteine und fördert dadurch die Wiederherstellung der Redox- sowie der Protein Homöostase.

ABSTRACT

The ubiquitin proteasome system (UPS) represents the major non-lysosomal protein degradation machinery. It facilitates the degradation of misfolded and damaged as well as regulatory proteins, thereby ensuring protein quality control and regulation of various cellular processes, such as cell cycle progression, differentiation as well as stress and immune responses. Disturbances of the UPS are strongly associated with neurodegeneration and cancer.

Adaptive mechanisms enable the cell to deal with changing demand in proteolytic activity. A rise in proteasomal gene expression compensates for decreased proteasomal activity. This adaption is mainly regulated by the transcription factor TCF11/Nrf1. Under unstressed conditions TCF11/Nrf1 resides in the ER-membrane where it is degraded via the ER-associated protein degradation system (ERAD). Proteasome inhibition causes the nuclear translocation of TCF11/Nrf1. In the nucleus, it mediates transcriptional activation of proteasomal genes by interacting with their regulatory antioxidant response elements (ARE) and finally promotes the formation of newly synthesized proteasome complexes. Within this thesis, it was shown, that this autoregulatory feedback loop represents a general adaptive mechanism in mammalian cells. The relevance of this adaptive response mechanism was further characterized for the dopaminergic SH-SY5Y cell line, because the UPS is important for the development and function of neuronal cells. Moreover, experiments using antioxidative compounds revealed, that the oxidative stress induced by proteasomal inhibition promotes the TCF11/Nrf1-dependent proteasomal gene expression. The inducing effect of oxidative stress was verified using the pro-oxidant rotenone. This neurotoxin, commonly used in model systems for Parkinson's Disease, activates the transcription of the proteasomal genes resulting in the formation of newly synthesised, active proteasome complexes. Thus, TCF11/Nrf1 exerts a cytoprotective function in response to oxidative and proteotoxic stress.

In conclusion, this thesis revealed that TCF11/Nrf1-dependent induction of the proteasome expression is an important part of the oxidative stress response. The adaptation of the proteasome system enables the accelerated degradation of oxidant-damaged and misfolded proteins, promoting the recovery of the redox as well as protein homeostasis.

1. Einleitung

1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Lange Zeit galten körpereigene Proteine als hochstabile, statische Strukturen. Erst durch die Markierung von Proteinen mit stabilen Isotopen wurde an der bis dahin herrschenden Meinung gerüttelt (Schoenheimer et al., 1939). In den darauffolgenden Jahren wurde schnell deutlich, dass intrazelluläre Proteine ständig umgesetzt werden und dass die Synthese und der Abbau von Proteinen sehr komplexe und hochregulierte Prozesse darstellen (Ciechanover, 2005). Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist neben dem lysosomalen System eines der wichtigsten Abbausysteme der Zelle. Es vermittelt die regulierte Degradation fehlerhafter bzw. fehlgefalteter, beschädigter sowie zahlreicher regulatorischer Proteine. Daher ist das UPS unverzichtbar für eine Vielzahl zellulärer Prozesse, beispielsweise der Transkriptionsregulation, der Zellteilung sowie -differenzierung, der Immunantwort und der zellulären Stressantwort. Der Abbau der UPS-Substrate erfolgt in zwei Schritten. Zunächst werden zu degradierende Proteine durch eine ATP-abhängige Enzymkaskade mit einer Polyubiquitinkette markiert. Anschließend werden die ubiquitinierten Substrate von dem 26S Proteasom erkannt und zu kurzen Peptiden abgebaut, die entweder auf der Zelloberfläche präsentiert oder durch Aminopeptidasen in freie Aminosäuren zerlegt werden (Chondrogianni and Gonos, 2012; Klotzel, 2004).

1.1.1. Die Ubiquitinierungskaskade

Um 1980 entdeckten Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose, dass das kleine kompakte hitzestabile Protein (76 Aminosäuren) Ubiquitin eine bedeutende Rolle im ATP-abhängigen Proteinabbau spielt. In einem zellfreien Retikulozytensystem beobachteten sie den regulierten Abbau von Substraten, die kovalent mit Ubiquitin verknüpft waren. In den darauffolgenden Jahren folgten zahlreiche weitere Arbeiten auf dem Gebiet des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus. Schnell wurde auch der Mechanismus zur Markierung von Substraten mit Ubiquitin aufgedeckt (Hershko, 1996). Im Jahre 2004 wurde dem Trio für ihre bahnbrechende Entdeckung der Nobelpreis für Chemie verliehen (Giles, 2004).

In Mammalia existieren vier Ubiquitin-Gene die entweder für ein Fusionsprotein, bestehend aus Ubiquitin und einer ribosomalen Untereinheit, oder für ein Polyubiquitin kodieren. Nach der Synthese werden die einzelnen Ubiquitinmoleküle durch spezielle Proteasen, den Deubiquitinasen, generiert (Baker and Board, 1987; Redman and Rechsteiner, 1989; Shabek and Ciechanover, 2010; Wiborg et al., 1985). In einer komplexen dreistufigen Enzymkaskade, bestehend aus einem Ubiquitin-aktivierenden, -konjugierenden und -ligierenden Enzym, wird das Ubiquitinmolekül über eine Isopeptidbindung mit einem

Lysinrest des Zielproteins verknüpft (Abb. 1.1). Das humane Genom kodiert für nur zwei Ubiquitin aktivierende, jedoch für 37 Ubiquitin-konjugierende Enzyme und mehr als 600 E3 Ubiquitin Ligasen (Komander, 2009). Der erste ATP-abhängige Schritt dient der Aktivierung von Ubiquitin und wird von dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 katalysiert. Dabei wird eine energiereiche Thioesterbindung zwischen dem C-Terminus des Glycinrestes von Ubiquitin und dem Cysteinrest im aktivem Zentrum des Enzyms gebildet (Ciechanover et al., 1981). Ubiquitin wird anschließend unter Ausbildung einer neuen Thioesterbindung auf den Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden E2 Enzyms transferiert. Der Transfer des Ubiquitinmoleküls auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Substrates wird letztlich von einer E3 Ubiquitin Ligase vermittelt (Hershko et al., 1983). Man unterscheidet zwei Klassen an E3 Ubiquitin Ligasen, die RING (*really interesting new gene*) Finger Domänen und die HECT (*homologous to the E6AP carboxyl terminus*) Domänen E3 Ligasen (Abb. 1.1; (Metzger et al., 2012)). Die RING Finger Domäne der RING Finger E3 Ligasen wird geformt durch konservierte Cystein- und Histidinreste die zwei Zinkionen binden und dient als Interaktionsstelle für das E2 Enzym. Durch zusätzliche Assoziation der E3 Ligase mit einem spezifischen Substrat ermöglicht sie Ligase einen engen Kontakt beider Komponenten und unterstützt so die direkte Übergabe des Ubiquitinmoleküls von dem E2 Enzym auf das Substrat (Abb. 1.1; (Metzger et al., 2012)). Zu der Familie der RING E3 Ligasen gehören monomere Enzyme sowie multimerer Enzymkomplexe. Zu den monomeren Mitgliedern zählt beispielsweise die membranständige E3-Ligase HRD1/SYVN1 (*HMG-coA reductase degradation 1 homolog/Synoviolin*) des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Bordallo and Wolf, 1999). Ein bekannter Vertreter multimerer RING E3 Ligasen ist der SCF Komplex, bestehend aus SKP1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), Cullin 1 und einem F-Box Protein. Cullin 1, welches als Gerüst dient, interagiert C-terminal mit dem RING E3 Enzym Rbx1 (*RING box protein 1*) und N-terminal mit der Adapteruntereinheit SKP1. Rbx1 vermittelt über seine RING Finger Domäne die Bindung des E2 Enzyms. SKP1 assoziiert des Weiteren mit einem F-Box Protein, welches die spezifische Substratbindung vermittelt (Cardozo and Pagano, 2004). HECT E3 Ligasen stellen mit etwa 30 Mitgliedern eine Minderheit der E3 Enzyme dar. Sie katalysieren die Ubiquitinierung der Substrate durch Ausbildung eines intermediären Thioesters (Abb. 1.1). Dabei bindet das E2 Enzym an die C-terminale HECT Domäne und überträgt das Ubiquitin auf den aktiven Cysteinrest. Im Anschluss wird das Ubiquitin an ein spezifisches Substrat, welches über den N-Terminus mit der E3 Ligase assoziiert, übertragen (Rotin and Kumar, 2009).

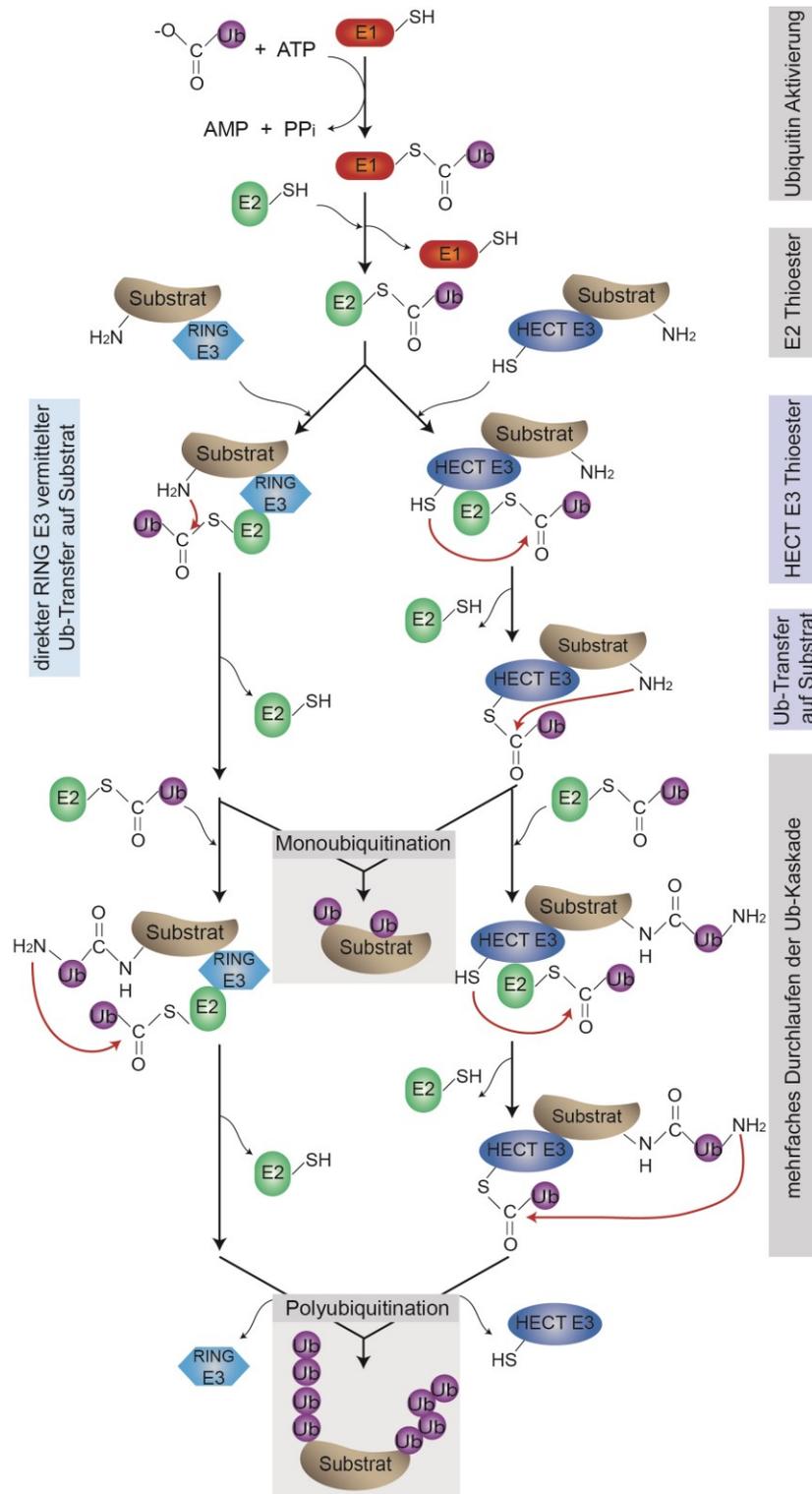


Abb. 1.1: Die Ubiquitinierungskaskade von Proteinen. Im ersten Schritt erfolgt die ATP-abhängige Aktivierung von Ubiquitin (Ub). Dabei wird der Ub C-Terminus mit dem aktiven Cysteinrest des E1 Enzyms verknüpft. Ub wird im Folgenden an das E2 Enzym, unter Bildung eines E2-Ub-Thioesters, übergeben. Durch Interaktion des Ub-konjugierten E2 Enzyms mit einer Substrat-spezifischen E3 Ligase wird Ub auf die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes im Substrat transferiert. Der Transfer verläuft im Fall der HECT E3 Ligasen über einen intermediären Ub-Thioester (rechts). Im Gegensatz dazu, vermitteln die RING E3 Ligasen den direkten Ub-Transfer von dem E2 Enzym auf das Substrat (links). Ein einziger Durchlauf der Enzymkaskade resultiert in einem monoubiquitiniertem Substrat. Durch mehrfaches Wiederholen der Kaskade werden mehrere Ubs über eines der sieben Lysinreste miteinander verknüpft. Die dabei gebildeten Polyubiquitinketten unterscheiden sich abhängig von ihrer Verknüpfung in ihrer Konformation und Funktion. [modifiziert nach (Metzger et al., 2012)]

Durch mehrfaches Durchlaufen der Enzymkaskade werden mehrere Ubiquitinmoleküle aneinander ligiert (Polyubiquitinierung). Die Verlängerung der Ubiquitinkette wird teilweise durch ein E4 Enzym katalysiert (Koepl et al., 1999). Da Ubiquitin sieben Lysinreste besitzt: Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 und Lys63, können unterschiedliche Konformationen ausgebildet werden. Die Lys48-verknüpften Polyubiquitinketten markieren Proteine hauptsächlich für den proteasomalen Abbau (Chau et al., 1989). Ubiquitin wird hierbei selbst nicht abgebaut, sondern durch deubiquitinierende Enzyme von dem Substrat abgespalten und recycelt (Shabek and Ciechanover, 2010).

Nicht-proteolytische Funktionen sind einerseits für Modifizierungen von Proteinen mit einzelnen Ubiquitinmolekülen (Monoubiquitinierung) und andererseits für speziell-verknüpfte Polyubiquitinketten beschrieben. Monoubiquitinierte Proteine sind beispielsweise involviert in der DNA-Reparatur. Auch Lys63-verknüpfte Ubiquitinketten spielen eine Rolle in der DNA-Reparatur und anderen zellulären Prozessen, wie dem NF- κ B Signalweg. Eine negative Regulation von AMPK (*AMP-activated protein kinase*)-verwandter Kinasen wird durch Modifizierung der Enzyme mit Lys29- und Lys33-verknüpften Ubiquitinketten erzielt (Chen and Sun, 2009). Allerdings können auch Lys11, Lys29 und Lys33-verknüpfte Ketten als Signal für den proteasomalen Abbau (Xu et al., 2009) und mit Lys63-verknüpfte Ketten für den lysosomalen Abbau dienen (Barriere et al., 2007).

1.1.2. Aufbau des 20S Proteasoms

Der zylindrische 20S Kernkomplex ist als zentraler Akteur des UPS in seiner Struktur evolutionär hochkonserviert. Er besteht aus vier übereinander angeordneten heptameren Ringen. Die beiden inneren β -Ringe beherbergen das proteolytisch aktive Zentrum und werden durch die beiden äußeren α -Ringe flankiert (Abb. 1.2; (Groll et al., 1997; Lowe et al., 1995; Unno et al., 2002)). Die heptameren Ringe des archaebakteriellen Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum* werden aus nur einer α - bzw. einer β -Untereinheit geformt. Die Ringe des eukaryotischen Proteasoms bestehen hingegen aus jeweils sieben homologen, unterschiedlichen α (α 1- α 7)- bzw. β (β 1- β 7)-Untereinheiten. Innerhalb einer Gruppe weisen die proteasomalen Untereinheiten der Eukaryoten eine enge genetischen Verwandtschaft zu den beiden proteasomalen Genen des Archaeobakteriums auf (Heinemeyer et al., 1994; Zwickl et al., 1992).

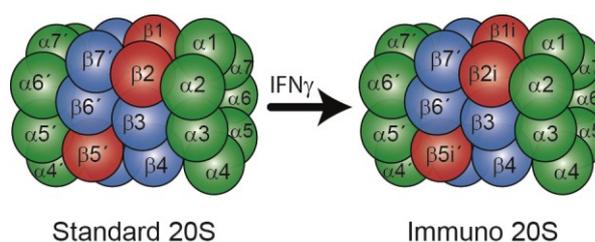
Die beiden äußeren α -Ringe kontrollieren die Zugänglichkeit zu den proteolytisch aktiven Zentren und bilden eine Interaktionsplattform für regulatorische Faktoren. Der Zugang zu der katalytischen Kammer des freien 20S Kernkomplexes wird für Substrate durch die N-Termini der α -Untereinheiten verschlossen. Strukturelle und biochemische Analysen zeigten, dass die α 3 Untereinheit eine kritische Rolle für die Koordination der N-Termini spielt und somit

essentiell für das Verschließen der Pore ist. Das Öffnen des Zugangs erfolgt durch Konformationsänderungen, die aus einer Interaktion mit Regulatorkomplexen resultieren (Groll et al., 2000a; Groll et al., 1997).

Drei der sieben β -Untereinheiten, namentlich $\beta 1$ (δ), $\beta 2$ (Z) und $\beta 5$ (MB1), besitzen eine proteolytische Aktivität. Der nukleophile Angriff während der Hydrolyse der Peptidbindung erfolgt durch die N-terminalen Threoninreste der aktiven β -Untereinheiten (Lowe et al., 1995; Seemuller et al., 1995). Das Proteasom wird aufgrund seines Hydrolysemechanismus der Familie der N-terminalen Hydrolasen zugeordnet (Brannigan et al., 1995). Die katalytischen Untereinheiten unterscheiden sich in ihrer Spaltpräferenz. $\beta 1$ (δ) schneidet bevorzugt nach sauren Aminosäuren (Caspase-ähnliche Aktivität), $\beta 2$ (Z) nach basischen Aminosäuren (Trypsin-ähnliche Aktivität) und $\beta 5$ (MB1) nach hydrophoben Aminosäuren (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) (Groll et al., 1997; Heinemeyer et al., 1997; Wilk and Orłowski, 1983).

In Mammalia existieren drei weitere proteolytisch aktive β -Untereinheiten: LMP2 ($\beta 1i$), MECL1 ($\beta 2i$) und LMP7 ($\beta 5i$). Diese sogenannten Immuno-Untereinheiten werden durch Zytokine, wie Interferon- γ ($IFN\gamma$), induziert und schnell anstelle der homologen, Standard β Untereinheiten ($\beta 1$ (δ), $\beta 2$ (Z), $\beta 5$ (MB1)) in das naszierende Proteasom eingebaut (Abb. 1.2). Der entstandene Proteasomkomplex wird als Immunoproteasom bezeichnet und spielt eine bedeutende Rolle in der MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I Antigenpräsentation, sowie der Aufrechterhaltung der Protein Homöostase (Aki et al., 1994; Kruger and Kloetzel, 2012).

Abb. 1.2: Das Standard 20S Proteasom und Immunoproteasom. Der 20S Kernkomplex besteht aus vier heptameren Ringen. Den beiden äußeren α -Ringen (grün) und den beiden inneren β -Ringen (blau). Letztere enthalten die proteolytisch aktiven β -Untereinheiten (rot). Nach einem inflammatorischen Stimulus (z.B.: $IFN\gamma$) werden die konstitutiven Standard β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) während der Assemblierung durch die Immuno-Untereinheiten ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) ersetzt. [modifiziert nach (Kloetzel, 2004)]



Während die Gene der meisten proteasomalen Untereinheiten über das Genom verstreut vorliegen, befinden sich die kodierenden Gene der LMP2 ($\beta 1i$) und LMP7 ($\beta 5i$) Untereinheiten in der MHC Klasse II Region auf dem Chromosom 6 (Glynne et al., 1991; Kelly et al., 1991). Das Gen für die dritte induzierbare β -Untereinheit MECL1 ($\beta 2i$) ist hingegen auf dem Chromosom 16 lokalisiert (Groettrup et al., 1996). Während das Standard Proteasom in allen Zelltypen vorkommt, ist eine basale Expression des Immunoproteasoms hauptsächlich in Zellen des Immunsystems der lymphatischen und myeloiden Linie zu beobachten. In anderen kernhaltigen Zellen wird durch Zytokine schnell eine transiente

Zunahme des Immunoproteasoms induziert (Heink et al., 2005; Kruger and Kloetzel, 2012). Das Immunoproteasom unterscheidet sich in seiner Substrat- und Schnittpräferenz von dem Standard Proteasom. So bevorzugt die Substratbindungstasche der LMP2 (β 1i) Untereinheit kleine hydrophobe Aminosäuren und resultiert folglich in einer Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität. Zwar weisen die LMP7 (β 5i) und die β 5 (MB1) Untereinheit ebenfalls Unterschiede in ihren Substratbindungsstellen auf, diese verändern jedoch nicht den Chymotrypsin-ähnlichen Charakter ihrer Aktivität. Dennoch begünstigen strukturelle Veränderungen um das katalytische Threonin der LMP7 (β 5i) Untereinheit die Hydrolyse der Peptidbindungen (Huber et al., 2012). Neben dem Immunoproteasom und dem Standard Proteasom existieren auch Proteasom Mischtypen, welche nur ein oder zwei Immuno-Untereinheiten aufweisen (Dahlmann et al., 2000).

1.1.3. Regulatorkomplexe des 20S Proteasoms

Das 20S Proteasom kann polyubiquitinierte Substrate weder erkennen noch binden. Außerdem ist das katalytische Zentrum des freien 20S Kernkomplex für Substrate unzugänglich und folglich proteolytisch inaktiv (Groll et al., 2000a). Erst durch Interaktion eines Regulatorkomplexes wird das katalytische Zentrum für das Substrat erreichbar. Dieser strukturelle Kontrollmechanismus verhindert somit einen unkontrollierten Proteinabbau (Stadtmueller and Hill, 2011).

Neben verschiedenen ATP-unabhängigen Regulatoren, stellt der 19S regulatorische Partikel (PA700) den Hauptaktivator des 20S Komplexes dar. Der etwa 700 kDa große Komplex besteht aus zwei Subkomplexen, dem *Base* und dem *Lid* (Abb. 1.3; (Glickman et al., 1998a)). Ersterer ist aus einem hexameren AAA-ATPase Ring (Rpt1-6) sowie Rpn1, Rpn2, Rpn10 und Rpn13 aufgebaut. Der ATPase Ring des *Base*-Subkomplexes vermittelt die Interaktion des 19S Partikels mit dem α -Ring des 20S Kernkomplexes (Glickman et al., 1998a; Glickman et al., 1998b; Hartmann-Petersen et al., 2001). Der 19S Regulator kann hierbei einseitig, unter Bildung des 26S, oder beidseitig, unter Bildung des 30S Proteasoms, an den 20S Kernkomplex binden. Die Interaktion der hexameren ATPasen bewirkt eine ATP-abhängige Konformationsänderung des α -Rings, die die katalytische Kammer zugänglich macht. Während das Öffnen der Pore allein durch Bindung von ATP erreicht wird, bedarf das 19S-vermittelte entfalten und translozieren des Substrates der ATP Hydrolyse (Braun et al., 1999; Chu-Ping et al., 1994; Lam et al., 2002; Smith et al., 2005).

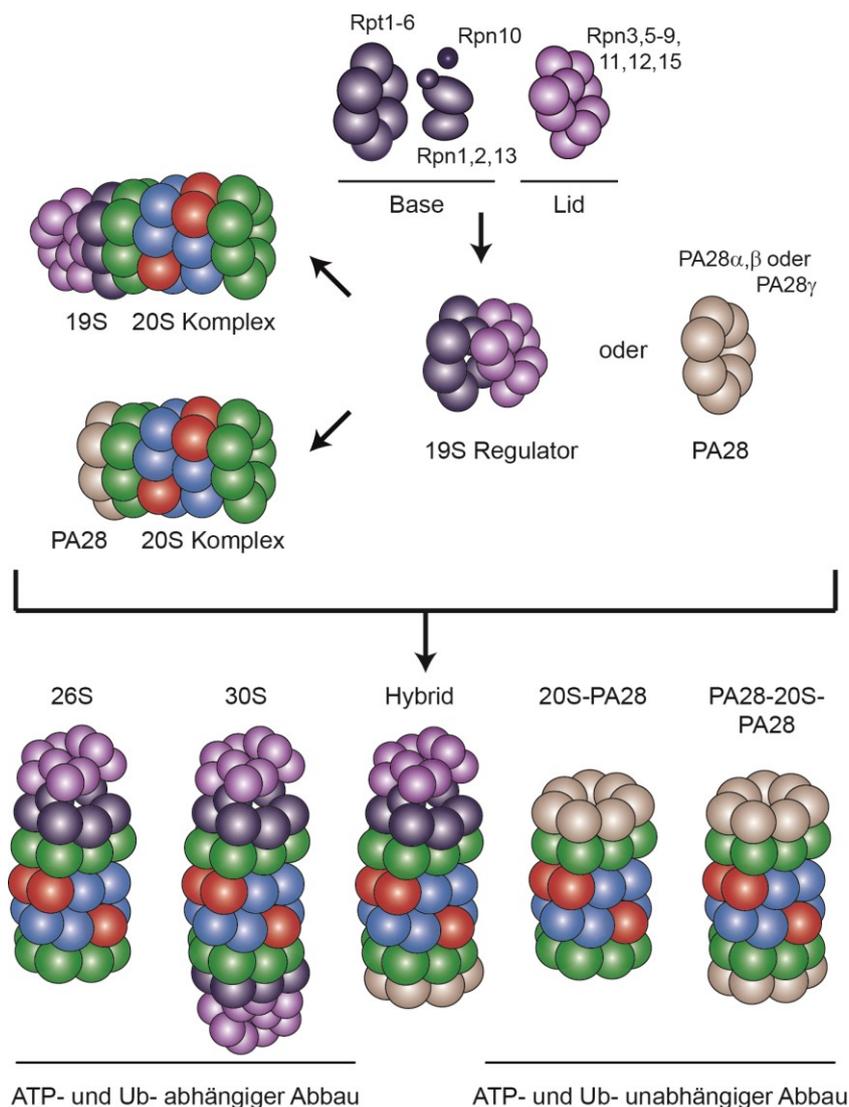


Abb. 1.3: Die Regulatorkomplexe des 20S. Zu den Regulatoren des 20S Kernkomplex gehören der 19S regulatorische Partikel, bestehend aus dem Base und dem Lid Subkomplex, der PA28 α/β und der PA28 γ Aktivator. Alle Regulatorkomplexe können einseitig oder beidseitig mit dem Kernkomplex interagieren. 19S assoziierte 20S Komplexe (26S, 30S und Hybridproteasom) katalysieren den ATP- und Ubiquitin (Ub)-abhängigen Proteinabbau, während der PA28-vermittelte Abbau von Proteinen ATP- sowie Ub-unabhängig verläuft (Hybridproteasom, PA28-20S(-PA28)). [modifiziert nach (Kloetzel, 2001)]

Die nicht-ATPasen Rpn1 und Rpn2 koordinieren die Rekrutierung sowie die Translokation der Substrate (Rosenzweig et al., 2008). Die Bindung Ubiquitin-konjugierter Substrate wird durch die *Base*-Untereinheiten Rpt5, Rpn10 sowie Rpn13 und durch die *Lid*-Untereinheit Rpn15/DSS1 vermittelt (Deveraux et al., 1994; Husnjak et al., 2008; Lam et al., 2002; Paraskevopoulos et al., 2014). Der *Lid*-Subkomplex liegt oberhalb des *Base*-Komplexes und besteht aus den Untereinheiten Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 und Rpn15/DSS1. Die Rpn11 Untereinheit weist eine Metallopeptidaseaktivität auf und vermittelt das Abspalten der kompletten Ubiquitinkette von dem Substrat (Funakoshi et al., 2004; Glickman et al., 1998a; Verma et al., 2002). Daneben assoziieren auch die Deubiquitinasen Ubp6/Usp14 und Uch37

mit dem 19S Komplex. Diese entfernen die Ubiquitinmoleküle ausgehend von dem distalen Ende der Ubiquitinkette (Shabek and Ciechanover, 2010; Yao et al., 2006).

Der PA28 Komplex (11S) stellt einen ATP- und Ubiquitin-unabhängigen Aktivator des 20S Kernkomplexes dar. Dieser besteht aus IFN- γ induzierbaren α - und β -Untereinheiten, die sich zu einem heptameren Ring zusammenlagern. Der PA28 α,β Aktivator spielt eine Rolle bei der Antigenprozessierung (Dubiel et al., 1992; Groettrup et al., 1995). Das 20S Proteasom kann gleichzeitig an einem Ende mit einem PA28 Aktivator sowie an dem anderen Ende mit einem 19S regulatorischen Partikel interagieren. Der resultierende Komplex wird als Hybridproteasom bezeichnet (Abb. 1.3; (Hendil et al., 1998)). Neben den PA28 α,β Untereinheiten existiert die PA28 γ Untereinheit, die nicht durch IFN- γ induziert wird, einen homoheptameren Ring ausbildet und hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist. Auch die PA28 γ vermittelte Induktion der proteolytischen Aktivität ist unabhängig von ATP und Ubiquitin (Nikaido et al., 1990; Tanahashi et al., 1997).

Des Weiteren fungiert PA200 als ATP-unabhängiger Aktivator des 20S Kernkomplexes. Jedoch scheint dessen Assoziation nur den Abbau von Peptiden zu ermöglichen (Stadtmueller and Hill, 2011).

1.1.4. Die Biogenese des 26S Proteasoms

Die Biogenese des Proteasoms erfolgt in einem hochorganisierten, komplexen Prozess, bestehend aus der Proteinbiosynthese, der Assemblierung und Reifung des Proteasoms. Sie beginnt mit der Expression der Untereinheiten (siehe Kapitel 1.3). Hierbei werden fünf der sieben β -Untereinheiten, namentlich β 1, β 2, β 5, β 6 und β 7, als Proform (Pro) mit einer N-terminalen Verlängerung synthetisiert. Die frisch exprimierten proteasomalen Untereinheiten durchlaufen im Anschluss einen koordinierten, durch Helferproteine unterstützten Assemblierungs- und Reifungsprozess, welcher die Zymogenaktivierung der β -Proformen beinhaltet. Die Biogenese resultiert letztlich in neugebildeten, aktiven Proteasomkomplexen (Abb. 1.4; (Gu and Enenkel, 2014)).

Die Assemblierung des 20S Kernkomplexes in Mammalia beginnt mit der Ausbildung der α -Ringe, unterstützt durch die Helferproteine PAC1-PAC4 (PAC: *proteasome assembly chaperone*) (Hirano et al., 2006; Hirano et al., 2005). Das Heterodimer PAC1-PAC2 assoziiert an der äußeren Oberfläche des α -Rings und bestimmt durch direkten Kontakt mit den N-Termini von α 4, α 5, α 6 und α 7 die Struktur des α -Rings. Es assoziiert während des kompletten Assemblierungsprozesses mit dem naszierenden 20S Komplex und verhindert die Dimerisierung der α -Ringe sowie die Bindung von Aktivatoren an den unreifen 20S Kernkomplex (Stadtmueller et al., 2012). Das PAC3-PAC4 Dimer ist an der Innenseite des α -

Rings lokalisiert und koordiniert neben PAC1-PAC2 den Einbau der α -Untereinheiten. Zudem fördert es die korrekte Positionierung der Pro- β 2 Untereinheit und dissoziiert mit der Anlagerung der β 3 Untereinheit (Hirano et al., 2008).

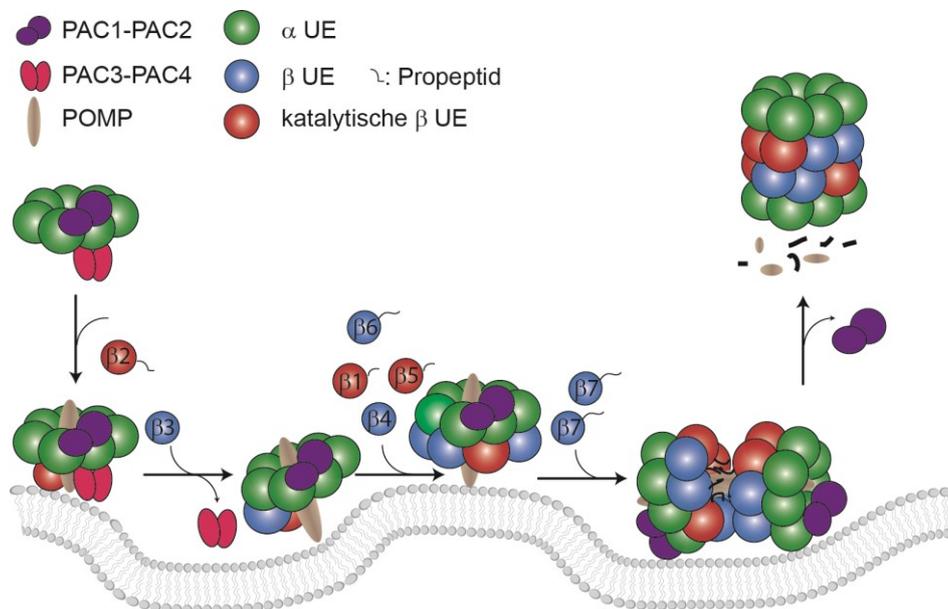


Abb. 1.4: Assemblierung des 20S Proteasoms. Die Assemblierung des 20S Kernkomplexes wird durch die Assemblierungshelfer PAC1-PAC2, PAC3-PAC4 und POMP unterstützt. Im ersten Schritt wird der α -Ring mit Unterstützung von PAC1-PAC4 aus den sieben α -Untereinheiten (UE) gebildet. Anschließend interagiert POMP mit dem α -Ring und vermittelt die Assoziation des naszierenden Proteasoms mit der ER-Membran. Mit POMP interagiert auch die erste β -UE Pro- β 2 mit dem α -Ring. Die β -UEs werden dann in festgelegter Reihenfolge: β 3, β 4, Pro- β 5, Pro- β 6, und Pro- β 1 eingebaut. Pro- β 7 assoziiert während der Dimerisierung zweier halber Proteasom-Vorläuferkomplexe. Durch proteolytische Prozessierung der Propeptide und Degradation von POMP wird die Biogenese des 20S Kernkomplexes schließlich vollendet. [modifiziert nach (Fricke et al., 2007)]

Der α -Ring bildet eine Plattform für den Einbau der β -Untereinheiten. Koordiniert wird dieser durch das Chaperon POMP/UMP1 (*proteasome maturation protein*) (Witt et al., 2000) und intramolekular durch die N-terminalen Propeptide und C-Termini der β -Untereinheiten (Hirano et al., 2008). Des Weiteren vermittelt POMP/UMP1 die Lokalisation der naszierenden 20S Kernkomplexe an der ER-Membran (Fricke et al., 2007). Die β -Untereinheiten werden entsprechend einer festgelegten Reihenfolge eingebaut. Zuerst binden POMP/UMP1 und Pro- β 2 an den α -Ring, gefolgt von β 3, β 4, Pro- β 5, Pro- β 6, und Pro- β 1. Während der Dimerisierung zweier halber Proteasom-Vorläuferkomplexe werden letztlich die Pro- β 7 Untereinheiten eingebaut. (Frentzel et al., 1994; Hirano et al., 2008; Nandi et al., 1997). Durch proteolytische Prozessierung der β -Propeptide und durch Abbau des Assemblierungshelfers POMP/Ump1 wird die Biogenese des 20S Kernkomplex schließlich vollendet (Schmidtke et al., 1996; Witt et al., 2000). Wie Untersuchungen in Hefe ergaben, dissoziiert das PAC1-PAC2 Dimer nun von dem 20S Komplex und steht für eine neue Assemblierungsrunde wieder zur Verfügung (Kock et al., 2015).

Die Fertigung des Immunoproteasoms unterscheidet sich von der des Standard Proteasoms in der Reihenfolge der Anlagerung der β -Untereinheiten und der Assemblierungsgeschwindigkeit. Zuerst werden die Immuno-Untereinheiten Pro-LMP2 (Pro- β 1i) und Pro-MECL1 (Pro- β 2i) eingebaut, gefolgt von β 3, Pro-LMP7 (Pro- β 5i), β 4, Pro- β 6 und Pro- β 7 (Bai et al., 2014; Groettrup et al., 1997; Nandi et al., 1997). Die erhöhte Assemblierungsgeschwindigkeit wird dadurch erreicht, dass POMP/UMP1 eine höhere Affinität zu LMP7 (β 5i) als zu β 5 aufweist. Zudem stimuliert $\text{IFN}\gamma$ die POMP/UMP1 Expression (Heink et al., 2005).

Die Subkomplexe des 19S regulatorischen Partikels werden unabhängig voneinander zusammengebaut. Die Assemblierung des *Base*-Komplexes erfolgt über drei Vorläuferkomplexe und wird durch die Helferproteine p28/Gankyrin/Nas6, p27/Nas2, S5b/Hsm3 und Rpn14 (Mammalia/Hefe) gesteuert (Kaneko et al., 2009). Strukturanalysen in Hefe zeigten, dass die Chaperone während des Assemblierungsprozesses mit den C-Termini der Rpt-Untereinheiten interagieren und dadurch eine Assoziation des naszierenden regulatorischen Partikels mit dem 20S α -Ring verhindern (Barrault et al., 2012; Satoh et al., 2014). Andererseits schlagen Ergebnisse anderer Studien einen alternativen Assemblierungsmechanismus vor, nachdem der 20S Kernkomplex eine Plattform für die Anlagerung der regulatorischen Untereinheiten bildet (Park et al., 2013; Roelofs et al., 2009). Für die Assemblierung des *Lid*-Komplexes sind keine Helferproteine bekannt. Der Zusammenbau des Subkomplexes wird in Hefe durch die PCI Domänen der Rpn Untereinheiten vermittelt und erfolgt über zwei intermediäre Komplexe (Fukunaga et al., 2010). Vermutlich dient der *Base*-20S Komplex als Gerüst, für die Anlagerung des *Lid*-Komplexes (Yu et al., 2015).

1.1.5. Chemische Proteasominhibitoren

Es existiert eine Vielzahl chemischer Inhibitoren des Proteasoms. Diese bestehen meist aus einem Peptid und einer reaktiven Gruppe. Während das Peptid mit der Substratbindungstasche interagiert, reagiert das Pharmakophor mit der katalytischen β -Untereinheit des Proteasoms. Aufgrund ihrer reaktiven Gruppe unterscheiden sich die Inhibitoren in ihrem Wirkmechanismus und lassen sich in unterschiedliche Gruppen einteilen. Der membrangängige Inhibitor MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) zählt zu den Peptidaldehydinhhibitoren. Er bildet mit der Hydroxygruppe des Threoninrestes der β 5-Untereinheit ein reversibles Halbacetal aus (Kisselev and Goldberg, 2001; Rock et al., 1994). Peptidaldehydinhhibitoren weisen eine vergleichsweise geringe Spezifität auf und hemmen auch Cystein- und Serin-Proteasen. Das Borsäurederivat Bortezomib (Velcade[®]) inhibiert ebenfalls die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität. Der Inhibitor ist im Vergleich zu MG132 viel wirksamer sowie selektiver und wird bereits in der Therapie des multiplen Myeloms

eingesetzt. Bortezomib geht mit der Hydroxygruppe der katalytischen Threoninrestes eine reversible Bindung ein, die sich allerdings nur sehr langsam wieder löst (Adams, 2004). Das natürliche α,β -Epoxyketon Epoxomicin bildet mit der Hydroxy- und der Aminogruppe des Threoninrestes der $\beta 5$ -Untereinheit einen irreversiblen Morpholinring aus (Groll et al., 2000b). Dieser Reaktionsmechanismus macht Epoxomicin zu einem hochspezifischen Inhibitor des Proteasom.

Ein Beispiel für einen nicht-Peptid Inhibitor stellt das natürlich vorkommende *clasto*-Lactacystein dar. Dieses inhibiert alle katalytischen β -Untereinheiten, wobei die Trypsin-ähnliche und Chymotrypsin-ähnliche Aktivität irreversibel und die Caspase-ähnliche Aktivität reversibel gehemmt wird (Fenteany et al., 1995).

1.2. **Die zelluläre Stressantwort**

Zellen sind ständig verschiedenen Arten von Stress, zum Beispiel oxidativem, genotoxischem oder proteotoxischem Charakters, ausgesetzt. Die Zelle besitzt spezielle, molekulare Schutzmechanismen, die eine Adaptation an verschiedene Störungen gewährleistet. Diese schützen die Zelle vor starken Zellschäden, indem sie diese einerseits vorbeugen und andererseits reparieren oder beseitigen. So wehrt die ER-Qualitätskontrolle (ERQC) gemeinsam mit dem ER-assoziierten Degradationssystem (ERAD) eine Anreicherung fehlerhafter sowie fehlgefalteter Proteine ab und gewährleistet so die Aufrechterhaltung der ER und Protein Homöostase (Ellgaard and Helenius, 2003; Hirsch et al., 2009). Die *unfolded protein response* (UPR) wirkt ER-Stress entgegen und antioxidative Mechanismen schützen die Zelle vor oxidativem Stress (Chaudhari et al., 2014; Kriegenburg et al., 2011; Lushchak, 2014).

1.2.1. **Die ER-Qualitätskontrolle (ERQC) und das ER-assoziierte Degradationssystem (ERAD)**

Bei etwa einem Drittel der zellulären Proteine handelt es sich um sekretorische Proteine oder Proteine der Plasmamembran, die über den sekretorischen Weg an ihren Bestimmungsort gelangen (Kanapin et al., 2003). Ausgangspunkt ihres zielgerichteten Transports ist das raue ER. Hier werden die Proteine von den Ribosomen synthetisiert, durch den Sec61 Membrankanal kotranslational in das ER-Lumen bzw. in die ER-Membran transportiert und ko- sowie post-translational in ihre native Konformation überführt (Rapoport, 2007). Um die Zelle vor einer Anhäufung von fehlgefalteten, proteotoxischen Proteinen im ER zu schützen, unterliegt der Proteinfaltungsapparat einer strengen Qualitätskontrolle. Nur korrekt gefaltete Proteine passieren die ERQC und gelangen letztlich an ihren Bestimmungsort. Der Faltungsprozess wird durch post-translationale Modifizierungen, wie der Ausbildung von Disulfidbrücken oder der N-Glykosylierung, sowie durch Bindung molekularer Chaperone

unterstützt, die als Sensor für fehlgefaltete Proteine fungieren. Zu den Chaperonen zählen u.a. BiP/GRP78/HSPA5 (*binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein 78/ heat shock 70kDa protein 5*), GRP94/HSP90B1 (*glucose-regulated protein 94/ heat shock protein 90kDa beta 1*) und die Proteindisulfidisomerasen (PDIs), sowie die Lektine Calnexin und Calretikulin (Ellgaard and Helenius, 2003; Hirsch et al., 2009).

Proteine die ihre native Konformation nicht erreichen, werden dem in Eukaryoten konservierten ERAD zugeführt. Die Existenz eines zellulären Mechanismus, der neben der Eliminierung fehlgefalteter, cytosolischer Proteine auch den Abbau fehlgefalteter ER-ständiger Proteine durch das Proteasom ermöglicht, wurde vor etwa 20 Jahren aufgedeckt (Hiller et al., 1996; Sommer and Jentsch, 1993). Hierbei werden Chaperon-gebundene ERAD Substrate über Adapterproteine dem Retrotranslokations Komplex - bestehend aus einer E3 Ligase, einem Translokationskanal und VCP (*valosin containing protein*)/p97- übergeben, von diesem ubiquitiniert und durch die ER-Membran transportiert. Im Cytosol werden die polyubiquitinierten Substrate schließlich proteasomal abgebaut (Abb. 1.5 und (Hirsch et al., 2009; Olzmann et al., 2013)). Neben den fehlgefalteten ER-Proteinen werden auch regulatorisch wichtige Proteine, wie der Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor (IP3R), der Transkriptionsfaktors SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) und der Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf (*nuclear erythroid-derived 2-related factor*) 1 durch ERAD degradiert (Hughes et al., 2009; Steffen et al., 2010; Webster et al., 2003).

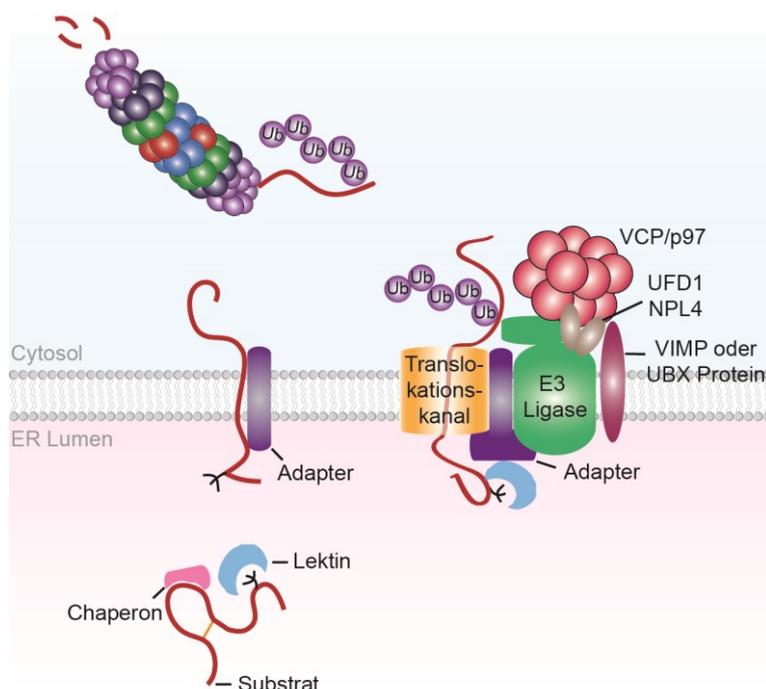


Abb. 1.5: Das ER-assozierte Degradationssystem (ERAD).

Fehlgefaltete ER Proteine und Membranproteine werden durch ERAD abgebaut. Molekulare Chaperone und andere Komponenten der ERQC erkennen die fehlgefalteten ERAD Substrate und übermitteln diese durch Interaktion mit einem Adapterprotein dem Retrotranslokations Komplex, bestehend aus einer E3 Ligase, dem Translokationskanal und VCP/p97. Die E3 Ligase vermittelt die Ubiquitinierung (Ub) des Substrates. VCP/p97 wird durch VIMP oder ein UBX Protein an die ER Membran rekrutiert und vermittelt gemeinsam mit seinen Kofaktoren UFD1 und NPL4 die Extraktion des ubiquitinierten Substrates. Dieses wird schließlich proteasomal abgebaut. [modifiziert nach (Olzmann et al., 2013)]

Nicht-glykosylierte BiP/GRP78/HSPA5-gebundene Substrate werden von dem UBL (*ubiquitin-like*) Protein HERP (*homocystein-responsive ER-resident protein*) erkannt und an den Retrotranslokations Komplex übermittelt (Okuda-Shimizu and Hendershot, 2007).

Glykosylierte ERAD Substrate werden, solange sie nicht vollständig gefaltet sind, von Calnexin oder Calretikulin im ER zurückgehalten. Gelingt es nicht das Glykoprotein in seine native Konformation zu überführen, wird sein N-Glykan durch eine Mannosidase deglykosyliert und demannosyliert, durch ein Mannose-spezifisches Lektin erkannt und schließlich über das Adapter-Membranprotein SEL1L (*sel-1 suppressor of lin-12-like*) an die E3 Ubiquitin Ligase HRD1/SYVN1 übergeben (Christianson et al., 2008; Helenius and Aebi, 2004; Hosokawa et al., 2008). Als Adapter für Membranproteine fungiert der Erlin1/2 Komplex (Olzmann et al., 2013).

Die RING Finger Ubiquitin Ligasen Gp78/AMFR (*autocrine motility factor receptor*) und HRD1/SYVN1 wurden zuerst als ERAD fungierende Ligasen definiert (Bordallo and Wolf, 1999; Fang et al., 2001). Die Ubiquitinierung und Degradation der Substrate findet im Cytosol statt. Da die hydrophoben Substrate nicht einfach durch die ER-Membran diffundieren, ist der Retrotranslokationskanal ein wichtiger Bestandteil des ERADs. Die Zusammensetzung des Kanals ist bis heute nicht vollständig geklärt. Erste Hinweise ließen vermuten, dass der Translokationskanal Sec61 auch als Kanal für die Retrotranslokation fungiert (Pilon et al., 1997; Plemper et al., 1997; Wiertz et al., 1996). Proteine der Derlin Familie wurden ebenfalls als Kandidaten für den Kanal vorgeschlagen (Lilley and Ploegh, 2004; Ye et al., 2004). Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Ligase HRD1/SYVN1 den Translokationskanal bildet (Carvalho et al., 2010; Ravid et al., 2006). Letztendlich ist aufgrund der zahlreichen und vielfältigen ERAD Substrate die Existenz mehrere Kanäle nicht auszuschließen.

Die Ubiquitinierung dient nicht nur der Markierung der Substrate für den proteasomalen Abbau, vermutlich fördert sie auch die Rekrutierung der hexameren AAA-ATPase VCP/p97. Diese ermöglicht gemeinsam mit ihren Kofaktoren UFD1 (*ubiquitin fusion degradation protein 1*) und NPL4 (*nuclear protein localization protein 4 homolog*) die Retrotranslokation polyubiquitinerter Substrate vom ER in das Cytosol. Hierbei liefert die ATP Hydrolyse die Energie für den Retrotranslokationsprozess der Polypeptide durch den Kanal (Flierman et al., 2003; Jarosch et al., 2002; Ye et al., 2003). In Mammalia wird der VCP/p97-UFD1-NPL4 Komplex durch ein UBX (*ubiquitin regulator X*) Protein oder auch durch VIMP (*VCP-interacting membrane protein*) an die ER-Membran rekrutiert (Liang et al., 2006; McNeill et al., 2004; Ye et al., 2004). Eine Übergabe der Substrate an das Proteasom kann direkt durch VCP/p97 geschehen oder wird von weiteren Faktoren vermittelt (Medicherla et al., 2004).

1.2.2. Die unfolded proteine response (UPR)

Die UPR wird aktiviert durch eine Anreicherung fehlgefalteter ER Proteine. Diese wird beispielsweise durch eine Störung der Proteinglykosylierung, eine veränderte intraluminale

Calciummenge, Infektionen, der Expression fehlerhafter Proteine oder einer Störung des Redox-Gleichgewichts verursacht. Das primäre Ziel der UPR ist die Wiederherstellung der ER Homöostase. Dazu vermittelt sie die Expression von ER Chaperonen und ERAD Komponenten, die die Reparatur und den Abbau fehlerhafter oder beschädigter Proteine fördern und somit dem proteotoxischen Stress entgegen wirken. Gelingt es der Zelle nicht den ER-Stress zu überwinden, veranlasst die UPR den programmierten Zelltod (Chaudhari et al., 2014; Eletto et al., 2014).

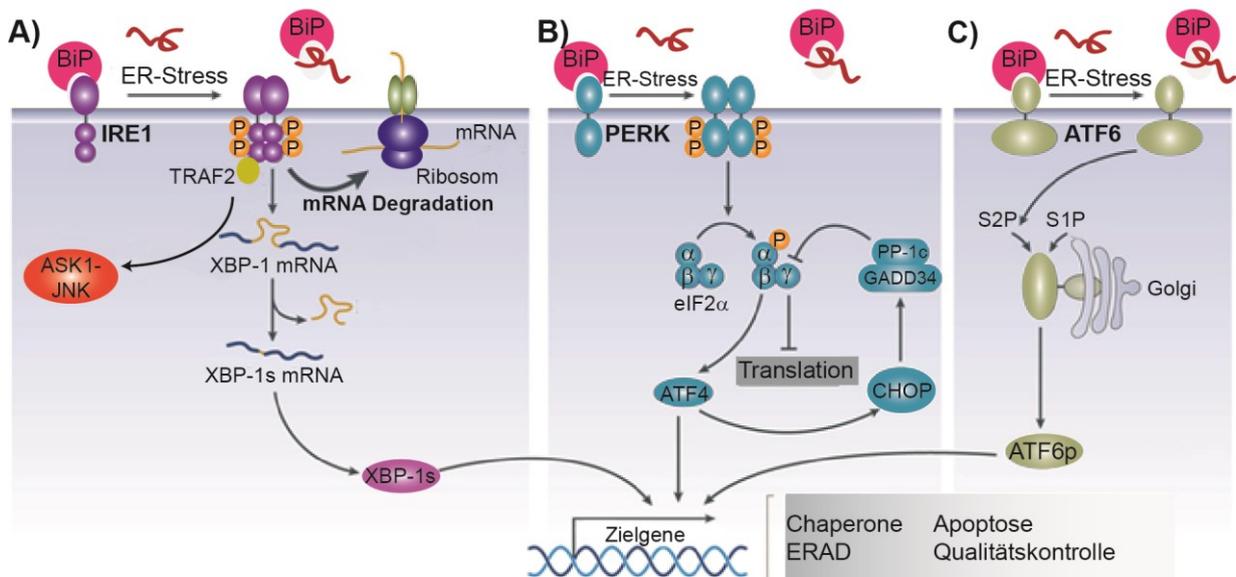


Abb. 1.6: Die unfolded protein response. Die Anreicherung von fehlgefalteten Proteinen hat zur Folge, dass das Chaperon BiP von den UPR Sensoren IRE1, PERK und ATF6 wegdissoziiert, um an die fehlgefalteten Proteine zu binden. **(A)** Dies erlaubt die Dimerisierung und Phosphorylierung von IRE1, welches folglich die XBP-1 mRNA spleißt. Die gespleißte Form von XBP-1 (XBP-1s) vermittelt die Expression verschiedener UPR Zielgene. Durch Degradation anderer mRNAs verringert IRE1 zudem die Proteinsynthese. Zudem aktiviert der Sensor den ASK1-JNK Signalweg. **(B)** PERK wird ebenfalls durch Dimerisierung und Phosphorylierung aktiviert. Die Kinase phosphoryliert folglich eIF2 α , wodurch die Translation der meisten Proteine gehemmt wird. Wenige Proteine, wie der Transkriptionsfaktor ATF4, wird durch eIF2 α verstärkt synthetisiert. Dieser aktiviert UPR Zielgene, u.a. CHOP, der wiederum GADD34 induziert. Gemeinsam mit der katalytischen PP-1c Untereinheit bildet dieser die Proteinphosphatase-1, die die dephosphorylierung von eIF2 α vermittelt. **(C)** ATF6 wird durch limitierte Proteolyse durch die Proteasen S1P und S2P im Golgi aktiviert. Der prozessierte Transkriptionsfaktor ATF6p aktiviert anschließend die Expression seiner UPR Zielgene. [modifiziert nach (Hetz et al., 2013)]

Die UPR beruht auf drei Signalwegen, die durch die ER Membranproteine IRE1 (*inositol-requiring protein-1*), PERK (*PRK-like ER kinase*) und ATF (*activating transcription factor*) 6 induziert werden. Die drei Sensoren werden durch Interaktion mit dem Chaperon BiP/GRP78/HSPA5 kontrolliert. Eine ER-Stress bedingte Zunahme fehlgefalteter Proteine erhöht den Bedarf an BiP/GRP78/HSPA5, welches folglich von IRE1 und ATF6 dissoziiert (Chaudhari et al., 2014; Eletto et al., 2014). In Folge von ER-Stress spleißt IRE1 die XBP-1 (*X-box binding protein 1*) mRNA. Dadurch wird die aktive Form des Transkriptionsfaktors XBP-1 translatiert und induziert die Expression von Chaperonen und ERAD Komponenten (Sidrauski and Walter, 1997; Yoshida et al., 2001). Außerdem degradiert IRE1 andere mRNA Moleküle und verringert dadurch die Menge frisch synthetisierter Proteine. IRE1 interagiert

zudem mit der E3 Ubiquitin Ligase TRAK2 (*tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 2*), die wiederum ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase*) rekrutiert. Diese aktiviert folglich die JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und die p38 MAP Kinase (Abb. 1.6 A). ATF6 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Antwort auf ER-Stress in den Golgi transportiert und dort proteolytisch prozessiert wird. Das aktive ATF6 Fragment wandert dann in den Nukleus und induziert die Expression seiner Zielgene, beispielsweise von BiP/GRP78/HSPA5 und GRP94/HSP90B1 (Haze et al., 1999). Disulfidbrücken zwischen ATF6 Proteinen dienen vermutlich als Redoxsensor (Abb. 1.6 C; (Eletto et al., 2014)). ER-Stress führt des Weiteren zu einer Oligomerisierung und Autophosphorylierung der Kinase PERK. PERK vermittelt ferner die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α . Dadurch wird die Synthese der meisten Proteine gehemmt und der Zufluss neu synthetisierter Proteine in das ER verringert. Dennoch wird die Translation des Transkriptionsfaktors ATF4 stimuliert und dieser wiederum induziert die Expression seiner Zielgene, beispielsweise von CHOP (*transcription factor C/EBP homologous protein*) und GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*) (Harding et al., 2000a; Harding et al., 2000b). GADD34 ist eine regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase-1 (PP-1) und vermittelt die Dephosphorylierung von eIF2 α (Abb. 1.6 B). Neben eIF2 α existieren weitere PERK Substrate. So phosphoryliert PERK zum Beispiel Keap1, wodurch die Interaktion zu Nrf2 gestört und Nrf2-regulierte antioxidative Gene induziert werden (Kapitel 1.2.3.1 und 1.3.1.2; (Cullinan et al., 2003)). Die UPR ist demnach verknüpft mit der antioxidativen Stressantwort. Das enge Zusammenspiel zwischen oxidativem Stress und ER-Stress sowie der jeweiligen Schutzmechanismen wird außerdem dadurch bestärkt, dass die UPR selbst eine Quelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) darstellt und andersherum durch oxidativen Stress die ER Stressantwort aktiviert wird (Eletto et al., 2014).

1.2.3. Oxidativer Stress und die antioxidative Stressantwort

Der Begriff oxidativer Stress wurde vor 30 Jahren von Helmut Sies eingeführt und beschreibt eine Imbalance des Redox-Gleichgewichts zu Gunsten der Oxidantien. Seitdem wuchs das disziplinübergreifende Forschungsgebiet der Redoxbiologie heran und wurde im Laufe der Jahre stets komplexer (Sies, 2015). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) sind Oxidantien, die in physiologischen Prozessen, wie der Zellatmung im Mitochondrium oder der oxidativen Proteinfaltung im ER, generiert werden und eine große Bedeutung in der Entstehung von oxidativen Stress spielen. Zu den reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) zählen das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), der Singulett-Sauerstoff (1O_2), das Hydroxyl-Radikal (HO^{\cdot}), Hypochlorige Säure ($HOCl$), Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) und Peroxynitrit ($ONOO^-$). RONS sind

an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Beispielsweise bewirkt NO^* die Erweiterung der Blutgefäße. Außerdem stellt die Induktion der RONS einen Bestandteil der zellulären Immunantwort dar (Lushchak, 2014; Weidinger and Kozlov, 2015).

Neben den endogenen Quellen können verschiedene exogene Faktoren, wie UV Licht oder Toxine die Produktion von RONS induzieren. Ein übermäßiger Anstieg der RONS führt ferner zur teilweise irreversiblen Oxidation von Lipiden, DNA und Proteinen, wobei Letzteres zu proteotoxischen Stress führt (Abb. 1.7; (Weidinger and Kozlov, 2015)). Zelluläre Schutzmechanismen wirken diesem enormen Zellschaden entgegen und sichern so unter anderem die Integrität der Proteine. So produziert die Zelle enzymatische sowie nicht-enzymatische Antioxidantien, die sowohl die Entstehung von RONS verhindern als auch bereits oxidierte Biomoleküle reduzieren (Lushchak, 2014). Dabei werden molekulare Chaperone exprimiert, die die Reparatur oxidativ beschädigter, fehlgefalteter Proteine unterstützen. Ist die Beschädigung des Proteins jedoch irreversibel, wird dieses abgebaut (Kriegenburg et al., 2011).

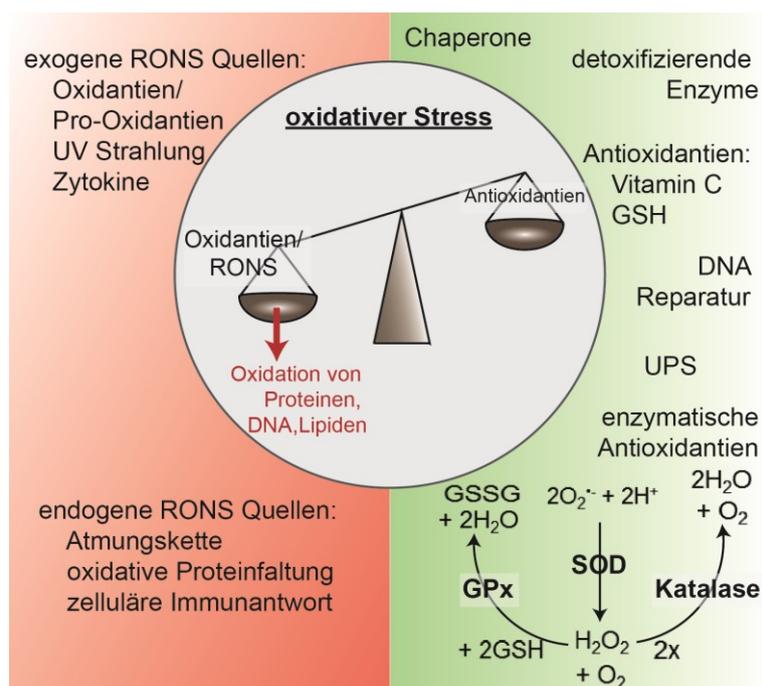


Abb. 1.7: Störung und Regulation der Redox-Homöostase. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien. Eine übermäßige Zunahme der RONS als Folge exogener oder endogener Faktoren resultiert in einer Imbalance der Redox-Homöostase und in oxidativen Stress. Dieser geht einher mit oxidativer Beschädigung von Proteinen, DNA und Lipiden. Die Zelle hat verschiedene antioxidative Mechanismen entwickelt, die dem oxidativen Stress entgegen wirken. Nicht-enzymatische Antioxidantien fangen die Radikale direkt ab. Das enzymatische Antioxidans SOD katalysiert die Reaktion des Superoxid-Anions zu Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid wird im Folgenden durch die Katalase oder eine Peroxidase (GPx) zu Wasser umgesetzt. Die Peroxidasen können neben dem Umsatz von Wasserstoffperoxid auch den Umsatz anderer organischer Hydroperoxide katalysieren. Neben antioxidativen Enzymen wirken auch detoxifizierende Enzyme dem oxidativen Stress entgegen. Zudem gibt es Mechanismen die die Reparatur (z.B.: DNA-Reparaturmechanismen, Chaperone) oder die Degradation (z.B.: UPS) beschädigter Makromoleküle ermöglichen.

1.2.3.1. Funktion und Regulation des antioxidativen Systems

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören beispielsweise Vitamin C und E sowie Carotinoide, Polyphenole und Harnsäure, die als Radikalfänger fungieren. Glutathion (GSH) ist eines der wichtigsten endogenen Antioxidantien. Es kann entweder direkt oder als Kofaktor detoxifizierender Enzyme wirken. Zu den enzymatischen Antioxidantien zählen unter anderem die Katalase, die Glutathion-Peroxidase (GPx), Superoxiddismutase (SOD) und andere Peroxidasen (Abb. 1.7; (Lushchak, 2014)).

Promotoranalysen ergaben, dass induzierbare antioxidative sowie detoxifizierende Gene durch das ARE/EpRE (*antioxidant/electrophil response elements*) Promotorelement gesteuert werden (siehe Kapitel 1.3.1; (Jaiswal, 2004; Rushmore et al., 1991)). Die transkriptionelle Regulation dieser Gene wird durch die Transkriptionsfaktoren TCF11/Nrf1 und Nrf2 vermittelt (Itoh et al., 1997; Venugopal and Jaiswal, 1996). Nrf2 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des antioxidativen Systems (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014; Sykiotis and Bohmann, 2010). Neben antioxidativen und Phase II Enzymen, wie Hämoxygenase-1 (HO-1), Glutathion-Reduktase, Glutathion-S-transferase (GST) und NAD(P)H:Quinonoxido-reduktase (NQO1), induziert Nrf2 auch die Expression molekularer Chaperone und proteasomaler Untereinheiten (Hu et al., 2006; Itoh et al., 1997). Der Redox-sensitive Repressor Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) stellt den Hauptregulator von Nrf2 dar. Unter stressfreien Bedingungen vermittelt er den proteasomalen Abbau des Transkriptionsfaktors. Elektrophile oder Oxidantien stören den Keap1-vermittelten Abbau und aktivieren den Transkriptionsfaktor (siehe Kapitel 1.3.1.2 und Abb. 1.10). Neben Nrf2 ist auch TCF11/Nrf1 an der Regulation des antioxidativen Systems beteiligt (siehe Kapitel 1.3.1.1). Außerdem stellt TCF11/Nrf1 den Hauptregulator der Expression proteasomaler und UPS-verwandter Gene dar (Steffen et al., 2010). Das Zusammenspiel beider Transkriptionsfaktoren ist nur unzureichend untersucht. Jedoch resultiert die Abwesenheit einer der beiden Transkriptionsfaktoren in einer gesteigerten Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Stress und unterstreicht somit die Relevanz beider Faktoren in der antioxidativen Stressantwort (Chan et al., 2001; Chan and Kan, 1999; Han et al., 2012; Kwong et al., 1999; Ohtsuji et al., 2008; Zhao et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass abhängig von dem Stimulus und dem Zielgen Nrf1 und Nrf2 konkurrierend, kooperierend oder unabhängig voneinander wirken (Koch et al., 2011). Auch wenn einige zellschützende Gene durch beide Faktoren reguliert werden (Leung et al., 2003; Venugopal and Jaiswal, 1996), verdeutlicht der unterschiedliche Phänotyp der Nrf1 und Nrf2 Knockout-Mäuse, dass sich die Faktoren in ihrer Funktion unterscheiden. Während sich die Nrf2^{-/-} Mäuse normal entwickeln und keine offensichtlichen Veränderungen aufweisen, ist der Verlust von Nrf1 aufgrund eines Defekts in der Erythropoese embryonal letal (Chan et al., 1998; Chan et al., 1996).

Neben den Nrf Transkriptionsfaktoren scheint auch der Aktivator-Komplex 1 (AP-1) an der Regulation antioxidativer Gene beteiligt zu sein (Soriano et al., 2009; Venugopal and Jaiswal, 1998). AP-1 bindet an das *TPA response element* (TRE: TGACTCA) welches dem ARE sehr ähnlich ist und interessanterweise häufig in den ARE Elementen antioxidativer und detoxifizierender Gene zu finden ist (Angel et al., 1987; Soriano et al., 2009; Venugopal and Jaiswal, 1998).

1.2.3.2. *Das Proteasom als Bestandteil der antioxidativen Stressantwort*

Während das lysosomale Abbausystem hauptsächlich Proteinaggregate und defekte Zellorganellen degradiert, vermittelt das UPS den spezifischen Abbau fehlerhafter bzw. fehlgefalteter sowie beschädigter Proteine und schützt so die Zelle vor der Ausbildung zytotoxischer Proteinaggregate und letztlich vor dem Zelltod. Eine Störung des UPS sowie des lysosomalen Abbausystems steht im engen Zusammenhang mit der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise von Morbus Parkinson, Chorea Huntington und Morbus Alzheimer (Goldberg, 2003; Kriegenburg et al., 2011).

Oxidativ geschädigte Proteine werden durch das Proteasom abgebaut. Dabei werden oxidierte Proteine schneller degradiert als ihre native Form (Davies and Goldberg, 1987; Huang et al., 1995). Ferner führt die Inhibition des Proteasoms zu einer Anreicherung oxidierter Substrate und zu einer Beeinträchtigung der Zellviabilität (Dudek et al., 2005; Pickering et al., 2010; Seifert et al., 2010). Des Weiteren wurde ein verstärkter intrazellulärer Proteinabbau als Folge von mildem oxidativen Stress beobachtet. Die Zunahme der oxidierten, proteasomalen Substrate wird durch Adaptation des Proteasomsystems kompensiert, (Dudek et al., 2005; Pickering et al., 2010; Sha et al., 2013; Shang et al., 2001) wobei die Beteiligung des Ubiquitinsystems kontrovers diskutiert wird (Pickering and Davies, 2012; Shang and Taylor, 2011). Während milde oxidative Bedingungen in einer Induktion der proteolytischen Kapazität resultieren, führt starker oxidativer Stress zu einer gleichbleibenden oder verringerten Proteolyse (Grune et al., 1995; Shang et al., 2001). Das Immunoproteasom spielt bei der Aufrechterhaltung der Protein Homöostase unter Inflammation-induzierten oxidativen Stress eine entscheidende Rolle. Es vermittelt den Ubiquitin-abhängigen Abbau defekter naszierender Proteine, den sogenannten DRiPs (*defective ribosomal products*), und schützt die Zelle vor Ausbildung von Aggresomen oder Aggresom-ähnlicher Strukturen (Seifert et al., 2010; Warnatsch et al., 2013).

1.3. **Regulation der Genexpression des UPS**

In vielen eukaryotischen Organismen ist für die Regulation des Proteasoms ein autoregulatorischer Rückkopplungsmechanismus beschrieben. Dieser ermöglicht es den Zellen eine verminderte Proteasomaktivität durch Hochregulation der Transkription

proteasomaler Gene und folglich der Neusynthese proteasomaler Komplexe zu kompensieren (Ju et al., 2004; Meiners et al., 2003; Wojcik and DeMartino, 2002; Xie and Varshavsky, 2001).

1.3.1. Regulation der Expression des UPS von Hefe bis zu Mammalia

Erstmals demonstrierten Studien in *Saccharomyces cerevisiae* die Existenz des autoregulatorischen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Proteasom-Homöostase. In *S. cerevisiae* steuert der Transkriptionsfaktor Rpn4 durch Bindung der PACE (*Proteasome-associated control element*) Promotor-Sequenzen die Expression proteasomaler Gene sowie von Genen, deren Produkte an der Ubiquitinierung oder Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind (Mannhaupt et al., 1999; Shirozu et al., 2015). Rpn4 ist essenziell für die basale Proteasomexpression und spielt eine bedeutende Rolle in der zellulären Stressantwort sowie für die Aufrechterhaltung der Zellviabilität (Wang et al., 2008; Xie and Varshavsky, 2001). Das kurzlebige Protein Rpn4 wird proteasomal abgebaut. Eine Hemmung des Proteasoms sowie eine Stabilisierung des Transkriptionsfaktors induzieren die Rpn4-abhängige Proteasomexpression (Fleming et al., 2002; Ju et al., 2004; Xie and Varshavsky, 2001).

Obgleich in Metazoa weder ein Homolog zu Rpn4 noch PACE Sequenzen identifiziert wurden, demonstrierten Studien dennoch die Existenz eines selbstregulierenden Rückkopplungsmechanismus des Proteasomsystems auf Ebene der Transkription (Lundgren et al., 2005; Meiners et al., 2003; Wojcik and DeMartino, 2002). Als fungierende Transkriptionsfaktoren in diesem Regulationsprozess wurden Mitglieder der konservierten Cap'n'Collar (C'n'C) Familie identifiziert, wie SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*, Cnc-C in *Drosophila melanogaster* und TCF11/Nrf1 sowie Nrf2 in Mammalia (Grimberg et al., 2011; Kahn et al., 2008; Li et al., 2011). Diese Regulatoren der proteasomalen Genexpressionen werden alle proteasomal abgebaut und in Folge einer Verringerung der Proteasomaktivität aktiviert (Choe et al., 2009; Grimberg et al., 2011; Kobayashi et al., 2004; Steffen et al., 2010).

TCF11/Nrf1 und Nrf2 spielen, wie auch die meisten anderen Mitglieder der C'n'C Familie, eine entscheidende Rolle in der antioxidativen Stressantwort (Sykiotis and Bohmann, 2010). Gemeinsam mit anderen bZIP Transkriptionsfaktoren, hauptsächlich kleiner Maf (*v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*) Proteinen oder cJun, binden Nrfs an spezifische Promotorsequenzen, den ARE/EpRE und vermitteln dadurch die Expression ihrer Zielgene (Itoh et al., 1997; Johnsen et al., 1996; Venugopal and Jaiswal, 1998). Entdeckt wurde die ARE Sequenz in den Promotoren verschiedener antioxidativer und detoxifizierender Gene, wie von GST und der NQO1 (Rushmore et al., 1991). Aus späteren Sequenzanalysen der Promotoren Antioxidans- und Elektrophil-induzierter Gene

kristallisierte sich die Sequenz 5'-TGAnnnnGC-3' als ARE Konsensus Sequenz heraus (Jaiswal, 2004). Auch in den Promotoren der Gene der proteasomalen Untereinheiten wurden ARE Sequenzen identifiziert und deren Bedeutung in der Stress-induzierten Expressionsregulation gezeigt (Kwak et al., 2003a; Steffen et al., 2010).

In Mammalia wurde neben den Nrfs der Transkriptionsfaktor NF-Y als wichtiger Regulator der Expression des UPS beschrieben (Xu et al., 2012). NF-Y vermittelt vor allem die basale Expression CCAAT-Box kontrollierter proteasomaler Gene. Das Fehlen des Transkriptionsfaktors resultiert in einer Abnahme der Proteasomaktivität und sensibilisiert Zellen gegenüber proteotoxischem Stress (Xu et al., 2012). Der NF-Y Faktor besteht aus drei Untereinheiten NF-YA, -YB und -YC (Mantovani, 1999). Die limitierende Untereinheit NF-YA wird UPS-abhängig abgebaut, was auf eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors an einem selbstregulierenden Rückkopplungsmechanismus hinweist (Manni et al., 2008). NF-Y vermittelt die Genexpression über eines der weitverbreitetsten Promotor Elemente und ist daher an der Regulation diverser zellulärer Prozesse, aber vor allem an der Zellproliferation, beteiligt (Dolfini et al., 2012).

1.3.1.1. *Der Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1*

Der Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 wird von dem Gen *NFE2L1* kodiert (Caterina et al., 1994; Chan et al., 1993; Luna et al., 1994). Derzeit sind vier Isoformen des Transkriptionsfaktors im humanen System beschrieben (Abb. 1.8 und Abb. 1.9).

Die größte Isoform, die durch Translation der vollständigen kodierenden Sequenz entsteht, besteht aus 772 Aminosäuren und wird als TCF11 bezeichnet. Die um 30 Aminosäuren kleinere Nrf1 Isoform entsteht durch mRNA Spleißen (Luna et al., 1994; Luna et al., 1995). Das hierbei herausgespleißte kodierende Exon 3, enthält ein nukleäres Exportsignal (NES) (Husberg et al., 2003). Eine weitere 447 Aminosäuren kleine Isoform, genannt LCR-F1, entsteht durch einen internen Translationsstart, der durch eine Exon-überspannende Ansammlung von Methionin-Codons charakterisiert ist (Caterina et al., 1994; Luna et al., 1994). Die erst kürzlich beschriebene Nrf1b Isoform wird durch einen internen alternativen Promotor synthetisiert, der zwischen dem ersten und zweiten Exon liegt, und als Exon 1b bezeichnet wird. Das Nrf1b Genprodukt umfasst 584 Aminosäuren (Kwong et al., 2012). Mit Ausnahme der TCF11 Isoform werden alle Formen auch in der Maus exprimiert.

Eine kürzlich erschienene Studie diskutiert zudem die Existenz zwei weiterer kleiner Isoformen, Nrf1 γ (35 kDa) und Nrf1 δ (25 kDa), die wie LCR-F1 durch einen internen Translationsstart entstehen (Zhang et al., 2014b).

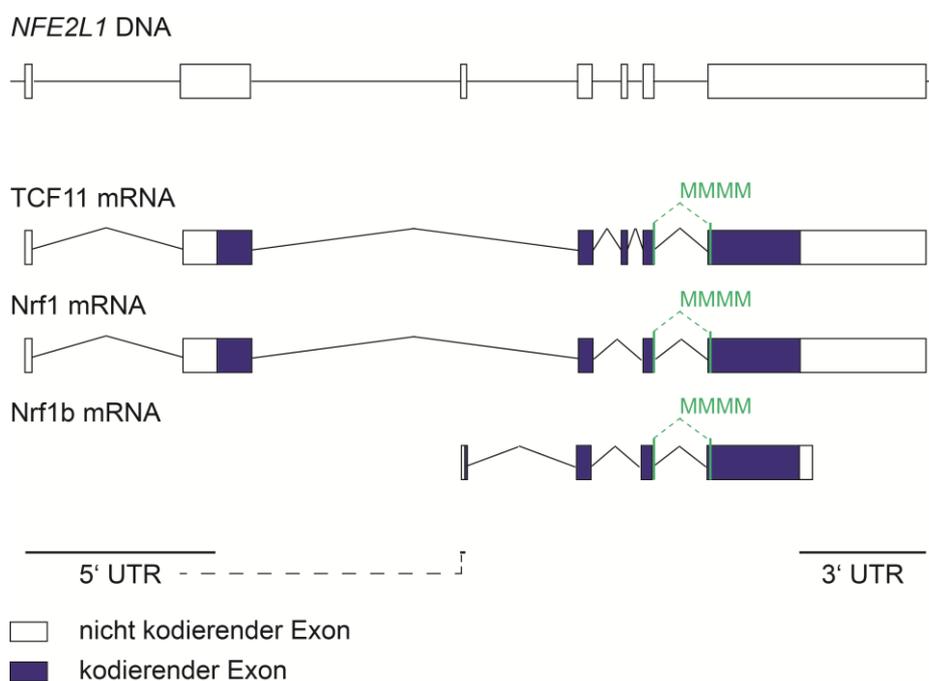


Abb. 1.8: NFE2L1 mRNA Produkte. Das humane Gen NFE2L1 kodiert für vier Isoformen, wobei drei Isoformen auf Ebene der Transkription entstehen: TCF11, Nrf1 und Nrf1b. TCF11 ist die größte Isoform. Bei Nrf1 wird das kodierende Exon 3 herausgespleißt und die Isoform Nrf1b entsteht durch Verwendung eines internen alternativen Promotors. MMMM markiert den Exon-überspannenden, internen Translationsstart der Isoform LCR-F1.

TCF11/Nrf1 ist in der ER-Membran lokalisiert. Der Faktor wird durch das N-terminale Signalpeptid, welches eine Transmembrandomäne (TM) beinhaltet, in der ER-Membran verankert (Wang and Chan, 2006; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2007). Neben dem Signalpeptid hemmen die N-terminalen Homologieboxen 1 und 2 (NHB1/2) sowie die Signalpeptid-assoziierte Sequenz (SAS) und die Cholesterolerkennungssequenz (CRAC) die transaktivierende Aktivität des Transkriptionsfaktors, indem sie die Topologie des Membranproteins kontrollieren und die Membranintegration fördern (Zhang and Hayes, 2010). Das Entfernen der N-terminalen TM von TCF11/Nrf1 oder das Fehlen der N-terminalen Domäne der natürlich vorkommenden Isoformen Nrf1b und LCR-F1 sowie der vorgeschlagenen Isoformen Nrf1 γ und Nrf1 δ resultiert in einer vorwiegend nukleären Lokalisation (Abb. 1.9; (Husberg et al., 2003; Kwong et al., 2012; Wang and Chan, 2006; Zhang et al., 2006)). Das Membranprotein wird in einer Asparagin/Serin/Threonin reichen Region (NST) N-glykosyliert und während dem nukleären Transferprozess deglykosyliert (Zhang et al., 2007). Des Weiteren besitzen TCF11/Nrf1 und Nrf1b eine Neh2 Domäne, die der Neh2 Domäne von Nrf2 stark ähnelt und die Interaktion zu Keap1 vermittelt (siehe Kapitel 1.3.1.2). Jedoch wurde trotz einer Interaktion mit Keap1 kein Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von TCF11/Nrf1 beobachtet, wodurch die Beteiligung von Keap1 am Abbau der beiden Isoformen ausgeschlossen werden kann (Steffen et al., 2010; Zhang et al., 2006). Die Transaktivierung wird durch die säurereichen Domänen 1 und 2 (AD: *acidic domain*), die NST Domäne und die Serin reiche Region (SR) vermittelt. Da der LCR-F1

Isoform die Transaktivierungsdomäne AD1 fehlt, ist diese weniger aktiv, und scheint teilweise sogar als Repressor ARE-gesteuerter Gene zu fungieren (Abb. 1.9; (Husberg et al., 2001; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2014b)). Den Formen Nrf1 γ und Nrf1 δ fehlt jegliche aktivierende Domäne, wodurch sie als negative Regulatoren wirken (Zhang et al., 2014b).

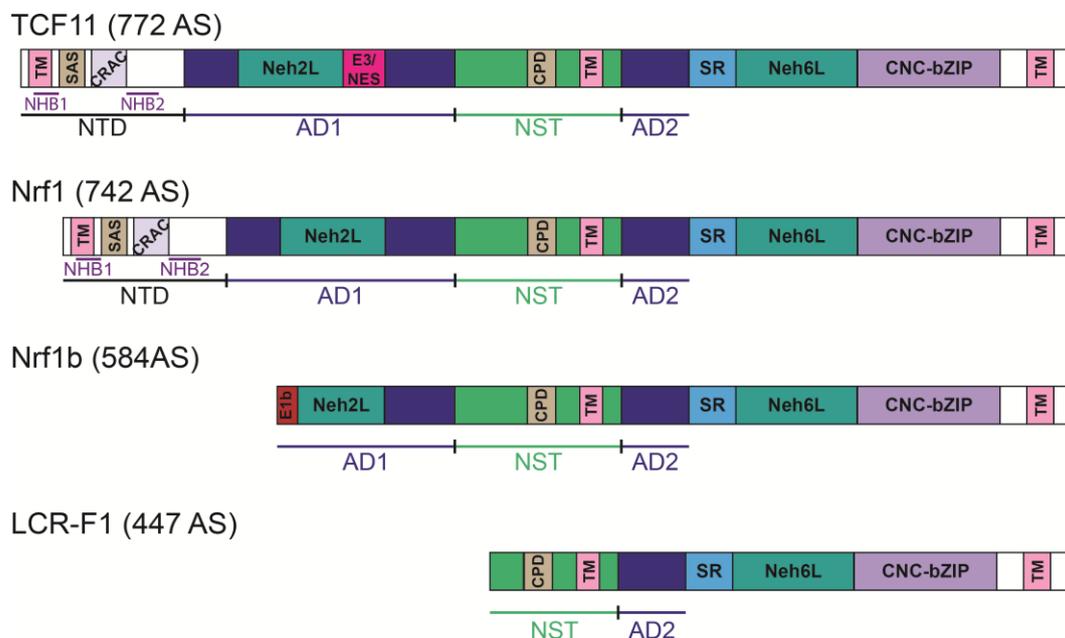


Abb. 1.9: Proteinaufbau der TCF11/Nrf1 Isoformen. Das humane Gen NFE2L1 kodiert für vier Isoformen. TCF11, Nrf1 und Nrf1b entstehen auf Ebene der Transkription und LCR-F1 durch einen internen Translationsstart. Die N-terminale Domäne vermittelt die Verankerung der Isoformen TCF11 und Nrf1 in der ER Membran. Neben der N-terminalen TM werden zwei weitere TMs vermutet. Die Transaktivierung wird durch die Domänen AD1, AD2, aber auch NST und SR vermittelt. Der Transkriptionsfaktor wird in der NST Region glykosyliert und im Bereich CPD von GSK3 β phosphoryliert.

AD: säurereiche Domäne; CPD: CdC4 Phosphodegron; CRAC: Cholesterol-Erkennungssequenz; Neh: Nrf2 ECH Homologie; NHB:N-terminale Homologiebox; NST: Asparagin/Serin/Threonin reichen Region; NTD: N-terminale Domäne; SAS: Signal-peptidassoziierte Sequenz; TM: Transmembrandomäne; SAS: Signal-peptidassoziierte Sequenz; SR: Serin reiche Region

Das Membranprotein TCF11/Nrf1 wird schnell unter Mitwirkung der E3 Ubiquitin Ligase HRD1/SYVN1 und der AAA-ATPase VPC/p97 ERAD-abhängig abgebaut (siehe Kapitel 1.2.1; (Steffen et al., 2010; Tsuchiya et al., 2011)). Der Abbau des nukleären TCF11/Nrf1 wird durch die SCF E3 Ubiquitin Ligase vermittelt. Zunächst wird TCF11/Nrf1 von der Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3 β) phosphoryliert. Die Phosphorylierung fördert die anschließende SCF-abhängige Ubiquitinierung. Hierbei ist die Beteiligung zweier F-Box Proteine, Fbw7 und β -TrCP, beschrieben (siehe Kapitel 1.1.1; (Biswas et al., 2013; Biswas et al., 2011; Tsuchiya et al., 2011)). Hemmung des Proteasoms führt zu einer starken Stabilisierung des Transkriptionsfaktors und zu dessen Transfer in den Nukleus. Hier induziert TCF11/Nrf1 die Expression der proteasomalen Untereinheiten und anderer UPS-verwandter Gene durch Bindung an deren ARE Sequenzen (Abb. 1.10 A, C; (Radhakrishnan

et al., 2010; Steffen et al., 2010)). Auch für Nrf2 ist eine regulierende Funktion für die Expression der proteasomalen Untereinheiten im Rahmen der zellulären antioxidativen Stressantwort beschrieben (Kwak et al., 2003a; Kwak et al., 2003b). Jedoch konnten Steffen und Kollegen zeigen, dass die Proteasom-inhibitor-induzierte Proteasomexpression unabhängig von Nrf2 ist (Steffen et al., 2010).

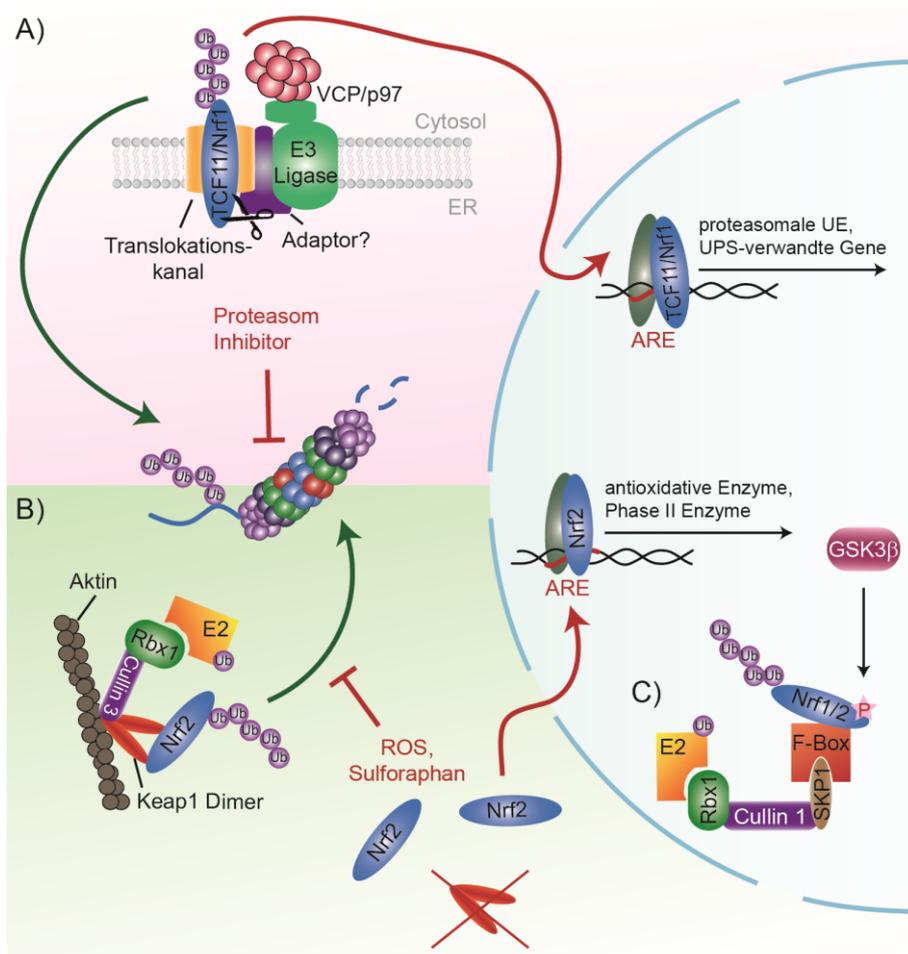


Abb. 1.10: Regulation von TCF11/Nrf1 und Nrf2. (A) Unter normalen Bedingungen wird TCF11/Nrf1 durch das HRD1/SYVN1- und VCP/p97- abhängige ERAD abgebaut. Wird der Abbau durch Proteasom-inhibitoren gehemmt, wird TCF11/Nrf1 stabilisiert, aktiviert und in den Nukleus transferiert. Hier induziert er als Heterodimer mit einem anderen bZIP Transkriptionsfaktor die Genexpression seiner ARE-gesteuerten Zielgene, z.B.: proteasomale Untereinheiten (UE). (B) Nrf2 wird durch seinen Aktin-assoziierten Repressor Keap1 dem Cullin 3-abhängigen proteasomalen Abbau zugeführt. Oxidativer Stress führt zu einer Oxidation der Redox-sensitiven Cysteine des Keap1 Dimers, wodurch es zu einer Konformationsänderung und folglich zu einer Hemmung der Ubiquitinierung von Nrf2 kommt. Die Interaktion der Keap1-Nrf2 Komplexe bleibt bestehen, wodurch die Menge an freiem Keap1 abnimmt. Dadurch akkumuliert neu synthetisiertes, freies Nrf2 und wird in den Nukleus transferiert. Hier induziert es als Heterodimer mit einem anderen bZIP Transkriptionsfaktor die Genexpression seiner ARE-gesteuerten antioxidativen und detoxifizierenden Zielgene. (C) Für nukleäres TCF11/Nrf1 und Nrf2 ist ebenfalls ein SCF-abhängiger Abbau beschrieben. Dieser wird durch eine GSK3β-abhängige Phosphorylierung vermittelt.

Der Mechanismus der TCF11/Nrf1 Aktivierung ist nur wenig verstanden. Subzelluläre Fraktionierungen zeigten, dass TCF11/Nrf1 in der inneren Kernmembran lokalisiert ist (Zhang et al., 2009). Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen ergaben, dass im Laufe seiner Aktivierung TCF11/Nrf1 aus der Membran heraus transloziert und proteolytisch prozessiert

wird. Die Retrotranslokation ist hierbei abhängig von VCP/p97, jedoch ist die Identität der fungierenden Protease noch umstritten (Radhakrishnan et al., 2014; Sha and Goldberg, 2014).

Neben der Regulation der Genexpression UPS-verwandter und antioxidativer Gene, spielt TCF11/Nrf1 auch in anderen Signalwegen eine bedeutende Rolle. So ist TCF11/Nrf1 an der Regulation des Glukose- sowie des Fettsäuremetabolismus beteiligt, beispielsweise durch negative Regulation des Glukosetransporters bzw. positive Regulation von Lipin 1 (Hirotsu et al., 2012; Hirotsu et al., 2014; Tsujita et al., 2014; Zheng et al., 2015). Des Weiteren kontrolliert TCF11/Nrf1 die Expression von Kinetochor-Proteinen und ist somit wichtig für die Zellteilung (Oh et al., 2012). Zudem ist TCF11/Nrf1 wichtig für die Zelldifferenzierung. Beispielsweise reguliert es die Expression von Osterix, einen essentiellen Transkriptionsfaktor für die Differenzierung von Osteoblasten, und des Dentin Matrixproteins 1, welches wichtig für die Mineralisierung von Knochen und Zähnen ist (Jacob et al., 2014; Xing et al., 2007). Ferner fördert TCF11/Nrf1 die Reifung von Gliazellen (Molofsky et al., 2013)

1.3.1.2. *Der Transkriptionsfaktor Nrf2*

Nrf2 ist essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Redox-Homöostase und unterliegt selbst einer strengen transkriptionellen und post-translationellen Kontrolle (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014). Als Folge von oxidativem und/oder elektrophilem Stress wird Nrf2 in den Nukleus transferiert, bindet als Heterodimer an ARE Sequenzen der Promotoren seiner Zielgene und aktiviert deren Expression. Die Zielgene von Nrf2 kodieren hauptsächlich für antioxidative sowie Phase II Enzyme. Auch Gene zellulärer Stoffwechselwege, Reparatur- und Abbauprozesse werden von Nrf2 aktiviert, und stellen einen bedeutenden Bestandteil der Stressantwort dar (Hu et al., 2006; Itoh et al., 1997; Wu et al., 2011). Ferner ist Nrf2 an der Expressionsregulation UPS- sowie Autophagie-relevanter Gene beteiligt. Kwak und Kollegen beschrieben eine Nrf2-abhängige Hochregulation proteasomaler Untereinheiten nach Behandlung mit Sulforaphan und 1,2-Dithiol-3-thion (Kwak et al., 2003a; Kwak et al., 2003b).

Keap1 ist der wichtigste negative Regulator von Nrf2. Ein Mangel an Keap1 führt zu einer Anreicherung von Nrf2 und folglich der Zunahme seiner Aktivität (Abb. 1.10 B; (Devling et al., 2005; Itoh et al., 1999; Wakabayashi et al., 2003)). Die Interaktion mit dem Keap1 Dimer wird über das hochaffine ETGE und niedrigaffine DLG Motiv der Neh2-Domäne vermittelt (McMahon et al., 2006; Tong et al., 2006). Keap1 fördert durch Assoziation mit dem Aktinzytoskelett die cytosolische Lokalisation von Nrf2. Es dient des Weiteren als Substratadapter für die Cullin 3-Rbx1 E3 Ligase-abhängige Ubiquitinierung sowie folglich dem proteasomalen Abbau des Transkriptionsfaktors (Kang et al., 2004; Kobayashi et al., 2004). Neben seiner Wirkung als Nrf2 Repressor, fungiert Keap1 mit seinen Redox-

sensitiven Cysteinen auch als Sensor für oxidativen und elektrophilen Stress (Dinkova-Kostova et al., 2002). Elektrophile oder Oxidantien reagieren mit der Thiolgruppe bzw. induzieren die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken. Beides resultiert in einer Konformationsänderung von Keap1, der Hemmung der Nrf2 Ubiquitinierung und dessen proteasomalen Abbau. Dabei bleibt die Interaktion mit Keap1 bestehen. Jedoch führt die Stabilisierung der Keap1-Nrf2 Komplexe zu einer Abnahme freier Keap1 Moleküle, wodurch neu synthetisierte Nrf2 Proteine stabilisiert und in den Nukleus transportiert werden (Baird et al., 2013). Nrf2 induziert wiederum die Expression seines Repressors Keap1 und kontrolliert dadurch seine eigene Aktivität (Lee et al., 2007). Neben dem Keap1-Cullin3-abhängigen Abbau wird Nrf2 auch durch eine GSK3 β -abhängige SCF/ β -TrCP-vermittelte Ubiquitinierung zum Abbau markiert (Abb. 1.10 C; (Rada et al., 2011)).

Die Nrf2 Aktivität wird außerdem durch post-translationale Modifizierungen und auf Ebene der eigenen Expression kontrolliert werden. Die Phosphorylierung durch die Src-A Kinase Fyn fördert den nukleären Export und hemmt so die Nrf2-abhängige Expression (Jain and Jaiswal, 2006). Einen positiven Einfluss auf die Nrf2 Aktivität hat die p300/CPB-vermittelte Acetylierung (Sun et al., 2009). Des Weiteren fördern andere Transkriptionsfaktoren, beispielsweise Myc oder NF- κ B, die Nrf2 Expression und verstärken somit dessen Aktivität (DeNicola et al., 2011; Rushworth et al., 2012). Interessanterweise autoregulierte Nrf2 seine eigene Expression durch Bindung der ARE Sequenz seines Promotors (Kwak et al., 2002).

1.3.2. Regulation der Genexpression des Immunoproteasoms

In Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs wird die Expression der Immuno-Untereinheiten durch pro-inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF α) sowie Typ I (Interferon α und β) und Typ II Interferone (IFN γ) induziert (Loukissa et al., 2000; Shin et al., 2006). In Mammalia reguliert IFN γ die Expression über den Jak-STAT1/IRF1-Signalweg (Jak: Janus Kinase; STAT: *Signal transducer and activator of transcription*, IRF: *Interferon regulatory factor*) (Chatterjee-Kishore et al., 1998; Foss and Prydz, 1999; Namiki et al., 2005). Eine basale Expression der Immuno-Untereinheiten ist hauptsächlich in lymphatischen und myeloiden Zellen zu beobachten. Untersuchungen in IFN γ Knockout Mäusen demonstrierten, dass die basale Synthese IFN γ unabhängig ist (Barton et al., 2002). Neben der Zytokin-induzierten Expression, wurde ferner eine Induktion der Immuno-Untereinheiten und des PA28 α/β Aktivators durch Oxidantien beobachtet (Ding et al., 2003; Pickering et al., 2010). Des Weiteren resultiert Stickstoffmonoxid in einer Hochregulation der Immuno-Untereinheiten, vermittelt durch die cGMP/cAMP-CREB Signalkaskade (Kotamraju et al., 2006).

1.4. Ziel der Arbeit

Eine feinabgestimmte Regulation des UPS ist unabdingbar für die Aufrechterhaltung der zellulären Protein Homöostase. Eine Anpassung des Proteasomsystems erfolgt einerseits über die Komposition sowie Assemblierung des Proteasoms und andererseits auf Ebene der Genexpression. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe demonstrierten bereits die Existenz eines autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus, der durch eine Induktion der Expression proteasomaler Gene und der folgenden Neubildung von Proteasomkomplexen eine Anpassung an eine verringerte Proteasomaktivität ermöglicht. Als Hauptregulator für diesen kompensatorischen Mechanismus wurde der Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 identifiziert. Dieser lokalisiert unter physiologischen Bedingungen in der ER-Membran und wird zügig ERAD-abhängig abgebaut. In Antwort auf Proteasominhibition wird TCF11/Nrf1 aktiviert und in den Nukleus transferiert wo er schließlich die ARE-gesteuerte Expression der proteasomalen Gene induziert (Meiners et al., 2003; Steffen et al., 2010). Der Aktivierungsprozess des Transkriptionsfaktors ist bisher nur wenig verstanden. Das Ziel der Arbeit war daher, ein besseres Verständnis über den Aktivierungsmechanismus von TCF11/Nrf1 zu erlangen. Der Fokus lag hierbei, bei der Identifikation des Auslösers für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors und folglich der TCF11/Nrf1-vermittelten Expression proteasomaler Gene. Dabei wurde die Auswirkung von zellulärem Stress, der durch die Hemmung des Proteasoms verursacht wird, auf die TCF11/Nrf1-abhängige Proteasomsynthese untersucht.

Das UPS ist von großer Bedeutung für die Funktion neuronaler Zellen. Eine Störung des UPS steht gemeinsam mit oxidativem Stress im engen Zusammenhang mit der Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen. Aus diesem Grund war die Charakterisierung der TCF11/Nrf1-abhängigen Proteasomregulation in dopaminergen SH-SY5Y Zellen und die Wechselwirkung zwischen oxidativem Stress und dem Proteasomsystem von weiterem Interesse.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht in der folgenden Liste aufgeführt (Tab. 2.1), von Merck, Roth oder AppliChem bezogen. Zellkulturmedien, -lösungen und -zusätze wurden von der Firma Biochrom erworben.

Tab. 2.1: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
ATP	Serva
Bortezomib	Cell Signaling
Bromphenolblau	Fluka
Chlorphenolro-β-D-Galactopyranosid (CPRG)	Roche
Complete Proteaseinhibitor	Roche
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
DCFH-DA (2'-7'-Dichlorofluorescein Diacetat)	Sigma-Aldrich
DNPH (2,4-Dinitrophenylhydrazin)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Roche
Epoxomicin	Calbiochem
GelRed ^{1M} Nucleic Acid Gel Stain	Biotium
Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS)	Gibco
Immumount	Thermo Scientific
MG132	Calbiochem
NEM (N-Ethylmaleimid)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Pan Biotech
PhosSTOP	Roche
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Gibco
Proteinase K	Fermentas
Retinsäure	Sigma-Aldrich
RNase A	Roche
Rotenon	Sigma-Aldrich
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC Substrat	Bachem
(L-)Sulforaphan	Sigma-Aldrich
[³⁵ S]-Methionin/[³⁵ S]-Cystein, TRAN35S-label	MP Biomedicals
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	Serva

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Kultivierung und Ernten von Säugetierzellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Materialien und Medien an einer Sterilbank (Laminair 1.8, Holten) durchgeführt.

Die verschiedenen Zelllinien wurden in den spezifischen Kulturmedien (siehe Tab. 2.1) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Anteil im Inkubatorschrank (Forma Scientific) kultiviert. Fötales Kälberserum (FCS) wurde vor Verwendung 30 min bei 56 °C erhitzt, um enthaltene Komplementfaktoren zu inaktivieren.

Tab. 2.2 Verwendete Zelllinien und spezifische Kulturmedien

Zelllinie	Kulturmedium
<u>Caco-2</u> ist eine humane Epithelzelllinie, die aus einem kolorektalen Adenokarzinom eines männlichen Patienten gewonnen wurde (Fogh et al., 1977).	Basal Iscove mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin
Die adhärente <u>Cos-7</u> Zelllinie entstammt der Niere der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>) und weist eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf. Gewonnen wurde sie durch Transformation der CV-1 Zelllinie mit einer defekten, Wildtyp-T-Antigen kodierenden Mutante von SV-40 (Gluzman, 1981).	DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin
<u>EA.hy926</u> ist eine humane, adhärente Zelllinie, die durch Fusion primärer Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) mit der permanenten Lungenkarzinom-Zelllinie A549 hergestellt wurde. Die Expression des Von-Willebrand-Faktors diente als Marker für die Selektion der Hybridklone (Edgell et al., 1983).	Basal Iscove mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin
Die humane, adhärente, Epithelien-ähnliche <u>HEK-293</u> (<i>human embryonic kidney</i>) Zelllinie wurde aus der Niere eines Fötus durch Transformation mit DNA-Fragmenten des humanen Adenovirus 5 gewonnen (Graham et al., 1977).	DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin
<u>HeLa</u> ist eine humane, adhärente, Epithelien-ähnliche Zelllinie und stammt aus einem Adenokarzinom des Gebärmutterhalses (Scherer et al., 1953).	Basal Iscove mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin
Die humane Zelllinie <u>LN-18</u> wurde aus dem Glioblastom des rechten Temporallappens eines Patienten gewonnen. Die Zellen haben eine epitheliale Morphologie und wachsen adhärent (Diserens et al., 1981).	DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin

<p><u>SH-SY5Y</u> sind humane, teilweise adhärenente Neuroblasten-ähnliche Zellen, die durch Subklonierung aus der SK-N-SH Zelllinie hergestellt wurden (Biedler et al., 1978). Die SK-N-SH Zelllinie wurde aus dem Knochenmark einer Patientin mit einem Neuroblastom gewonnen (Biedler et al., 1973).</p>	<p>DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin</p>
<p>Die humane <u>SK-N-BE(2)</u> Zelllinie wurde aus dem Knochenmark eines Patienten mit einem Neuroblastom hergestellt. Die teilweise adhärenenten Zellen weisen eine Neuroblasten-ähnliche Morphologie auf (Biedler et al., 1978).</p>	<p>RPMI mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin</p>

Nach Erreichen einer 70-80 %igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie zunächst mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Durch Zugabe des 10 fachen Volumens an Kulturmedium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Heraeus Multifuge 3S-R centrifuge, Thermo Fisher Scientific) bei 350 x g für 5 min pelletiert, in frischem Kulturmedium aufgenommen und entsprechend der gewünschten Verdünnung neu ausgesät. Die Lebendzellzahl wurde mikroskopisch (Leitz DMIL, Leica) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und durch Anfärben toter Zellen mit Trypanblau bestimmt.

Zum Ernten wurden die Zellen bei 4 °C mechanisch in 1 x PBS von dem Zellkulturgefäß abgelöst und durch Zentrifugation mit 500 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert und entweder bei – 80 °C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

1 x PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2

2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Säugetierzellen

Zur Langzeitlagerung der Säugetierzellen wurden diese zunächst mit 1 x PBS gewaschen, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturgefäß gelöst und anschließend 2-mal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Die Zentrifugationen wurden bei 4 °C mit 500 x g für 5 min durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox über Nacht auf – 80 °C abgekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese schnell im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und sofort mit 20 ml Kulturmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen. Danach wurden die Zellen in dem spezifischen Medium aufgenommen und auf einer Kulturschale ausgesät.

Einfriermedium: Kulturmedium supplementiert mit 10 % FCS und 10 % DMSO

2.2.3. Differenzierung von SH-SY5Y Zellen

Um SH-SY5Y Zellen zu differenzieren, wurden diese für mindestens 7 Tage in Gegenwart von 10 μM Retinsäure (RA) kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt und RA immer frisch zugegeben.

Stocklösung: 60 mM RA in DMSO

2.2.4. Transfektion von Säugetierzellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA aus 2.3.3 erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen am Vorabend der Transfektion ausgesät. Hierbei war die Anzahl der Zellen abhängig von der Zelllinie sowie der Fläche des Kulturgefäßes (siehe Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Zellzahl entsprechend der Zelllinie und Gefäßfläche

Zelllinie	Zellen pro Well	Plasmid-DNA
		[μg]
6 Well		
SH-SY5Y	3×10^5	3
24 Well		
EA.hy926	10^5	1
SH-SY5Y	$0,5 \times 10^5$	1
96 Well		
SH-SY5Y	10^4	0,2

Während der Transfektion wurden die Zellen in Antibiotikum-freiem Kulturmedium kultiviert. Plasmid-DNA und Lipofectamine 2000 wurden im Verhältnis 1:1 zugegeben, wobei die Menge der Plasmid-DNA abhängig von der Gefäßfläche war (siehe Tab. 2.3). Nach 6 h wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden frühestens 24 h nach der Transfektion geerntet. Die verwendeten Plasmid-DNA Konstrukte werden in folgender Tabelle aufgelistet (siehe Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Verwendete DNA-Konstrukte

Name	Insert	Vektor	Hersteller
pcDNA3.1-V5/His-TOPO		pcDNA3.1-V5/His-TOPO	Invitrogen
TCF11-V5	TCF11 (ORF) ohne Stopcodon	pcDNA3.1-V5/His-TOPO	J. Steffen
Nrf1-V5	Nrf1 (ORF) ohne Stopcodon	pcDNA3.1-V5/His-TOPO	J. Steffen
pCAT_{basic}		pCAT3 _{basic}	Promega
pCAT1500	ca. 1500 bp vom PSMB6 Promotor	pCAT3 _{basic}	D. Heyken
pcDNA3.1-Zeo/lacZ	lacZ (ORF)	pcDNA3.1-Zeo(+)	Invitrogen

2.2.5. Transfektion von Säugetierzellen mit siRNA

Zur Transfektion von Zellen mit siRNA wurde das X-treme Gene Transfektionsreagenz von Roche verwendet. Die eingesetzte Zellzahl war abhängig von der Fläche des Zellkulturgefäßes, der Zelllinie sowie der Transfektionsdauer des jeweiligen Experimentes (siehe Tab. 2.5).

Tab. 2.5: Zellzahl entsprechend der Zelllinie, Gefäßgröße und Transfektionsdauer

Zelllinie	Zellzahl/Well abhängig von der Transfektionsdauer		
	24 h	48 h	72 h
6 Well			
EA.hy926	5×10^5	3×10^5	10^5
HeLa	2×10^5	-	10^5
SH-SY5Y	3×10^5	2×10^5	-
96 Well			
EA.hy926	2×10^4	-	-
SH-SY5Y	10^4	-	-

Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion auf 6 Well Platten ausgesät. Dauerte die Behandlung der Zellen mit siRNA länger als 48 h, oder wurde die Transfektion der Zellen auf 96 Well Platten durchgeführt, wurden die Zellen am Tag der Transfektion ausgesät und nach dem Adhären (3-4 h) mit siRNA transfiziert. Die Transfektion wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA Konzentration der Transfektionsreagenz-siRNA-Lösung betrug 0,4 μ M. Die verwendeten siRNAs werden im Folgenden aufgelistet (Tab. 2.6).

Tab. 2.6: Verwendete siRNAs

Zielgen	Katalognummer	Hersteller
Kontrolle, ON-TARGETplus control Pool	D-001810-10-20	GE Dharmacon
Nrf2 Hs_NFE2L2_7 FlexiTube siRNA	SI03246950	Qiagen
PSMB4/β7 ON-TARGETplus Human PSMB4 (5692) siRNA - SMARTpool	L-011362-00-0005	GE Dharmacon
PSMD4/Rpn10 siGENOME Human PSMD4 (5710) siRNA - SMARTpool	M-011365-01-0005	GE Dharmacon
TCF11/Nrf1 ON-TARGETplus Human NFE2L1 (4779) siRNA - SMARTpool	L-019733-00-0005	GE Dharmacon

2.2.6. Cycloheximid-Abbau-Experiment

Zur Hemmung der Translation wurden die SH-SY5Y Zellen in Gegenwart von 50 μ g/ml Cycloheximid für 15 bis 45 min kultiviert. Für die 0 min Kontrolle wurden Zellen direkt vor der Cycloheximidzugabe geerntet. Die Zellernte erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen (siehe Kapitel 2.4.1.1) und mittels SDS-PAGE und Immunoblot die Proteinmenge analysiert (siehe Kapitel 2.4.3 und 2.4.5).

2.2.7. Metabolische [35 S]-Markierung

Für die metabolische Markierung von SH-SY5Y Zellen mit [35 S]-Methionin/[35 S]-Cystein wurden die Zellen auf 6 Well Platten ausgesät und wie unter 2.2.5 beschrieben mit siRNA transfiziert. Die Zellen wurden während der letzten 16 – 18 h der 48 stündigen

genspezifischen Depletion mit 10 nM Epoxomicin, 100 nM Rotenon oder zur Kontrolle mit 0,1 % DMSO behandelt. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und für 1,5 h in Methionin- und Cystein-freiem RPMI-Medium gehungert. Zur Markierung frisch translaterter Proteine wurden die Zellen in Gegenwart von 100 μCi [^{35}S]-Methionin/[^{35}S]-Cystein pro Well für 3 h kultiviert. Nach viermaligen Waschen mit eiskaltem 1 x PBS wurden die Zellen in 500 μl NP-40-Lysepuffer pro Well für 5 min aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (siehe 2.4.1.1). Mittels Flüssigszintillationsmessung (Wallac 1409 Liquid Scintillation counter) wurde vom NP-40 Lysat die [^{35}S]-Aktivität bestimmt.

2.2.8. Messung Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der intrazellulären ROS wurde das Zell-permeable 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFH-DA) verwendet. Dieses wird in der Zelle von Esterasen zu dem nicht fluoreszierenden 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) deacetyliert und anschließend in Gegenwart von ROS schnell zu dem stark fluoreszierenden 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF) oxidiert.

Zur Quantifizierung der intrazellulären ROS wurden zunächst 10^5 SH-SY5Y Zellen pro Well einer 24 Well Platte ausgesät und abhängig von der jeweiligen Fragestellung behandelt. Am Folgetag wurden die Zellen mit 500 μL Hanks gepufferte Salzlösung (HBSS) pro Well gewaschen und anschließend mit 500 μl 10 μM DCFH-DA-haltigem, FCS-freiem Kulturmedium pro Well für 30 min kultiviert. Nach zweimaligen Waschen mit 500 μl HBSS pro Well wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA von der Platte abgelöst, in 500 μl Kulturmedium verdünnt und die Suspension in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte am FACSCalibur™ Durchflusszytometer (BD Bioscience) im Fluoreszenzkanal 1 (FI-1).

DCFH-DA Stammlösung: 10 mM in DMSO

2.2.9. Immunocytochemie

Um Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, wurden diese zunächst auf Deckgläschen kultiviert und entsprechend der jeweiligen Fragestellung behandelt.

Für die Fixierung wurden die Deckgläschen dann in eine 24 Well Platte überführt, mit 1 x PBS gewaschen und mit Paraformaldehyd fixiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 20 min in einer 4 % (w/v) Paraformaldehydlösung inkubiert, dann dreimal mit 1 x PBS gewaschen, für 10 min mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 permeabilisiert und nochmals dreimal gewaschen. Für die Immunfärbung wurden die Zellen zunächst für 30 min mit 3 % (w/v) FCS blockiert. Dann wurden die Zellen für eine Stunde mit dem primären Antikörper (siehe Tab. 2.7) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte eine einstündige Inkubation im Dunkeln mit

dem sekundären Fluoreszenzantikörper (siehe Tab. 2.7). Nach zwei weiteren Waschschritten wurde die DNA der Zellen für 10 min im Dunkeln mit DAPI angefärbt. Die Deckgläschen wurden anschließend dreimal mit 1 x PBS und einmal mit H₂O gewaschen und in Immumount eingebettet. Die Proben wurden bis zum Zeitpunkt der Konfokal-Mikroskopie (DM IRE2, Leica) im Dunkeln gelagert.

Tab. 2.7: Antikörper, die in Immunofluoreszenz Experimenten verwendet wurden.

Primärer Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Calnexin, mcM	1:50	BD Biosciences
TCF11/Nrf1 (D5B10), mcRb	1:50	Cell Signaling
TCF11 (H285), pcRb Lot: C2405	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Sekundärer Antikörper (Invitrogen)		
g α m IgG Alexa Fluor® 488	g α m IgG Alexa Fluor® 633	
g α rb IgG Alexa Fluor® 488	g α rb IgG Alexa Fluor® 633	

2.2.10. Bestimmung der Zellviabilität

2.2.10.1. *Apoptose Assay*

Die Apoptose wurde unter Verwendung des Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei mit der Hälfte des angegebenen Reaktionsvolumens gearbeitet wurde. Zunächst wurden 10⁴ SH-SY5Y Zellen auf einer schwarzen 96 Well Platte ausgesät. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten (3-4 h), wurden diese gegebenenfalls mit Plasmid-DNA, wie unter 2.2.4 beschrieben, transfiziert. 5 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 20 h mit Rotenon, Epoxomicin oder als Kontrolle mit 0,1 % DMSO behandelt. Untransfizierte Zellen wurden für 24 h exponiert. Als Positivkontrolle dienten mit 10 μ M MG132 behandelte Zellen. Für jede Bedingung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.10.2. *XTT Assay*

Der XTT Assay (AppliChem) wurde zur Bestimmung der Zellviabilität verwendet. Das Tetrazoliumsalz XTT wird von metabolisch aktiven Zellen zu seinem wasserlöslichen

orangen Formazan reduziert. Die Messung erfolgte nach Angaben des Herstellers. 10^4 SH-SY5Y Zellen wurden auf einer 96 Well Platte ausgesät und 3-4 h später mit siRNA (siehe 2.2.5) transfiziert. Untransfizierte sowie transfizierte Zellen wurden für 18-20 h in Gegenwart von Rotenon oder 0,1 % DMSO kultiviert. Als Negativkontrolle dienten mit 0,5 % NP-40 behandelte Zellen. Für jede Bedingung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde photometrisch (NanoVue plus, GE Healthcare Life Sciences) bei 260 nm durchgeführt. Hierbei entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis der Absorption von 280 nm zu 260 nm ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte bei einer DNA-Lösung bei 1,8 und im Fall einer RNA-Lösung bei 2,0 liegen.

2.3.2. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock in kompetente *E. coli* DH5 α transformiert. Hierzu wurden 100 µl Zellsuspension langsam auf Eis aufgetaut und mit 50 ng Plasmid-DNA versetzt. Einer 30 minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 60 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt, mit 500 µl Antibiotika-freiem LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Dann wurden 100 µl bzw. 200 µl des Transformationsansatzes auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Agar-Platten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; autoklaviert; ggf. Antibiotikumzugabe zur Selektion

Agar-Platten: LB-Medium + 1,5 % Agar, autoklaviert; ggf. Antibiotikumzugabe zur Selektion

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

Zur Vervielfältigung von DNA-Konstrukten wurden am Morgen 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie aus 2.3.2 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am Abend wurde die Vorkultur in 200 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des Plasmid Maxi Kits (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokolls.

2.3.4. Phenol/Chloroform/Ethanol DNA-Präzipitation

Die Phenol/Chloroform/Ethanol Präzipitation dient der Aufreinigung von DNA. Hierzu wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform-Lösung (Roth) zu der DNA-Lösung gegeben und durch Vortexen gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 14.000 x g für 1 min wurde die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt, gemischt und nochmals zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde im Folgenden mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Durch eine Zentrifugation bei 14.000 x g für 15 min wurde die DNA pelletiert, anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde schließlich in Wasser gelöst.

2.3.5. Isolierung von RNA aus Säugetierzellen

Die Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde unter Verwendung des High Pure RNA Isolation Kits (Roche) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Lösung wurde bei -80 °C gelagert.

2.3.6. cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte unter Verwendung des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers. Eingesetzt wurden 0,5 – 2 µg RNA.

2.3.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Fragmente *in vitro* (Mullis and Faloona, 1987). Als Matrize wurde entweder die cDNA aus 2.3.6 oder CHIP-DNA aus 2.3.11 verwendet. Die PCR-Reaktion erfolgte in Gegenwart spezifischer Primer (siehe Tab. 2.8) und unter Verwendung des FastStart High Fidelity PCR Systems von Roche im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Die Zusammensetzung des 25 µl PCR-Reaktionsansatzes war wie folgt:

1 – 3 µl	Matrizen-DNA
1 x	Reaktionspuffer
0,5 %	DMSO
200 µM	dNTPs
0,2 µM	Forward Primer
0,2 µM	Reverse Primer
2,5 U	Polymerase

Die Amplifikationsreaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30-60 sec	Zyklenzahl: siehe Tab. 2.8
Oligonukleotid-Hybridisierung	siehe Tab. 2.8	30-60 sec	
Elongation	72 °C	30 sec pro 500 bp	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

Tab. 2.8: Verwendete Primer, Sequenz und Primer-spezifische Eigenschaften des PCR-Programm

Bezeichnung	Sequenz	Produktlänge	Anzahl d. Zyklen	$T_{\text{Hybridisierung}}$
Aktin-for	GGCCGGCTTCGCGG GCGACG	1049 bp	30	60 °C
Aktin-rev	AGGGGCCGGACTCGT CATACTC			
CHIP-PSMA3-ARE45-for	CCACAATACTCCTCGT CCTGG	161 bp	35	60 °C
ChIP-PSMA3-ARE45-rev	CAAAGGGACGCGTAG GGATTC			
ChIP-PSMB6-ARE17-for	GCTTCGCTCCCAGAA GGCC	185 bp	35	60 °C
ChIP-PSMB6-ARE17-rev	GAAACTTCTCGGCTTT CCCAGTC			
ChIP-Tub-for	GTCGAGCCCTACAAC TCTATC	194 bp	30	63 °C
ChIP-Tub-rev	CCGTCAAAGCGCAGA GAA			
GAPDH-for	CAGACACCATGGGGA AGGTG	1076 bp	30	55-60 °C
GAPDH-rev	CAGCAGTGAGGGTCT CTCTC			
TCF11/Nrf1-for	CTAGTGGATGGAGAG ACTGG	TCF11: 166 bp; Nrf1: 76 bp	30	55 °C
TCF11/Nrf1-rev	GCACTGCTTCTGTTAT GCTGG			
XBP-1-for	CCTTGTAGTTGAGAA CCA GG	XBP1 _{ungespleißt} : 442 bp; XBP-1 _{gespleißt} : 416 bp	30	56 °C
XBP-1-rev	GGGGCTTGGTATATA TGT GG			

for: forward; rev: reverse

2.3.8. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde zur Bestimmung der relativen Genexpression verwendet. Die Amplifikation der cDNA aus 2.3.6 (1-2 μ l) erfolgte mittels eines spezifischen TaqMan® Gene Expression Assays (Tab. 2.9) und dem TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) in einem 10 μ l Reaktionsansatz entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die PCR-Reaktion wurde im Rotor Gene 3000 (Corbett Research) durchgeführt.

Die relative Expression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta$ CT Methode berechnet und gegen die mRNA Menge des Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (*HPRT1*) Gens normiert.

Tab. 2.9: Verwendete TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

Gen/Protein	Assay Nummer
<i>HPRT1</i>	Hs99999909_m1
<i>HSPA5/BiP</i>	Hs00607129_gH
<i>HSP90B1/GRP94</i>	Hs00427665_g1
<i>NFE2L1/TCF11/Nrf1</i>	Hs00231457_m1
<i>NFE2L2/Nrf2</i>	Hs00232352_m1
<i>PSMA2/α2</i>	Hs00855061_sH
<i>PSMA3/α7</i>	Hs00541061_m1
<i>PSMB4/β7</i>	Hs01123843_g1
<i>PSMB5/β5</i>	Hs00605652_m1
<i>PSMB6/β1</i>	Hs00382586_m1
<i>PSMB8/LMP7</i>	Hs00188149_m1
<i>PSMC4/Rpt3</i>	Hs00197826_m1

2.3.9. Agarosegelelektrophorese (Agarose-GE)

Die DNA wurde entsprechend ihres Molekulargewichts im 0,7-2 %igen Agarosegel in 1 x TAE Puffer bei einer Spannung von 100 V aufgetrennt. Vor dem Gellauf wurden die DNA-

Proben mit Probenpuffer versetzt. Die Detektion erfolgte auf einem UV-Leuchttisch (Fusion FX, Peqlab). Ein 1 kb DNA-Marker von NEB oder von Invitrogen wurde als Größenstandard mitgeführt.

1 x TAE Puffer:	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA
Agarosegel:	0,7-2 % (w/v) Agarose, GelRed™ (1:20 000) in 1 x TAE Puffer
6x DNA-Probenpuffer:	50 % (v/v) Glycerin; 50 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau und/oder 0,25 % (w/v) Xylencyanol

2.3.10. Reportergen-Assay

Zur Untersuchung der *PSMB6*/β1 Genexpression wurde das Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Reportergen unter Kontrolle des *PSMB6*/β1 Promotors in Zellen exprimiert. Die CAT Konzentration wurde anschließend unter Verwendung des *CAT-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Kits von Roche ermittelt. Zunächst wurden SH-SY5Y Zellen auf 24 Platten ausgesät und wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben mit 0,9 µg pCAT1500 und 0,1 µg pcDNA3.1-LacZ ko-transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der pCAT_{basic} Leervektor transfiziert. Nach der Plasmidtransfektion wurden die Zellen entsprechend der Fragestellung des Versuches weiter behandelt. Etwa 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend direkt auf dem Kulturgefäß durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer (CAT-ELISA Kit, Roche) für 20 min bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Nachdem die Zelltrümmer durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C abzentrifugiert wurden, wurden 25 µl Lysat in den CAT-ELISA eingesetzt. Der ELISA wurde gemäß der Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde von den Lysaten ebenfalls die β-Galaktosidaseaktivität im 96 Well Format gemessen. Dazu wurden 20 µl Lysat mit 130 µl Chlorphenolrot-β-D-Galactopyranosid (CPRG)-Lösung versetzt und nach etwa einer Stunde bei 37 °C der Substratumsatz im Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek) bei 570 nm detektiert. Die CAT-Konzentration wurde schließlich auf die β-Galaktosidaseaktivität normiert.

CPRG-Lösung:	1,2 mg/ml CPRG, 100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄
---------------------	---

2.3.11. Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Interaktion zwischen Proteinen und DNA wurde mittels ChIP untersucht.

Dazu wurden am Vortag 2 x10⁶ SH-SY5Y Zellen auf einer 10 cm Schale ausgesät und entsprechend der Fragestellung behandelt. Am Folgetag wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend durch eine 10 minütige Inkubation in 1 % PFA die

Interaktion zwischen dem Protein und dem Chromatin fixiert. Um die Fixierung zu stoppen, wurden die Zellen für 5 min in Gegenwart von 125 mM Glycin inkubiert. Dem folgten zwei Waschschrte mit 10 μ M PMSF-enthaltendem, eiskaltem 1 x PBS. Die Zellen wurden von dem Kulturgefäß abgeschabt und für 10 min bei 500 x g und 4 °C pelletiert. Danach wurden die Zellen in Quellpuffer resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und durch 10 Hübe im Potter aufgebrochen. Durch Zentrifugation für 10 min bei 2.200 x g und 4 °C wurden die Zellkerne abgetrennt und anschließend für 10 min in SDS-Lysepuffer auf Eis lysiert. Die Kernlysate wurden auf drei Aliquots aufgeteilt und die Protein-gebundene DNA mittels Ultraschallbehandlung für 30 sec (0,5 Zyklus/100 % Amplitude; Ultraschallprozessor von Dr. Hielscher GmbH) auf Eis fragmentiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 14.000 x g und 4 °C wurde der Überstand, der die Transkriptionsfaktor/DNA Komplexe enthält, abgenommen und gleiche Proteinmengen in der IP eingesetzt. Die Protein/DNA Lösung wurde mit Verdünnungspuffer auf 1 ml aufgefüllt und zunächst für 30 min mit abgesättigter Protein G Sepharose vorgereinigt. Von dem geklärten Überstand wurden 2 % als Ausgangs-DNA abgenommen. Der restliche Überstand wurde mit 2 μ g eines spezifischen Antikörpers versetzt und über Nacht bei 4 °C am Rad inkubiert. Als Kontrolle diente ein unspezifischer IgG (Cell Signaling) Antikörper. Am Folgetag wurde abgesättigte Protein G Sepharose zugesetzt und 1 h bei 4 °C am Rad präzipitiert. Die Präzipitate wurden im Anschluss für 1 min bei 600 x g pelletiert und zweimal mit Waschpuffer 1, einmal mit Waschpuffer 2 und einmal mit dem LiCl-Waschpuffer gewaschen. Dem folgten zwei Waschschrte für 5 min bei 4 °C am Rad in TE-Puffer. Danach wurden die Protein/DNA-Komplexe zweimal mit jeweils 200 μ l Elutionspuffer bei 65 °C für 15 min eluiert. Die Eluate wurden vereint und die Ausgangs-DNA wurde ebenfalls mit Wasser auf 400 μ l aufgefüllt.

Im nächsten Schritt folgte die Trennung der Protein/DNA-Komplexe durch Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 200 mM. Danach wurden 16 μ l 1 M Tris pH 6,8; 8 μ l 0,5 M EDTA und 0,85 μ l Proteinase K (18,7 μ g/ μ l) zugegeben und für 2 h bei 45 °C die Proteine verdaut. Die DNA wurde unter Verwendung der Phenol/Chloroform/Ethanol Präzipitation aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.4) und schließlich in 16 μ l Wasser gelöst.

Quellpuffer: 10 mM HEPES, pH 7,82; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; complete EDTA-frei; 0,5 μ M PMSF

SDS-Lysepuffer: 50 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA; 1 % SDS; complete; 10 μ M MG132

Protein-G Sepharose Suspension,

abgesättigt: 1 mg/ml BSA und 0,5 mg/ml Lachssperma DNA; 2 mg/ml Protein G Sepharose Lösung in 1 x PBS

Verdünnungspuffer: 16,7 mM Tris, pH 8,0; 167 mM NaCl; 1,2 mM EDTA; 1,1 % Triton X-100; 0,01 % SDS; complete; 10 μ M MG132

Waschpuffer 1:	20 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % SDS
Waschpuffer 2:	20 mM Tris, pH 8,0; 500 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 0,1 % SDS
LiCl-Waschpuffer:	10 mM Tris, pH 8,0; 250 mM LiCl; 1 mM EDTA; 1 % NP-40; 1 % Natriumdesoxycholat
TE-Puffer:	10 mM Tris, pH 8,0; 1 mM EDTA
Elutionspuffer:	1 % SDS; 100 mM NaHCO ₃ (immer frisch angesetzt)

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Zellyse und subzelluläre Fraktionierung

2.4.1.1. *Denaturierende und nicht-denaturierende Zellyse*

Die Zellen wurden durch Resuspension in RIPA-Puffer und einer anschließenden Inkubation auf Eis für 20 – 30 min unter denaturierenden Bedingungen vollständig aufgeschlossen. Sollten im Folgenden die Menge polyubiquitinerter Proteine der Proben bestimmt werden, wurde der RIPA-Puffer zusätzlich mit 10 mM N-Ethylmaleimide (NEM), einem Deubiquitinase Inhibitor, versetzt.

Der Zellaufschluss mit NP-40-Lysepuffer bei 4 °C ermöglichte die Verwendung der Proteinlysate in einer Ko-Immunoprecipitation und somit die Analyse von Proteinkomplexen oder Interaktionspartnern.

Ein Zellaufschluss unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte durch Resuspension der Zellen in TSDG-Puffer und drei darauffolgenden Frier/Tau Zyklen in flüssigem Stickstoff.

Anschließend wurden die Lysate 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

RIPA-Puffer:	50 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Natriumdesoxycholate; Frisch zugegeben: Complete Proteaseinhibitor; PhosSTOP; 10 µM MG132
NP-40-Lysepuffer:	50 mM Tris pH 7,5; 50 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; Frisch zugegeben: 0,5 % NP-40; complete Proteaseinhibitor; 10 µM MG132
TSDG-Puffer:	10 mM Tris pH 7,0; 10 mM NaCl; 25 mM KCl; 1,1 mM MgCl ₂ ; 0,1 mM EDTA; 1 mM NaN ₃ ; 20 % Glycerin; Frisch zugeben: 1 mM DTT; 2 mM ATP

2.4.1.2. *Fraktionierung von nicht-nukleären und nukleären Proteinen*

Um nicht-nukleäre und nukleäre Proteine voneinander zu trennen, wurden die Zellen zunächst in Puffer A resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellmembranen in Gegenwart von 0,25 % (v/v) NP-40 für 3 min auf Eis aufgebrochen. Danach wurden die Zellkerne für 10 min bei 5.000 x g und 4 °C pelletiert und die Fraktion der nicht-nukleären Proteine in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Kerne wurden dann in Puffer B für 30 min auf Eis aufgeschlossen. Durch eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C wurden die genomische DNA und Zelltrümmer abgetrennt und die nukleäre Proteinfraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Puffer A: 10 mM HEPES pH 7,82; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; Frisch zugegeben: Complete Proteaseinhibitor; PhosSTOP; 10 µM MG132

Puffer B: 20 mM HEPES pH 7,82; 500 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % Glycerin; Frisch zugegeben: Complete Proteaseinhibitor; PhosSTOP; 10 µM MG132

2.4.1.3. *Fraktionierung von cytosolischen, Membran- und nukleären Proteinen*

Zur Trennung cytosolischer, Membran- und nukleärer Proteine wurden die Zellen zunächst im Puffer 1 resuspendiert. Abhängig vom Zelltyp wurden die Zellen durch eine 20 minütige Inkubation auf Eis oder durch 3 Frier/Tau Zyklen aufgeschlossen. Die cytosolische Fraktion wurde durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 1.000 x g und 4 °C abgetrennt und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde zur Gewinnung der Membranproteine in Puffer 2 resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation für 10 min bei 6.000 x g und 4 °C von den Zellkernen abgetrennt. Der Überstand mit den Membranproteinen wurde abgenommen und die Kerne wurden in RIPA-Puffer (siehe Kapitel 2.4.1.1) für 30 min auf Eis aufgeschlossen. Zum Schluss wurden die genomische DNA und die Zelltrümmer für 10 min bei 6.800 x g und 4°C abzentrifugiert und die nukleäre Fraktion in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Puffer 1: 50 mM Tris pH 7,7; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl₂, Frisch zugegeben: Complete Proteaseinhibitor; PhosSTOP; 10 µM MG132

Puffer 2: Puffer 1 + 1 % NP-40

2.4.1.4. *Subzelluläre Fraktionierung*

Die Isolation cytosolischer, membrangebundener, nukleärer sowie chromatingebundener Proteine erfolgte mit dem *Subcellular Protein Fractionation Kit* von Roche nach Angaben des Herstellers.

2.4.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE wurden 5-20 µg Protein in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (modifiziert nach (Laemmli, 1970)). Entsprechend dem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine erfolgte die Separation in 8; 10; 12,5 oder 15 %igen homogenen Polyacrylamidgelen. Sollten Proteine mit sehr unterschiedlicher Masse in einem Gel untersucht werden, wurden 6,5-13 %ige oder 8-18 %ige Gradientengele verwendet. Vor der Elektrophorese wurden die Proben in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die SDS-PAGE wurde unter Verwendung des Elektrophoresesystems der Firma Hoefer durchgeführt. Der Gellauf erfolgte zunächst bei 70 V für etwa 20 min. Nachdem sich die Proben am Übergang zwischen dem Sammel- und Trenngel fokussiert hatten, wurde die Auftrennung bei 160 V für 45-90 min fortgesetzt. Der Protein Standard *PageRuler Prestained Protein Ladder* von Fermentas wurde als Größenstandard mitgeführt.

SDS-Polyacrylamidgele mit separierten radioaktiv-markierte Proteine wurden auf Filterpapier getrocknet und anschließend die radioaktiven Signale am Phosphorimager (FLA3000, FUJI) sowie mit Autoradiographie-Filmen (Kodak) detektiert.

Trenngel:	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) in entsprechender Konzentration; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS (w/v); 0,1 % APS (v/v); 0,05 % TEMED (v/v)
Sammelgel:	5 % Acrylamid (v/v); 0,13 % Bisacrylamid (v/v); 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS (w/v); 2,5 % APS (v/v); 0,25 % TEMED (v/v)
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris pH 8,5; 200 mM Glycin; 0,1 % SDS (w/v)
6 x SDS-Probenpuffer:	0,35 M Tris pH 6,8; 30 % Glycerin (v/v); 10 % SDS (w/v); 9,3 % DTT (w/v); 0,006 % Bromphenolblau (w/v)

2.4.4. NATIV-Polyacrylamidgelelektrophorese (NATIV-PAGE) und in Gel Aktivitätsmessung

Zur Untersuchung nativer Proteasomkomplexe wurden 10-20 µg frisches, natives TSDG-Proteinlysate mit Nativ-Probenpuffer versetzt und in einem nicht-denaturierenden NativePAGE™ Novex® 3-12% Bis-Tris Gel von Invitrogen aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte bei 70 V über Nacht in einer Elektrophoresekammer von Hoefer bei 4 °C. Der native Protein Standard *NativeMark™ Unstained Protein Standard* von Invitrogen wurde als Größenstandard mitgeführt.

Die proteolytische Aktivität der separierten nativen Proteasomkomplexe wurde im Gel durch Zugabe des fluorogenen N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin (Suc-LLVY-AMC) Substrates ermittelt. Dazu wurde das Gel für 20 min in Testpuffer bei 37 °C im Dunkeln auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität durch Detektion der vom Proteasom abgespaltenen, fluoreszierenden AMC-Gruppe nach Anregung bei 390 nm bei einer Emission von 460 nm am Fusion (Peqlab) visualisiert. Eine densitometrische Auswertung der Fluoreszenz Signale erfolgte unter Verwendung der ImageJ Software.

Anodenpuffer:	50 mM BisTris pH 6,8; 50 mM Tricin;
Kathodenpuffer:	Anodenpuffer + 2 mM ATP [Stock: 100 mM ATP in H ₂ O]
Nativ-Probenpuffer:	50 mM BisTris pH 7,2; 50 mM NaCl; 10 % Glycerin; 0,25 % Bromphenolblau
Testpuffer:	30 mM Tris pH 7,8; 10 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM NaN ₃ , Frisch zugeben: 50 µM ATP [Stock: 100 mM ATP in H ₂ O]; 0,5 mM DTT; 100 – 200 µM Suc-LLVY-AMC [Stock 10 mM in DMSO]

2.4.5. Immunoblot

Proteine mit einem hohen Molekulargewicht wurden unter Verwendung des Nass-Blotverfahrens in Gegenwart des Nass-Blotpuffers in einer Mini Trans-Blot Kammer von Biorad aus dem Gel auf eine zuvor mit Methanol aktivierte PVDF Membran (Millipore) transferiert. Sollten Proteine mit einem kleinen Molekulargewicht untersucht werden, wurde der Transfer in einem Semi-Dry Blotter von OWL in Gegenwart des Semidry-Blotpuffers durchgeführt. Der Übergang der Proteine auf die Membran erfolgte bei 400 mA für 45-90 min. Native Gele wurden vor dem Transfer 15 min in Blotpuffer äquilibriert.

Der Proteintransfer wurde durch Anfärben der Membran mit einer Amidoschwarzlösung überprüft. Nachdem die Membran mit Wasser wieder entfärbt wurde, wurden die freien Bindungsstellen der Membran in einer einstündigen Inkubation auf dem Schüttler bei 250 rpm in der Blocklösung abgesättigt (siehe Tab. 2.10). Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler mit dem primären Antikörper (siehe Tab. 2.10). Nach drei 10 minütigen Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran für eine Stunde in Gegenwart eines Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers gegen Maus oder Kaninchen (Calbiochem) geschüttelt und erneut dreimal für 10 Minuten gewaschen.

Im Anschluss wurde die Peroxidase-vermittelte Chemilumineszenzreaktion durch Zugabe des ECL Plus Western Blotting Reagenzes eingeleitet und entweder durch Exposition eines Röntgenfilms (Kodak) oder am Fusion (Peqlab) detektiert. Eine densitometrische Auswertung der Chemilumineszenz Signale erfolgte unter Verwendung der ImageJ Software.

Nass-Blotpuffer:	25 mM Tris pH 8,3; 187 mM Glycin; 10 % Methanol (v/v)
Semidry Blotpuffer:	12,5 mM Tris pH 8,5; 100 mM Glycin; 0,05 % SDS (w/v); 20 % Methanol (v/v)
Amidoschwarzlösung:	9 % Methanol (v/v); 2 % Essigsäure (v/v); 0,02 % Amidoschwarz 10B (w/v)
TBS-T:	50 mM Tris HCl pH 7,9; 154 mM NaCl; 0,1-0,5 % (v/v) Tween
Sekundäre Antikörper:	1:5000 in TBS-T

Tab. 2.10: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Blocklösung	Hersteller
β -Aktin (C4), mcM	1:10000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Santa Cruz Biotechnology
Calnexin, mcM	1:1000 GL; 1:5000 MF	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	BD Biosciences
DNP, pcRb	1:2000	1 % BSA in TBS-T	Sigma
eIF2 α , pcRb	1:1000	5 % BSA in TBS-T	Cell Signaling
GAPDH, pcRb	1:30000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Santa Cruz Biotechnology
Histon H3 (D1H2) XP, mcRb	1:2000 GL; 1:6000 KF	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Cell Signaling
HSPA5/BiP/GRP78	1:1000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Abcam
Lamin B1, mcM	1:1000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Invitrogen
Nrf2 (H-300), pcRb	1:1000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Santa Cruz Biotechnology
PA28 β , pcRb	1:5000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Cell Signaling
P-eIF2 α (Ser51), pcRb	1:1000	5 % BSA in TBS-T	Cell Signaling
P-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236), pcRb	1:4000	5 % BSA in TBS-T	Cell Signaling
PSMA1/ α 6 MCP20, mcM	1:20000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Enzo Life Sciences
PSMB4/ β 7, mcRb	1:1000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Abcam

<i>PSMB8/LMP7 K63</i> , pcRb	1:5000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	AG Kloetzel
<i>PSMB6/β1 K43/7</i> , pcRb	1:2000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	AG Kloetzel
<i>PSMD4/Rpn10</i> , mcM	1:1000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Enzo Life Sciences
S6 Ribosomal Protein (5G10), mcRb	1:3000	5 % BSA in TBS-T	Cell Signaling
TCF11/Nrf1 (D5B10), mcRb	1:1000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Cell Signaling
TCF11/Nrf1 (H285), pcRb Lot: C2405	1:1000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Santa Cruz Biotechnology
Tubulin, mcM	1:5000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Covance Antibody Products
Ubiquitin, pcRb	1:5000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Dako
V5, mcM	1:1000	2,5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer	Invitrogen

GL: Gesamtlysat; KF: Kern-/Chromatinfraktion; M: aus Maus; mc: monoklonal; MF: Membranfraktion; pc: polyklonal; Rb: aus Kaninchen;

2.4.6. OxyBlot

Mit Hilfe des OxyBlots wurden Carbonylgruppen detektiert, welche durch Oxidation verschiedener Aminosäureseitenketten in einem Protein entstehen und damit als Marker für Proteinoxidation dienen. Zu untersuchende Proben wurden zunächst in RIPA Puffer lysiert (siehe Kapitel 2.4.1.1), dann 5-10 µg Gesamtprotein in einem Gesamtvolumen von 5 µl Lysepuffer aufgenommen und mit 5 µl 12 %iger SDS-Lösung versetzt. Anschließend wurden die Carbonylgruppen in Gegenwart von 5 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) für 30 min im Dunkeln derivatisiert. Danach wurde die Probe durch Zugabe von 25 % (v/v) Neutralisierungspuffer und 1 mM DTT neutralisiert.

Im Folgenden wurden die Proben mittels 8-10 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und dann die 2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP)-Derivate mit einem spezifischen Antikörper gegen DNP detektiert (siehe Kapitel 2.4.3 und 2.4.5).

2x DNPH Lösung: 10 mM DNPH in H₂O [Stocklösung: 100 mM DNPH in 100 % Trifluoressigsäure]

Neutralisierungslösung: 2 M Tris in 30 % Glycerin

DTT-Stocklösung: 10 mM DTT

2.4.7. Immunopräzipitation von 20S Proteasomen

In die Immunpräzipitation (IP) wurden 5×10^6 dpm eines radioaktiv-markiertem NP-40 Lysats eingesetzt (aus 2.2.7). Die Antikörper-Antigen-Bindung erfolgte über Nacht in Gegenwart von 2 μ g eines *PSMA1/α6* spezifischen Antikörpers bei 4 °C an einem Rad. Am Folgetag wurden 50 μ l abgesättigte Protein-G-Sepharose Suspension zum IP-Ansatz gegeben und eine Stunde am Rad bei 4 °C der Antikörper-Antigen-Komplex präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 560 x g und 4 °C für eine Minute pelletiert und viermal mit 900 μ l IP-Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden die ko-immunopräzipitierten Proteasomkomplexe in 2 x SDS-Probenpuffer aufgekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Kapitel 2.4.3).

2 x PBS: 274 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 16 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 3 mM KH₂PO₄;
pH 7,2

Protein-G Sepharose Suspension,

abgesättigt: 1 mg/ml BSA; 2 mg/ml Protein G Sepharose Lösung in 1 x PBS

IP-Waschpuffer: 0,5 % (v/v) NP-40 in 2 x PBS

2.5. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des beidseitigen t-Tests (Typ 3) in Microsoft Excel. Dargestellt wurden die Mittelwerte \pm der Standardabweichung (S.D.) mehrerer unabhängiger Experimente. Unterschiede galten bei einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (*/#) als signifikant oder bei $p < 0,005$ (**/###) als sehr signifikant.

Als unabhängige Experimente wurden Versuchsansätze bezeichnet, die technisch und biologisch unabhängig voneinander durchgeführt wurden (technisches und biologisches Replikat). Wurden biologische Replikate im selben technischen Versuchsansatz analysiert, wurde dies in den Bildunterschriften vermerkt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Abnahme der Proteasomaktivität resultiert in einer TCF11/Nrf1-abhängigen Induktion der proteasomalen Genexpression in verschiedenen Zelltypen

In Mammalia existiert ein autoregulatorischer Rückkopplungsmechanismus, der die Anpassung des UPS an eine Abnahme der proteasomalen Aktivität gewährleistet (siehe Kapitel 1.3.1). Dabei resultiert eine Hemmung des Proteasoms in einer Zunahme der Expression proteasomaler Untereinheiten und der Assemblierung neuer, aktiver Proteasomkomplexe (Meiners et al., 2003). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde in weiterführenden Experimenten die Regulation des UPS in Antwort auf eine verringerte Proteasomaktivität in Abhängigkeit von TCF11/Nrf1 untersucht.

3.1.1. Die Aktivierung von TCF11/Nrf1 durch Proteasominhibition stellt einen genereller Regulationsmechanismus dar

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe identifizierten den Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 als Hauptregulator der Genexpression proteasomaler Untereinheiten in Antwort auf Proteasominhibition (Steffen et al., 2010). Diese Untersuchungen wurden hauptsächlich in der Endothelzelllinie EA.hy926 durchgeführt. Um zu klären, ob es sich bei der Proteasominhibitor-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors um einen generellen, zellulären Schutzmechanismus handelt, wurden verschiedenen Zelltypen diesbezüglich untersucht. Vor allem neuronale Zellen waren von großem Interesse, da das UPS eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Funktion von Neuronen spielt (Yi and Ehlers, 2007). Außerdem ergab die Recherche in biologischen Datenbanken, dass bei der Betrachtung des gesamten Gehirns oder spezieller Regionen, wie dem Präfrontalem Cortex, eine vergleichsweise hohe TCF11/Nrf1 Expression vorliegt (Anhang Abb. 6.1).

Um zu untersuchen, ob TCF11/Nrf1 in den verwendeten Zelllinien aktiviert wird, wurden diese zunächst für 16-18 h mit 10 nM des hochspezifischen Proteasominhibitors Epoxomicin behandelt (siehe Kapitel 1.1.5; (Kisselev and Goldberg, 2001). Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und mittels Immunoblot analysiert. Die Inkubation mit Epoxomicin führte zu einer Zunahme der TCF11/Nrf1 Proteinmenge in allen getesteten Zellen (Abb. 3.1 A). Des Weiteren ist neben einer langsamer migrierenden Form spätestens nach Behandlung mit dem Proteasominhibitor eine schneller migrierende Form von TCF11/Nrf1 zu erkennen. Dieser Unterschied in dem Molekulargewicht beruht darauf, das TCF11/Nrf1 im Laufe der Inhibitor-induzierten Aktivierungskaskade deglykosyliert und proteolytisch prozessiert wird (siehe Kapitel 1.3.1.1). Die Zelllinien unterscheiden sich in der Intensität der Zunahme von TCF11/Nrf1 und dem Verhältnis der glykosylierten, unprozessierten Form und der deglykosylierten, prozessierten Form. Die in früheren Untersuchungen verwendete

Endothelzelllinie EA.hy926 zeigte einen starken Proteasominhibitor-induzierten Anstieg der TCF11/Nrf1 Proteinmenge. Die Zelllinien neuronalen oder glialen Ursprungs, namentlich SH-SY5Y und SK-N-BE2 oder LN-18, wiesen neben dem hohen induzierbaren Proteinanstieg (Epoxomicin, E) eine vergleichsweise hohe basale (Kontrollzellen: DMSO, D) Proteinmenge auf. Hingegen zeigten die Zelllinien Cos-7, Hek-293 und CaCo-2 eine vergleichsweise geringe TCF11/Nrf1 Proteinmenge nach Inhibition des Proteasoms.

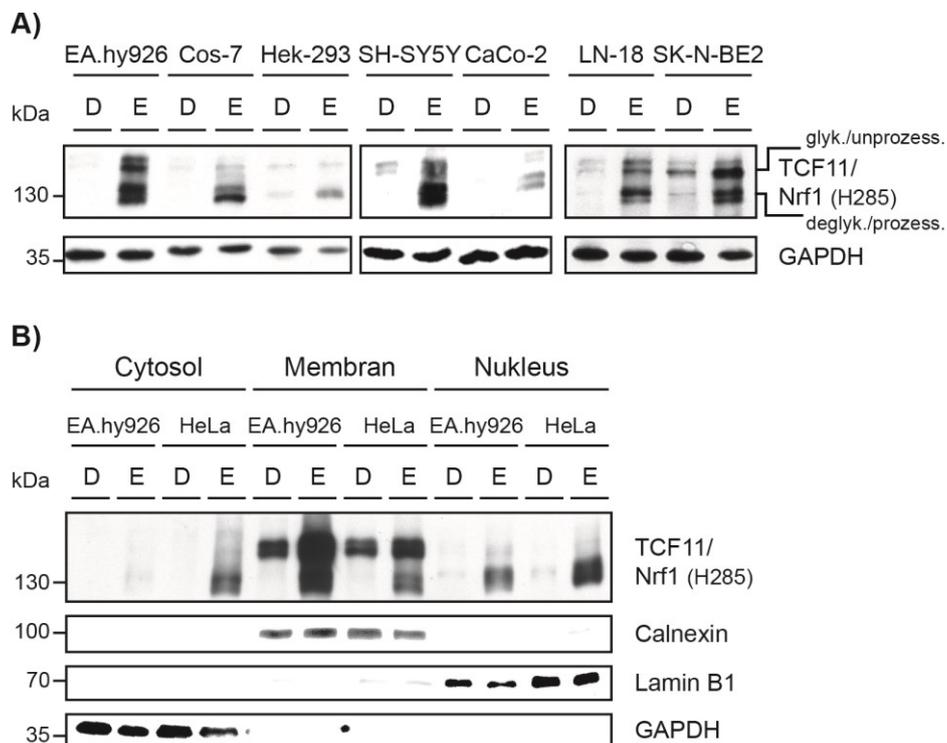


Abb. 3.1: Epoxomicin induziert die Stabilisierung und nukleäre Akkumulation von TCF11/Nrf1. Die Expression und Lokalisation von TCF11/Nrf1 nach Proteasominhibition wurde in verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierzu wurden die Zellen für 16-18 h mit 10 nM Epoxomicin (E) oder 0,1 % DMSO (D) behandelt und entweder die Gesamtlysate (**A**) oder die subzellulären Fraktionen (**B**) mittels Immunoblot gegen TCF11/Nrf1 analysiert. Die glykosylierte, unprozessierte (glyk./unprozess.) sowie die deglykosylierte, prozessierte (deglyk./prozess.) Form von TCF11/Nrf1 wurden markiert. Spezifische Antikörper gegen GAPDH bzw. gegen den ER-Marker Calnexin oder den nukleären Marker Lamin B1 dienten als Ladekontrollen.

Neben der Deglykosylierung und proteolytischen Prozessierung stellt der nukleäre Transfer einen wichtigen Teil der Aktivierungskaskade des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 dar (siehe Kapitel 1.3.1.1). Ob die Behandlung mit Epoxomicin auch in einer erhöhten nukleären Lokalisation von TCF11/Nrf1 resultiert, wurde in EA.hy926 und HeLa Zellen untersucht. Hierzu wurden die cytosolischen, membranständigen und nukleären Proteine isoliert und mittels Immunoblot analysiert (Abb. 3.1 B). Die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung demonstrierten, dass TCF11/Nrf1 ein Membranprotein ist und durch Hemmung des proteasomalen Abbaus (Epoxomicin, E) in der Membran akkumuliert. Ferner wurde eine Anreicherung des Transkriptionsfaktors im Nukleus Epoxomicin-behandelter Zellen beobachtet.

Aus vorangegangenen Studien ging hervor, dass membranständiges TCF11/Nrf1 ein Substrat des ERAD-vermittelten und die nukleäre Form von TCF11/Nrf1 ein Substrat des SCF-vermittelten Proteinabbaus darstellt (siehe Kapitel 1.3.1.1 (Biswas et al., 2011; Steffen et al., 2010; Tsuchiya et al., 2011)). Um zu bestätigen, dass die Anreicherung des Faktors auf der Hemmung dessen Abbaus beruht, wurde zunächst die Abbaurrate des Transkriptionsfaktors durch ein Cycloheximid-Abbau-Experiment untersucht. Hierzu wurden SH-SY5Y Zellen mit Epoxomicin oder DMSO behandelt und anschließend die Translation für 0 bis 30 min durch Zugabe von Cycloheximid inhibiert (Abb. 3.2 A). Die densitometrische Quantifizierung der Proteinmenge beider TCF11/Nrf1 Formen ergab, dass der Transkriptionsfaktor in SH-SY5Y Zellen eine Halbwertszeit von ca. 20 min hat. Diese Beobachtung deckt sich in etwa mit den Ergebnissen aus EA.hy926 Zellen, in denen eine Halbwertszeit von 12 min beobachtet wurde (Steffen et al., 2010). Außerdem wird deutlich, dass der Abbau des membranständigen, unprozessierten sowie des prozessierten Transkriptionsfaktors durch Epoxomicin gehemmt wird. Hierbei ist eine Abnahme der langsamer migrierenden Form in den Inhibitor behandelten Zellen zu beobachten. Diese beruht auf der Epoxomicin-induzierten limitierten Proteolyse von TCF11/Nrf1 zu der prozessierten Form.

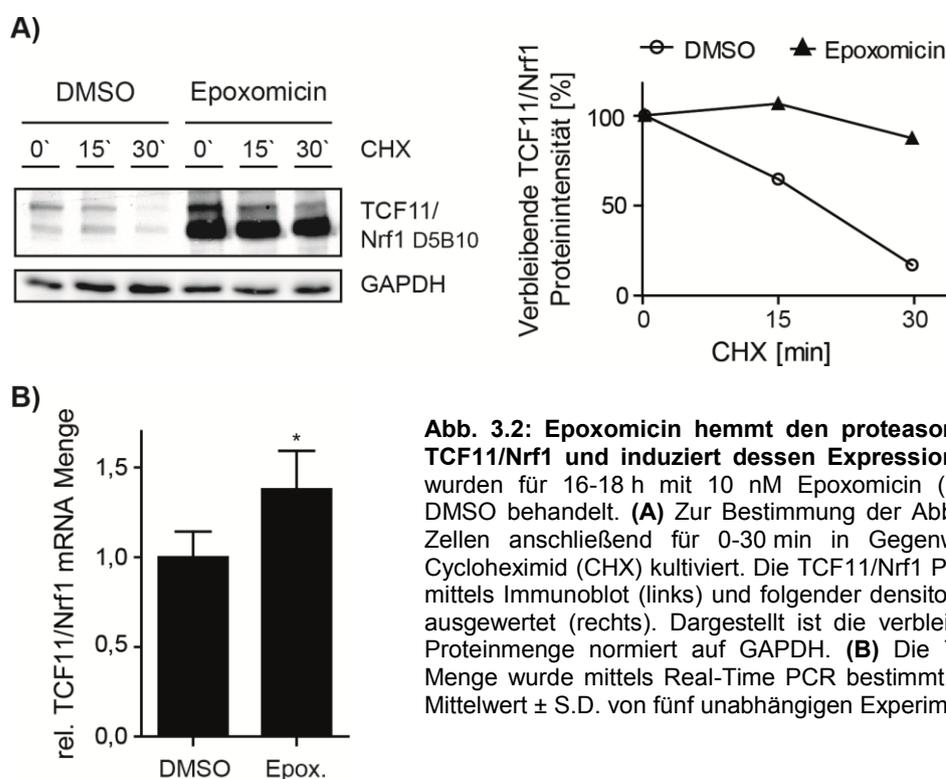


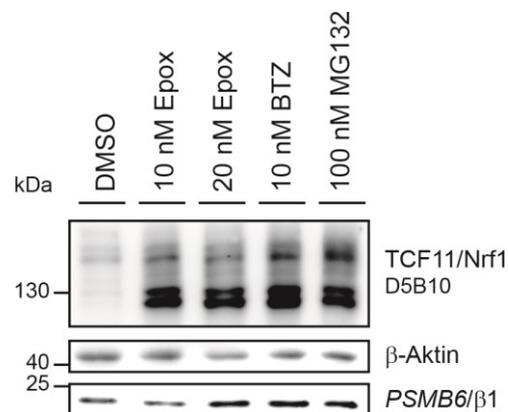
Abb. 3.2: Epoxomicin hemmt den proteasomalen Abbau von TCF11/Nrf1 und induziert dessen Expression. SH-SY5Y Zellen wurden für 16-18 h mit 10 nM Epoxomicin (Epox.) oder 0,1 % DMSO behandelt. **(A)** Zur Bestimmung der Abbaurrate wurden die Zellen anschließend für 0-30 min in Gegenwart von 50 µg/ml Cycloheximid (CHX) kultiviert. Die TCF11/Nrf1 Proteinmenge wurde mittels Immunoblot (links) und folgender densitometrischer Analyse ausgewertet (rechts). Dargestellt ist die verbleibende TCF11/Nrf1 Proteinmenge normiert auf GAPDH. **(B)** Die TCF11/Nrf1 mRNA Menge wurde mittels Real-Time PCR bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert ± S.D. von fünf unabhängigen Experimenten. (*p≤0,05)

Ein Anstieg der Proteinmenge kann durch eine verstärkte Expression erfolgen oder seine Ursache in einem reduzierten Abbau haben. Um diese Möglichkeiten genauer zu untersuchen, wurde die TCF11/Nrf1 mRNA Menge mittels Real-Time PCR analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine Epoxomicin-induzierte Zunahme der mRNA um etwa 40 % (Abb. 3.2

B). Allerdings kann diese allein nicht die starke Zunahme der Proteinmenge erklären. Zusammengenommen bestätigen die Ergebnisse, dass die TCF11/Nrf1 Proteinzunahme hauptsächlich auf der Inhibition dessen proteasomalen Abbaus beruht.

Es existiert eine Vielzahl an Proteasominhibitoren, die sich in ihrer Struktur und somit in ihrem Wirkmechanismus unterscheiden (siehe Kapitel 1.1.5). Um zu untersuchen, ob die Struktur des Proteasominhibitors die TCF11/Nrf1 Aktivierung beeinflusst, wurden exemplarisch die drei Inhibitoren Epoxomicin, MG132 und Bortezomib diesbezüglich untersucht. Die Exposition der Zellen mit allen drei Proteasominhibitoren resultierte in der Stabilisierung von glykosylierten, unprozessierten sowie deglykosylierten, prozessierten TCF11/Nrf1 in SH-SY5Y Zellen (Abb. 3.3). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass unter Verwendung verschiedener Proteasominhibitoren TCF11/Nrf1 stabilisiert und aktiviert wird.

Abb. 3.3: Proteasominhibition führt zur Stabilisierung von TCF11/Nrf1 und zur Zunahme der *PSMB6/β1* Untereinheit. SH-SY5Y Zellen wurden für 16 h mit 10 bzw. 20 nM Epoxomicin (Epox), 10 nM Bortezomib (BTZ), 100 nM MG132 oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden anschließend mittels Immunoblot gegen TCF11/Nrf1 und *PSMB6/β1* analysiert. Ein spezifischer Antikörper gegen β -Aktin diente als Ladekontrolle.



Des Weiteren wurde überprüft, ob die Proteasominhibition auch in einer Zunahme der Genexpression des Proteasoms resultiert. Hierzu wurde einerseits die Expression proteasomaler Untereinheiten und andererseits exemplarisch die *PSMB6/β1* Proteinmenge analysiert. In SH-SY5Y, EA.hy926 und HeLa Zellen wurde eine Epoxomicin-induzierte Zunahme der *PSMB6/β1* mRNA beobachtet, wobei die Induktion in den EA.hy926 Zellen mit einem Faktor von etwa 2,5 am stärksten war (Abb. 3.4 A). Im Vergleich zeigten SH-SY5Y und HeLa Zellen nur einen etwa 1,5 fachen Anstieg. Zusätzlich wurde in Bortezomib-behandelten SH-SY5Y Zellen die mRNA Menge der 20S Untereinheiten *PSMB6/β1*, *PSMB4/β7*, *PSMA3/α7* und der 19S Untereinheit *PSMC4/Rpt3* untersucht (Abb. 3.4 B). Die Proteasominhibition durch Bortezomib resultiert ebenso in einer Zunahme der mRNA Menge um das etwa 2 bis 2,5 fache im Fall der 20S Untereinheiten und um das etwa 3,5 fache für die 19S Untereinheit.

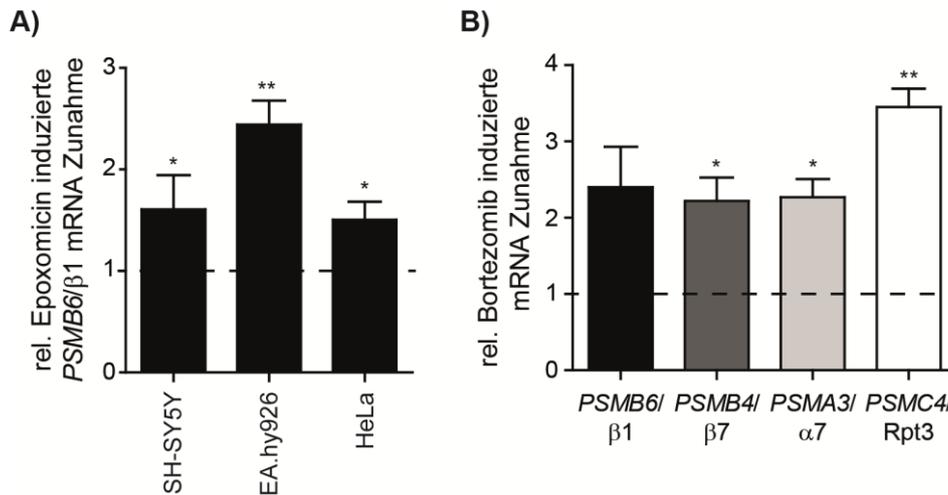


Abb. 3.4: Proteasominhibition induziert die proteasomale Genexpression. (A) SH-SY5Y, EA.hy926 oder HeLa Zellen wurden für 16-18 h mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO behandelt. Im Anschluss wurde die *PSMB6/β1* mRNA Menge mittels Real-Time PCR bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf HPRT1 normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen *PSMB6/β1* mRNA Menge Epoxomicin-behandelter Zellen im Verhältnis zu DMSO-behandelten Zellen \pm S.D. mehrerer unabhängiger Experimente ($n_{\text{SH-SY5Y}}=8$, $n_{\text{EA.hy926}}=4$, $n_{\text{HeLa}}=3$). (B) SH-SY5Y Zellen wurden für 16 h mit 10 nM Bortezomib behandelt. Im Anschluss wurde die Expression von *PSMB6/β1*, *PSMB4/β7*, *PSMA3/α7* und *PSMC4/Rpt3* mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen mRNA Mengen Bortezomib-behandelter Zellen im Verhältnis zu unbehandelten Zellen \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$)

Zusätzlich zu der 16-18 stündigen Bortezomibbehandlung wurde die Expression der proteasomalen Untereinheiten nach vierstündiger Proteasominhibition mit einer hohen BTZ Konzentration in SH-SY5Y Zellen mittels Real-Time PCR quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass auch eine kurze, akute Hemmung des Proteasoms in einem Anstieg der mRNA proteasomaler Untereinheiten um das etwa 1,5 fache resultiert (Abb. 3.5).

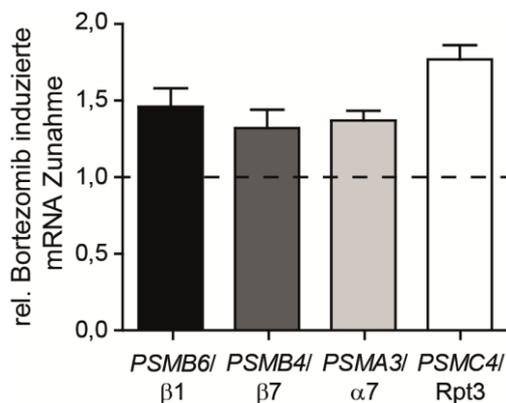


Abb. 3.5: Induktion der proteasomalen Genexpression durch eine akute Bortezomibbehandlung. SH-SY5Y Zellen wurden für 4 h mit 5 μM Bortezomib behandelt. Im Anschluss wurde die Expression von *PSMB6/β1*, *PSMB4/β7*, *PSMA3/α7* und *PSMC4/Rpt3* mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen mRNA Mengen Bortezomib-behandelter Zellen im Verhältnis zu unbehandelten Zellen \pm S.D. von zwei unabhängigen Experimenten.

Um zu klären, ob die Zunahme der mRNA auch auf Proteinebene in einem Anstieg resultiert, wurden SH-SY5Y Zellen mit Epoxomicin, Bortezomib sowie MG132 behandelt und mittels Immunoblot gegen *PSMB6/β1* untersucht (Abb. 3.3). Die Proteasominhibition führte analog zu der mRNA zu einer Proteinzunahme der proteasomalen Untereinheit. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Hemmung des Proteasoms durch verschiedene Inhibitoren in unterschiedlichen Zelllinien zu einer Stabilisierung sowie

Aktivierung des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 und folglich zu einer Induktion der proteasomalen Genexpression führt.

3.1.2. Die Aktivierung von TCF11/Nrf1 durch Proteasominhibition in SH-SY5Y Zellen

Eine Anreicherung ubiquitinerter und oxidativ beschädigter Proteine ist charakteristisch für eine Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer. Eine Störung des UPS steht somit im engen Zusammenhang mit der Ausbildung dieser Erkrankungen (Goldberg, 2003; Kriegenburg et al., 2011). Auch TCF11/Nrf1 spielt als Hauptregulator des Proteasoms eine bedeutende Rolle bei der Vorbeugung neurodegenerativer Veränderungen. So zeigten Studien, dass ein Mangel an TCF11/Nrf1 im Gehirn zu einer Akkumulation ubiquitinerter Proteine und zu neuronalen Zelltod führt (Kobayashi et al., 2011; Lee et al., 2011). Die Neuroblastoma Zelllinie, SH-SY5Y, stellt aufgrund ihres dopaminergen Charakters ein attraktives *in vitro* Model für die Untersuchung der neuronalen Funktion und Neurodegeneration dar. Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass sich das Verhalten von TCF11/Nrf1 in den SH-SY5Y Zellen dem in EA.hy926 Zellen stark ähnelt (siehe Kapitel 3.1.1) und deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor in diesen Zellen auch die Hochregulation des Proteasoms in Antwort auf die Proteasominhibition vermittelt. Zudem ergab die Charakterisierung verschiedener Zelllinien bezüglich der TCF11/Nrf1 Proteinmenge, dass Zellen neuronalen und glialen Ursprungs eine vergleichsweise hohe Menge an dem Transkriptionsfaktor aufweisen (Abb. 3.1 A). Daher wurde die SH-SY5Y Zelllinie im Folgenden genauer hinsichtlich der TCF11/Nrf1-abhängigen Genexpression proteasomaler Untereinheiten charakterisiert.

Zunächst wurden mit Retinsäure differenzierte und undifferenzierte SH-SY5Y Zellen mit Epoxomicin behandelt und die TCF11/Nrf1 Menge mittels Immunoblot analysiert (Abb. 3.6 A). Die basale sowie die durch Epoxomicin-induzierte TCF11/Nrf1 Proteinmenge war in differenzierten Zellen geringer als in undifferenzierten. Des Weiteren wurde beobachtet, dass der Differenzierungsprozess in einer Erhöhung der Protein- sowie der mRNA Menge der Immuno-Untereinheit *PSMB8/LMP7* resultierte (Abb. 3.6 A, B). Es stellte sich nun die Frage, ob die *PSMB8/LMP7* Untereinheit auch in die Proteasomkomplexe eingebaut wird und dadurch die Proteasomaktivität beeinflusst. Um dies zu untersuchen wurden Proteinlysate aus undifferenzierten sowie differenzierten Zellen unter nativen Bedingungen aufgetrennt, die proteolytische Aktivität im Gel („Overlay“) bestimmt und der Einbau von *PSMB8/LMP7* mittels Immunoblot analysiert (Abb. 3.6 C). In differenzierten Zellen konnte eine höhere proteasomale Aktivität im Vergleich zu undifferenzierten Zellen beobachtet werden. Hierbei zeigten die PA28-gebundenen sowie 19S-gebundenen Komplexe eine Zunahme der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität. Unter Verwendung eines Antikörpers gegen *PSMA1/α6* wurden die unterschiedlichen Proteasomkomplexe sichtbar gemacht. Dabei wurde deutlich,

dass die Differenzierung keinen Einfluss auf die Menge der Proteasomkomplexe hat. Jedoch zeigte der Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper gegen *PSMB8/LMP7* eine Zunahme der Immuno-Untereinheit-enthaltenen Proteasomkomplexe. Hierbei wurde *PSMB8/LMP7* in die niedermolekularen 20S und (PA28-)20S-PA28 und ebenfalls in die 19S-gebundenen, hochmolekularen 30S und 26S/Hybrid Komplexe eingebaut.

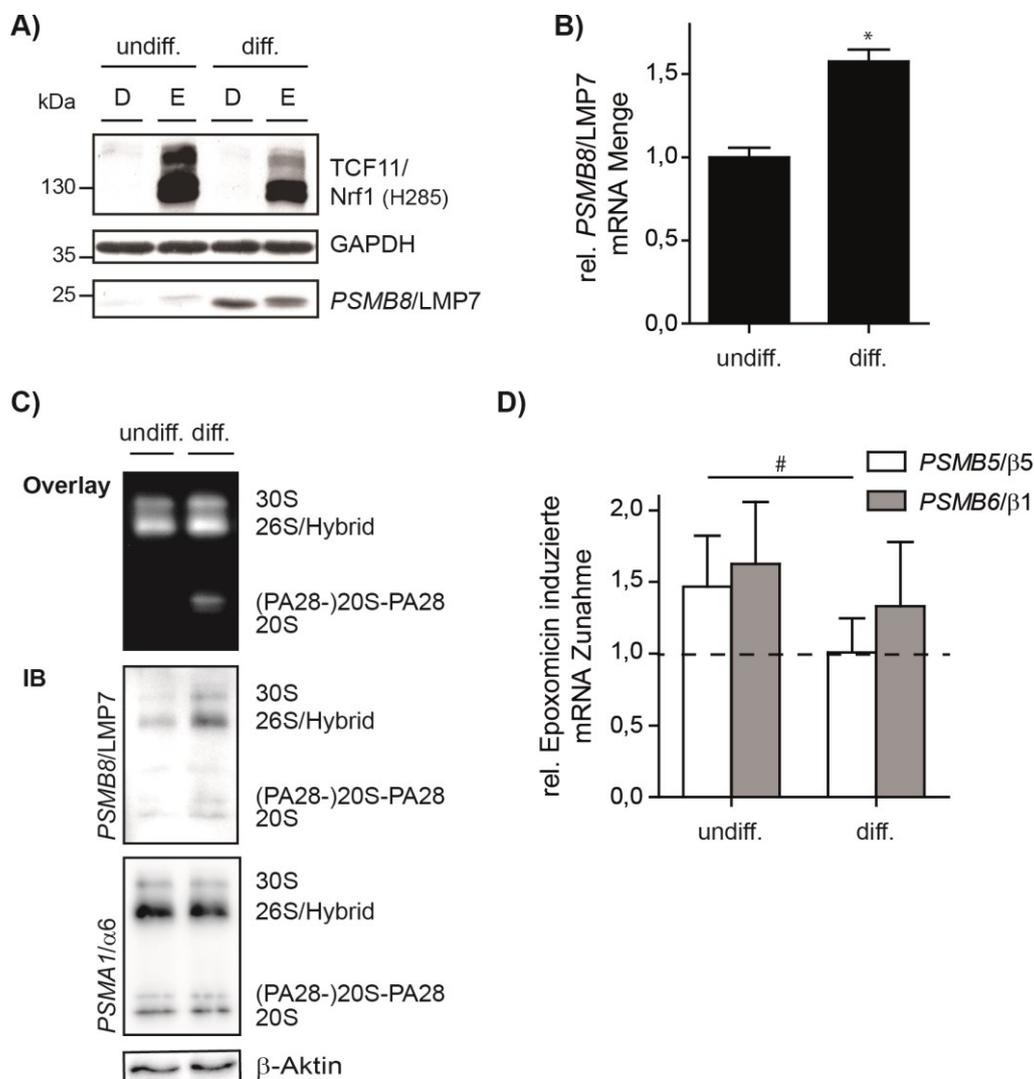


Abb. 3.6: Vergleich der undifferenzierten (undiff.) und differenzierten (diff.) SH-SY5Y Zellen bezüglich des Proteasomsystems. (A) Undifferenzierte oder differenzierte SH-SY5Y Zellen wurden für 16 h mit 10 nM Epoxomicin (E) bzw. 0,1 % DMSO (D) behandelt. Anschließend wurde die TCF11/Nrf1 und *PSMB8/LMP7* Proteinmenge mittels Immunoblot untersucht. Ein spezifischer Antikörper gegen GAPDH diente als Ladekontrolle. (Immunoblot wurde von Daniela Ludwig durchgeführt) (B) Die Expression von *PSMB8/LMP7* wurde in undifferenzierten sowie differenzierten SH-SY5Y Zellen mittels Real-Time PCR analysiert und auf die HPRT1 Expression normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. relativ zu den undifferenzierten Zellen von drei unabhängigen Experimenten. (C) Undifferenzierte oder differenzierte SH-SY5Y Zellen wurden unter nativen Bedingungen aufgeschlossen und im NATIV Gel aufgetrennt. Die folgende Aktivitätsmessung im Gel („Overlay“) wurde unter Verwendung des fluorogenen Peptids Suc-LLVY-AMC durchgeführt. Anschließend wurden die Proteasomkomplexe mittels Immunoblot mit einem Antikörper gegen *PSMB8/LMP7* und *PSMA1/α6* analysiert. (D) Undifferenzierte oder differenzierte SH-SY5Y Zellen wurden für 16 h mit 10 nM Epoxomicin bzw. 0,1 % DMSO behandelt. Im Anschluss wurde die Expression von *PSMB5/β5* und *PSMB6/β1* mittels Real-Time PCR analysiert und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. relativ zur DMSO Kontrolle von vier beziehungsweise drei unabhängigen Experimenten. (*/#: $p \leq 0,05$)

Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass der Einbau der Immuno-Untereinheit die Zunahme der proteasomalen Aktivität fördert.

Ob diese differenzierungsbedingte Veränderung der Proteasomkomposition einen Einfluss auf die Epoxomicin-induzierte Expression proteasomaler Untereinheiten hat, wurde mittels Real-Time PCR untersucht (Abb. 3.6 D). Die verminderte Epoxomicin-induzierte Zunahme der *PSMB5/β5* und *PSMB6/β1* mRNA, deutet auf eine verringerte Induktion der Expression dieser Standard Untereinheiten in differenzierten SH-SY5Y Zellen hin. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Untereinheiten durch die Immuno-Untereinheiten ersetzt werden können. So nimmt das hochregulierte *PSMB8/LMP7* die Position der *PSMB5/β5* Untereinheit während der *de novo* Synthese im Proteasom ein (siehe Kapitel 1.1.2). Da in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, dass TCF11/Nrf1 hauptsächlich die Expression des Standard 26S Proteasoms und nicht die des Immunoproteasoms sowie des PA28 Aktivators nach Proteasominhibition reguliert (Steffen et al., 2010), wurden in den folgenden Untersuchungen undifferenzierte SH-SY5Y Zellen verwendet.

Wie bereits gezeigt, resultiert eine Behandlung von SH-SY5Y Zellen mit Proteasominhibitoren in einer Zunahme der mRNA Menge proteasomaler Untereinheiten (Abb. 3.4 und Abb. 3.6 D). Um zu überprüfen, ob der mRNA Anstieg auf einer Expressionszunahme beruht, wurden CAT-Reporterassays durchgeführt. Hierbei wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem das Reportergen unter Kontrolle des -1500 bp langen Promotors der *PSMB6/β1* Untereinheit steht (Abb. 3.7 A; (Steffen et al., 2010)). Die SH-SY5Y Zellen wurden mit dem pCAT1500 Reporterkonstrukt transfiziert und anschließend mit Epoxomicin oder DMSO für 16-18 h behandelt. Der Leervektor pCATbasic wurde als Negativkontrolle verwendet und wies wie erwartet keine CAT Expression auf (Abb. 3.7 B). Das pCAT1500 Konstrukt zeigte unter Kontrollbedingungen (DMSO) bereits eine basale Expressionsaktivität. Die Proteasominhibition (Epoxomicin, Epox.) resultierte in einer zusätzlichen, etwa 2 fachen Zunahme der CAT Konzentration und somit der *PSMB6/β1* Promotor vermittelten Expression (Abb. 3.7 B).

Ob die erhöhte Genexpression generell in einer Zunahme von Proteasomkomplexen resultiert, wurde im nächsten Schritt untersucht. Hierzu wurden zunächst die nativen Proteinlysate Epoxomicin-behandelter SH-SY5Y Zellen oder von Kontrollzellen unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (Abb. 3.7 C). Eine anschließende Messung der proteolytischen Aktivität im Gel zeigte eine erfolgreiche Hemmung des Proteasoms durch Epoxomicin. Ein anschließender Immunoblot gegen die proteasomale Untereinheit *PSMA1/α6* demonstrierte eine Epoxomicin-induzierte Zunahme der Proteasomkomplexe. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die Inhibition des Proteasoms die

Genexpression proteasomaler Untereinheiten induziert und folglich in einem Anstieg der Proteasomkomplexe resultiert.

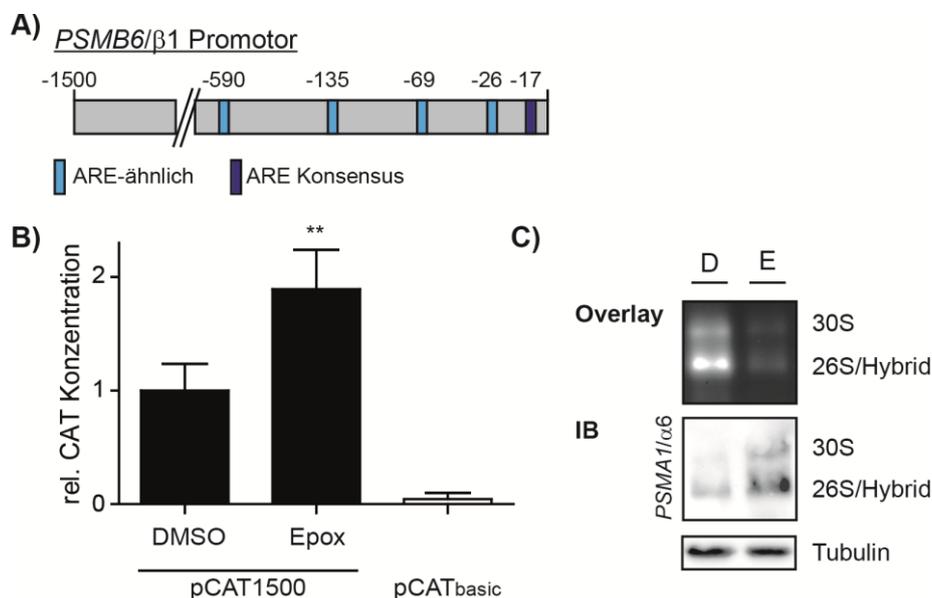


Abb. 3.7: Epoxomicin induziert die Proteasomexpression in SH-SY5Y Zellen. (A) Schematische Darstellung der 1500 bp des *PSMB6/β1* Promotors stromaufwärts ausgehend vom theoretischen Transkriptionsstart, der im CAT-Reporterassay verwendet wurde. Markiert sind die ARE Konsensussequenz nach (Jaiswal, 2004) an Position -17 und die ARE-ähnlichen Sequenzen an den Positionen -26, -69, -135 und -590 [modifiziert nach (Steffen et al., 2010)]. (B) SH-SY5Y Zellen wurden mit einem *PSMB6/β1* Promotor-gesteuerten Reportergenkonstrukt pCAT1500 oder zur Kontrolle mit pCATbasic und pcDNA3.1-lacZ kotransfiziert. Nach 6 h erfolgte die Behandlung mit 10 nM Epoxomicin (Epox) oder 0,1 % DMSO für 24 h. Die CAT Konzentration der Zelllysate wurde mittels ELISA bestimmt und auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert. Dargestellt ist die gemittelte CAT Konzentration relativ zu der DMSO Kontrolle \pm S.D. von sechs biologischen Replikaten aus drei unabhängigen Experimenten. (C) SH-SY5Y Zellen wurden mit 10 nM Epoxomicin (E) oder 0,1 % DMSO (D) für 18 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen unter nativen Bedingungen aufgeschlossen und im NATIV Gel aufgetrennt. Die folgende Aktivitätsmessung im Gel („Overlay“) wurde unter Verwendung des fluorogenen Peptids Suc-LLVY-AMC durchgeführt. Anschließend wurden die Komplexe mittels Immunoblot (IB) mit einem Antikörper gegen *PSMA1/α6* analysiert. (** $p \leq 0,005$)

Um zu belegen, dass die Proteasominhibitor-induzierte Zunahme der Proteasomsynthese abhängig von TCF11/Nrf1 ist, wurde die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors in SH-SY5Y Zellen mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft (Abb. 3.8 A). TCF11/Nrf1 ist ein ER-ständiges Membranprotein (Steffen et al., 2010; Wang and Chan, 2006; Zhang et al., 2006), und ko-lokalisierte ebenso in vorliegenden Ergebnissen unter Kontrollbedingungen (DMSO) vorwiegend mit dem ER-Markerprotein Calnexin. In Antwort auf Inhibition des Proteasoms mit Epoxomicin akkumuliert der Transkriptionsfaktor im Nukleus.

Ob TCF11/Nrf1 hier an die ARE Sequenzen in den Promotoren proteasomaler Untereinheiten bindet, wurde durch ChIP Experimente untersucht. Hierbei wurde exemplarisch die Bindung an die ARE-17 Sequenz des *PSMB6/β1* Promotors analysiert, da in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt wurde, dass dieser die Proteasominhibitor-

induzierte *PSMB6/β1* Expression am stärksten beeinflusst (Steffen et al., 2010). Im Vergleich zu den Präzipitaten eines unspezifischen IgG Antikörpers enthielten die TCF11/Nrf1-Präzipitate Chromatin-DNA, welche die ARE-17 Sequenz des *PSMB6/β1* Promotors beinhaltet (Abb. 3.8 B). Der Nachweis eines Abschnitts aus dem Tubulin Promotor diente als Kontrolle für die Spezifität der Immunpräzipitation (Sun et al., 2007) und wurde nur im Input, aber nicht in den Präzipitaten nachgewiesen. In Epoxomicin-behandelten Zellen war die Anreicherung der ARE-17 Sequenz im Vergleich zu den Kontrollzellen (DMSO) verstärkt. Dies bedeutet, dass in Gegenwart von Epoxomicin mehr TCF11/Nrf1 an das regulierende Promotorelement gebunden hat.

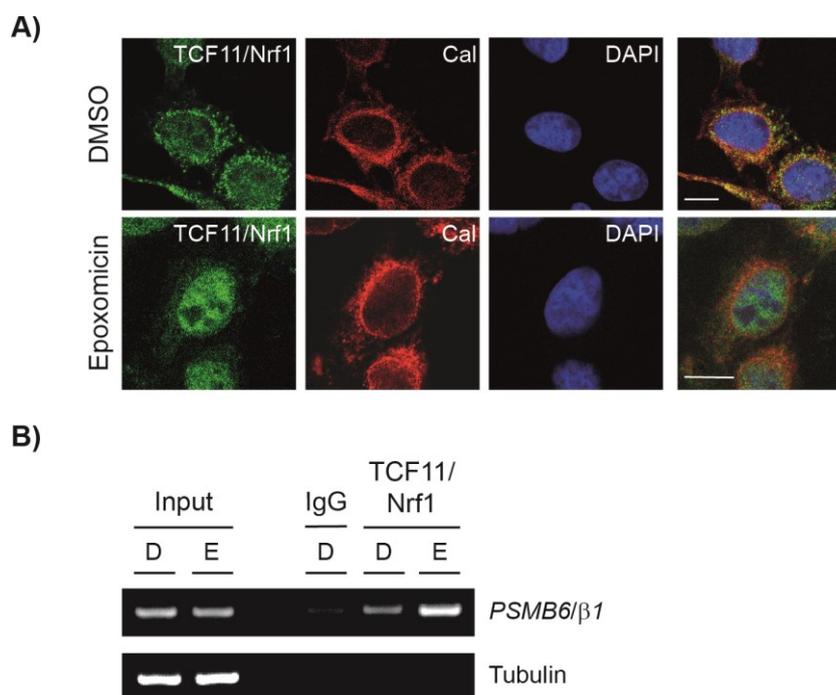


Abb. 3.8: Epoxomicin induziert die nukleäre Akkumulation von TCF11/Nrf1 und dessen Interaktion mit dem *PSMB6/β1* Promotor. (A) SH-SY5Y Zellen wurden mit 10 nM Epoxomicin oder 0,1 % DMSO für 16 h behandelt und mit PFA fixiert. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie wurde die zelluläre Lokalisation von TCF11/Nrf1 unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers analysiert. Ein spezifischer Antikörper gegen Calnexin wurde als ER-Membranmarker verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 10 μm. (B) SH-SY5Y Zellen wurden mit 10 nM Epoxomicin (E) oder 0,1 % DMSO (D) für 16 h behandelt. Danach wurden die Proteine mit der DNA fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen TCF11/Nrf1 oder einem unspezifischen IgG Kontroll-Antikörper präzipitiert. Nachdem die DNA von den Proteinen abgetrennt wurde, erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern gegen die ARE-17 Sequenz des *PSMB6/β1* Promotors. Als Negativkontrolle dienten Primer gegen eine Sequenz des β-Tubulin Promotors.

Die Beobachtungen, dass Epoxomicin in SH-SY5Y Zellen die Expression des Proteasoms induziert (Abb. 3.7) und eine nukleäre Anreicherung des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1, sowie dessen verstärkte Bindung an den *PSMB6/β1* Promotor fördert (Abb. 3.8), deuten auf eine Beteiligung von TCF11/Nrf1 an der Expressionsregulation proteasomaler Untereinheiten hin. Um diese Annahme weiter zu überprüfen, wurden siRNA Experimente durchgeführt.

Hierzu wurden SH-SY5Y Zellen mit TCF11/Nrf1 siRNA beziehungsweise einer Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend mit Epoxomicin oder DMSO behandelt. Die

Genexpression der *PSMA2/α2*, *PSMB6/β1* und *PSMC4/Rpt3* Untereinheiten und die Effizienz der siRNA Transfektion wurden mittels Real-Time PCR untersucht (Abb. 3.9). In den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen induzierte Epoxomicin die Expression der 20S Untereinheiten um ungefähr das 2 Fache und der 19S Untereinheit um ungefähr das 3 Fache. Im Gegensatz dazu, führte eine Depletion von TCF11/Nrf1 zu einer signifikanten Abnahme der Epoxomicin-abhängigen Induktion der Proteasomexpression. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Epoxomicin-induzierte Genexpression proteasomaler Untereinheiten abhängig von dem Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 ist.

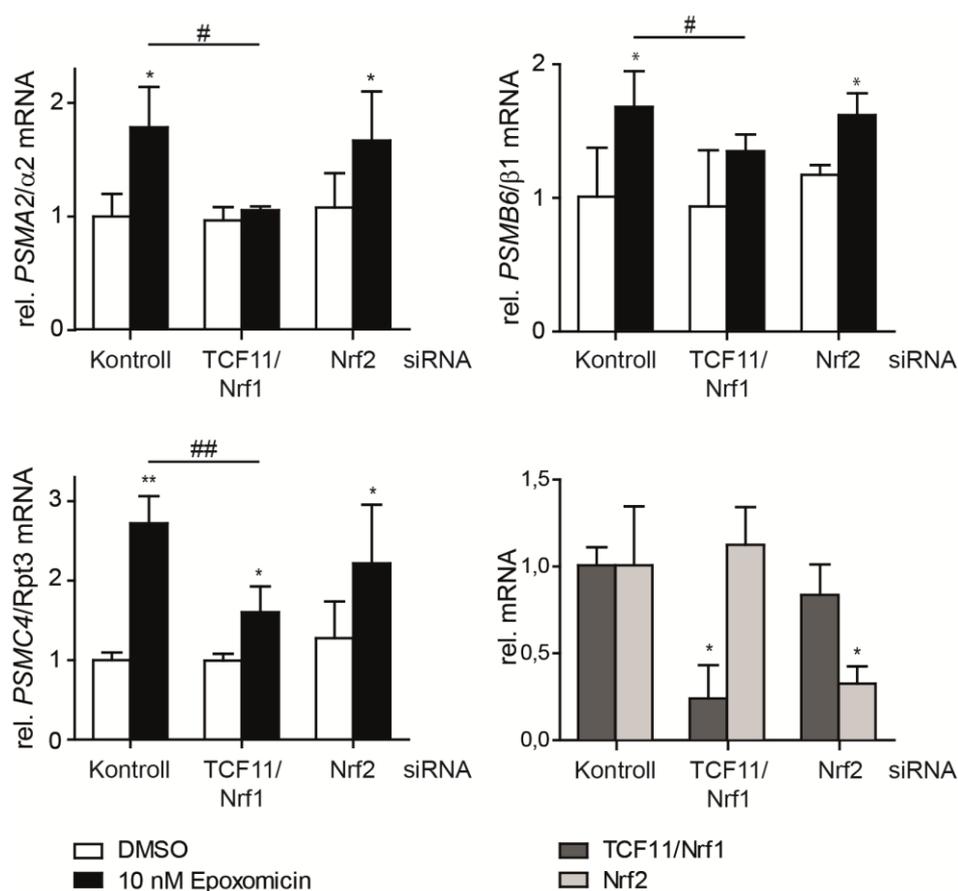


Abb. 3.9: Die Epoxomicin-induzierte Zunahme der Proteasomexpression ist abhängig von TCF11/Nrf1. SH-SY5Y Zellen wurden mit siRNA gegen TCF11/Nrf1 oder Nrf2 bzw. der Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 6 h wurden die Zellen für 16-18 h mit 10 nM Epoxomicin bzw. 0,1 % DMSO behandelt. Die Bestimmung der *PSMB6/β1*, *PSMA2/α2*, *PSMC4/Rpt3*, TCF11/Nrf1 sowie Nrf2 mRNA Menge erfolgte mittels Real-Time PCR und wurde auf die HPR1 Menge normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. mehrerer unabhängiger Experimente relativ zu der DMSO Kontrolle ($n_{PSMB6/β1}=5$; $n_{PSMA2/α2}=4$; $n_{PSMC4/Rpt3}=4$; $n_{TCF11/Nrf1\&Nrf2}=3$). (#/*: $p < 0,05$; #/**: $p < 0,005$)

Nrf2 ist ein bedeutender Regulator ARE-gesteuerter detoxifizierender sowie antioxidativer Gene und induzierte ebenfalls in Antwort auf Elektrophile oder Oxidantien die Proteasomexpression (Kwak et al., 2002; Kwak et al., 2003a). Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Beteiligung von Nrf2 an der Epoxomicin-induzierten Genexpression proteasomaler Untereinheiten überprüft. Hierzu wurden SH-SY5Y Zellen mit Nrf2 siRNA

transfiziert, mit Epoxomicin oder DMSO behandelt und die Proteasomexpression mittels Real-Time PCR untersucht (Abb. 3.9). Im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, zeigte die Nrf2 Depletion keinen Effekt auf die Induktion der Proteasomexpression. Wie aufgrund früherer Untersuchungen in EA.hy925 Zellen zu erwarten war (Steffen et al., 2010), demonstrieren vorliegende Ergebnisse, dass auch in SH-SY5Y Zellen der Transkriptionsfaktor Nrf2 keinen Einfluss auf die Epoxomicin-induzierte Genexpression proteasomaler Untereinheiten hat.

3.1.3. Die Depletion der 26S/30S Komplexe stabilisiert TCF11/Nrf1 und induziert die Expression proteasomaler Untereinheiten

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit Proteasominhibitoren in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 und folglich einer erhöhten Proteasomexpression resultiert (Abb. 3.1 bis Abb. 3.9). Um zu bekräftigen, dass die Hemmung der proteasomalen Abbaukapazität verantwortlich für die TCF11/Nrf1 Aktivierung ist, wurden die proteasomalen Untereinheiten *PSMD4/Rpn10* und *PSMB4/β7* unter Verwendung einer spezifischen siRNA depletiert und der Effekt auf den Ubiquitin-abhängigen Abbau und den Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 mittels Immunoblot analysiert.

Ein Mangel an der 19S Untereinheit *PSMD4/Rpn10* sowie der 20S Untereinheit *PSMB4/β7* resultiert in einer Akkumulation polyubiquitiniertes Proteine (Abb. 3.10 A). Da die *PSMD4/Rpn10* Untereinheit der Erkennung ubiquitiniertes Substrate dient (Deveraux et al., 1994), führt eine Depletion der Untereinheit zu der Hemmung des Ubiquitin-abhängigen Abbaus und zur Anreicherung polyubiquitiniertes Substrate. Ein Immunoblot gegen die *PSMB6/β1* Untereinheit zeigte eine Zunahme der Proform sowie der gereiften Form der katalytischen Untereinheit in mit *PSMD4/Rpn10* siRNA behandelten Zellen und lässt einen adaptiven Mechanismus vermuten (Abb. 3.10 A, siehe Kapitel 1.1.4). In Zellen, die einen Mangel in der *PSMB4/β7* Untereinheit aufweisen, akkumulierte die *PSMB6/β1* Proform. Da *PSMB4/β7* essentiell ist, für die Dimerisierung zweier halber Proteasom-Vorläuferkomplexe führt ein Mangel an der Untereinheit zu einer Hemmung der Assemblierung (siehe Kapitel 1.1.4 und (Hirano et al., 2008)) sowie der Reifung des 20S Proteasoms und resultiert wiederum in einer Anreicherung der β-Proformen. Außerdem lässt sich aufgrund der Zunahme der Untereinheit im Vergleich zu Kontrollzellen auch eine Adaptation der Proteasomexpression vermuten. Zudem resultiert die Störung der Assemblierung in einer geringeren Menge an aktiven Proteasomkomplexen und Akkumulation der Substrate des proteasomalen Abbaus, unter anderem Polyubiquitin-markierter Proteine (Abb. 3.10 A).

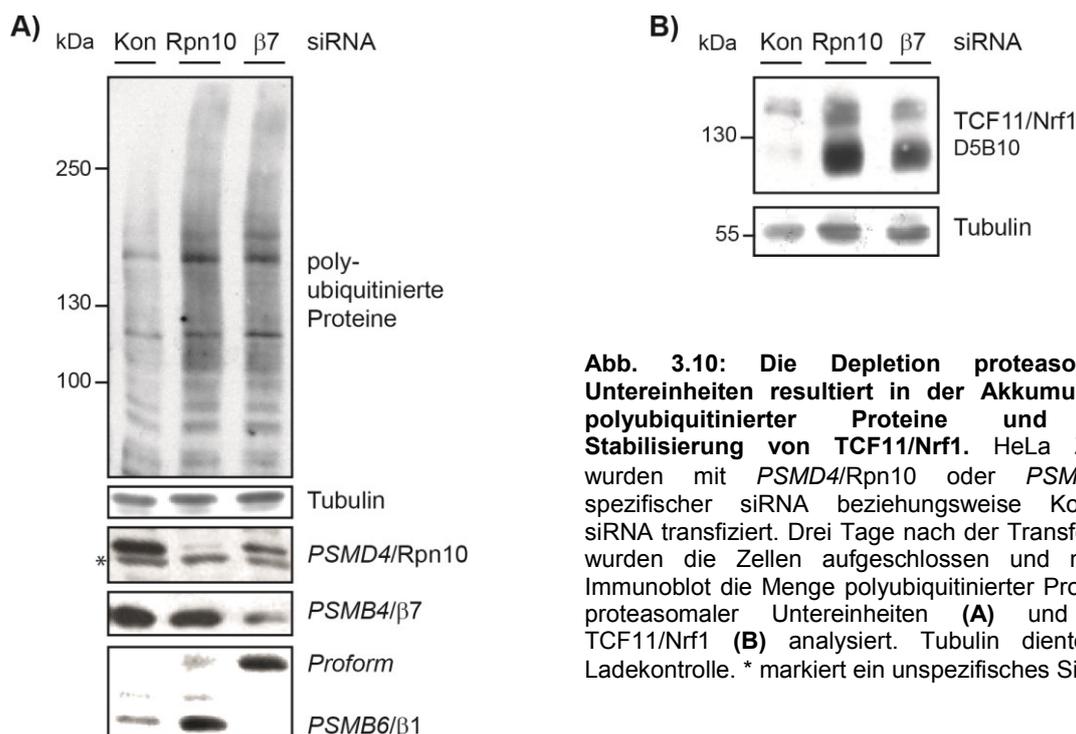
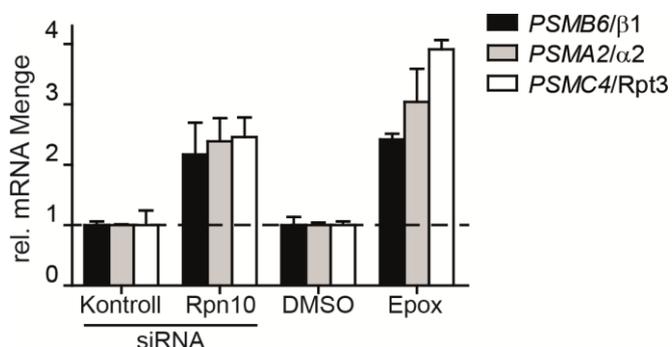


Abb. 3.10: Die Depletion proteasomaler Untereinheiten resultiert in der Akkumulation polyubiquitinerter Proteine und der Stabilisierung von TCF11/Nrf1. HeLa Zellen wurden mit *PSMD4/Rpn10* oder *PSMB4/β7* spezifischer siRNA beziehungsweise Kontroll-siRNA transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen aufgeschlossen und mittels Immunoblot die Menge polyubiquitiniertes Proteine, proteasomaler Untereinheiten (**A**) und von TCF11/Nrf1 (**B**) analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. * markiert ein unspezifisches Signal

Neben der Akkumulation polyubiquitinerter Substratproteine und der Zunahme der Menge der *PSMB6/β1* Untereinheit zeigt der Immunoblot gegen TCF11/Nrf1 eine Stabilisierung des Transkriptionsfaktors in *PSMD4/Rpn10*- und *PSMB4/β7*-depletierten Zellen sowie das Auftreten der kleineren prozessierten, deglykosylierten Form (Abb. 3.10 B).

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Abnahme des Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbaus in einer TCF11/Nrf1-abhängigen Induktion der Proteasomexpression resultiert. Um dies weiter zu untersuchen, wurden Zellen mit *PSMD4/Rpn10* oder Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend die Expression der proteasomalen Untereinheiten *PSMA2/α2*, *PSMB6/β1* und *PSMC4/Rpt3* mittels Real-Time PCR analysiert (Abb. 3.11). Zum Vergleich wurden mit Epoxomicin-behandelten Zellen parallel untersucht.

Abb. 3.11: Ein Mangel an *PSMD4/Rpn10* induziert die Genexpression proteasomaler Untereinheiten. EA.hy926 Zellen wurden einerseits mit *PSMD4/Rpn10* siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert oder mit 10 nM Epoxomicin (Epo) oder 0,1 % DMSO für 16 h behandelt. Anschließend wurde die Expression der *PSMB6/β1*, *PSMA2/α2* und *PSMC4/Rpt3* mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Expression normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. von zwei unabhängigen Experimenten relativ zu der jeweiligen Kontrolle (Kontroll-siRNA bzw. DMSO).



Die Ergebnisse zeigten eine 2 bis 2,5 fache Zunahme der Expression der proteasomalen Untereinheiten in *PSMD4/Rpn10*-depletierten Zellen im Vergleich zu den jeweiligen

Kontrollzellen. Damit ähnelt die Induktion dem Epoxomicin-induzierten 2,5 bis 4 fachen Anstieg der Expression der proteasomalen Gene. Eine Erklärung für die etwas schwächere Aktivierung durch die *PSMD4/Rpn10* Depletion könnte sein, dass durch Proteasominhibition der Abbau aller Proteasomsubstrate gehemmt wird. Hingegen führt ein Mangel an *PSMD4/Rpn10* nur zu einer verringerten Degradation polyubiquitinerter Proteasomsubstrate. Zudem wurde durch die siRNA Behandlung *PSMD4/Rpn10* nicht vollständig depletiert. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf eine TCF11/Nrf1-abhängige Regulation der Proteasomexpression in Antwort auf einen Mangel an aktiven 26S Proteasomen hin.

3.2. Regulation der TCF11/Nrf1-abhängigen Genexpression

Frühere Untersuchungen sowie die Resultate dieser Arbeit demonstrieren die Existenz eines adaptiven Mechanismus zur Sicherung der Proteasom Homöostase. Dieser induziert unter Abnahme der proteasomalen Aktivität TCF11/Nrf1-abhängig die Expression proteasomaler Untereinheiten in Mammalia (siehe Kapitel 3.1; (Meiners et al., 2003; Radhakrishnan et al., 2010; Steffen et al., 2010)). Jedoch ist der Aktivierungsprozess des Transkriptionsfaktors selbst bisher nicht vollständig geklärt. So ist nicht bekannt welches Signal genau den Kerntransfer und die Aktivierung von TCF11/Nrf1 auslöst oder auch wie der Faktor in den Kern transportiert wird. Im Folgenden wurde die Beteiligung Proteasominhibition-induzierter Stresssignale, wie ER-Stress und oxidativer Stress, an der TCF11/Nrf1 Aktivierung untersucht.

3.2.1. TCF11/Nrf1-abhängige Regulation der Proteasomexpression unter ER-Stress

Um der Akkumulation fehlgefalteter, fehlerhafter und beschädigter Proteine im ER entgegenzuwirken, werden durch die ER-Stress-induzierte UPR molekulare Chaperone sowie ERAD Komponenten hochreguliert und die Proteinsynthese verringert (siehe Kapitel 1.2.2, (Chaudhari et al., 2014)). Da TCF11/Nrf1 in der ER-Membran lokalisiert ist, ist eine Verknüpfung zwischen ER-Stress und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors denkbar und wurde in diesem Teil der Arbeit analysiert.

3.2.1.1. Proteasominhibition führt zur Anschaltung der UPR

Eine Aktivierung der UPR in Antwort auf ER-Stress wurde bereits für Zellen, die mit Proteasominhibitoren behandelt wurden, beschrieben (Bush et al., 1997; Obeng et al., 2006).

Ob die hier verwendeten Proteasominhibitoren und Konzentrationen ER-Stress und die UPR induzierten, wurde im Folgenden untersucht. Als Indikatoren für ER-Stress dienten zum einen die ER Chaperone *HSPA5/BiP* und *HSP90B1/GRP94*, welche durch die UPR hochreguliert werden (siehe Kapitel 1.2.2, (Samali et al., 2010)) und die XBP-1 mRNA, welche in Folge von ER-Stress durch IRE1 gespleißt wird. Die gespleißte XBP-1 mRNA wird

in die aktive Form des Transkriptionsfaktors translatiert und folglich die XBP-1-vermittelte Expression von Chaperonen und ERAD Komponenten induziert (siehe Kapitel 1.2.2, (Sidrauski and Walter, 1997; Yoshida et al., 2001)).

Zunächst wurde die Expression der ER Chaperone *HSPA5/BiP* und *HSP90B1/GRP94* mittels Immunoblot und Real-Time PCR analysiert. Eine moderate Zunahme der *HSPA5/BiP* Proteinmenge war nach Behandlung mit 10 nM Epoxomicin für 18 h zu beobachten. Eine stärkere Anreicherung des Chaperons erfolgte nach Behandlung mit 10 nM Bortezomib oder 100 nM MG132 (Abb. 3.12 A). Zudem resultierte die Behandlung mit Bortezomib in SH-SY5Y Zellen schon nach 8 h in einer Zunahme der *HSPA5/BiP* mRNA und nach 16 h zusätzlich in einem Anstieg der *HSP90B1/GRP94* mRNA (Abb. 3.12 B). Um zu bekräftigen, das Epoxomicin ER-Stress induziert, wurde zusätzlich die Anwesenheit der Stress-induzierten, gespleißten XBP-1 mRNA überprüft. Die XBP-1 Isoformen wurden mittels RT-PCR untersucht. In dem PCR Produkt des Ausgangsmaterials Epoxomicin-behandelter Zellen wurde neben der ungespleißten auch die gespleißten XBP-1 mRNA amplifiziert. Diese lag in den Proben DMSO-behandelter SH-SY5Y Zellen nicht vor (Abb. 3.12 C).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass die verwendeten Proteasominhibitoren in SH-SY5Y Zellen ER-Stress und folglich die UPR induzieren.

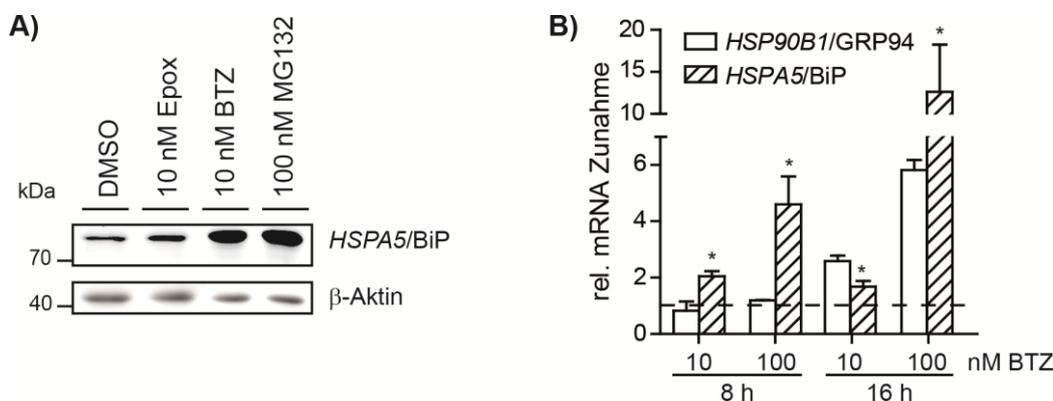


Abb. 3.12: Proteasominhibition induziert ER-Stress. (A) SH-SY5Y Zellen wurden für 18 h mit 10 nM Epoxomicin (Epo), 10 nM Bortezomib (BTZ), 100 nM MG132 oder 0,1 % DMSO behandelt. Anschließend wurde die HSPA5/BiP Proteinmenge mittels Immunoblot bestimmt. β -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) SH-SY5Y Zellen wurden mit 10-100 nM Bortezomib (BTZ) oder 0,1 % DMSO für 8 oder 16 h behandelt. Die *HSP90B1/GRP94* und *HSPA5/BiP* mRNA Menge wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. relativ zu der DMSO Kontrolle von zwei (\square) bzw. drei (\square) unabhängigen Experimenten. (C) SH-SY5Y Zellen wurden für 18 h mit 20 nM Epoxomicin (Epo) oder 0,1 % DMSO behandelt. Anschließend erfolgte eine PCR unter Verwendung von spezifischen Primern, die

sowohl die ungespleißte als auch die gespleißte Form des XBP-1 Faktors erkennen. Spezifische Primer gegen β -Aktin dienten als Kontrolle. (*: $p \leq 0,05$)

3.2.1.2. Die TCF11/Nrf1-abhängige Proteasomexpression wird nicht durch Thapsigargin und Tunicamycin aktiviert

Thapsigargin und Tunicamycin sind häufig verwendete ER-Stressoren, die eine Aktivierung der UPR hervorrufen (Samali et al., 2010). Thapsigargin, ein Inhibitor der sarkoplasmischen/endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), aktiviert die UPR durch Störung der Ca^{2+} Homöostase. Tunicamycin inhibiert die GlcNAc-Phosphotransferase, welche essentiell für die N-Glykosylierung von Proteinen ist. Die Hemmung der N-Glykosylierung stört die Faltung von Glykoproteinen, führt dadurch zur Anreicherung fehlgefalteter Proteine im ER und folglich zu ER-Stress.

Der ER-Stress Sensor ATF6 (siehe Kapitel 1.2.2) wird in Antwort auf ER-Stress in den Golgi-Apparat transferiert und dort proteolytisch prozessiert. Dabei wird das cytosolische Fragment, welches die Transaktivierungs- sowie die bZIP-Domäne trägt, frei und wandert in den Nukleus, wo es schließlich die Expression seiner Zielgene aktiviert. Neben ATF6 existieren weitere ER-membranständige Transkriptionsfaktoren, die über einen ähnlichen Mechanismus in Antwort auf ER-Stress induziert werden, beispielsweise OASIS und CREBH (Asada et al., 2011). Demnach lag die Vermutung nahe, dass auch der ER-membranständige Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 in Antwort auf ER-Stress aktiviert wird. Um das zu überprüfen wurden SH-SY5Y Zellen mit Thapsigargin oder Tunicamycin behandelt und anschließend die Proteinmenge mittels Immunoblot untersucht (Abb. 3.13 A).

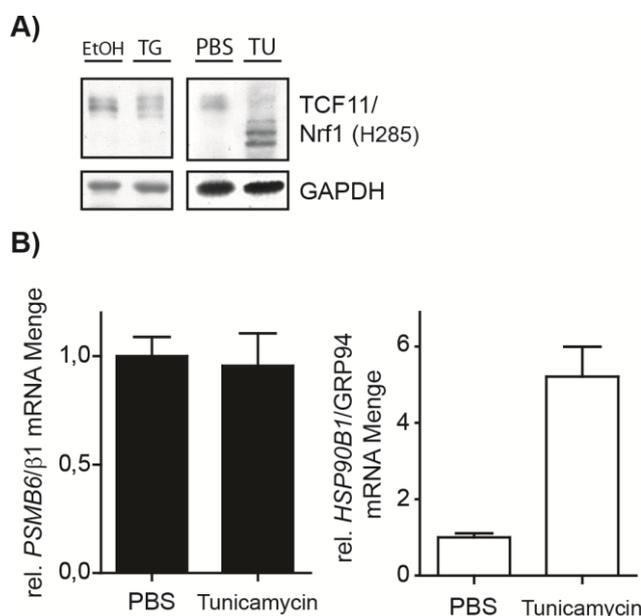


Abb. 3.13: Thapsigargin und Tunicamycin induzieren nicht die TCF11/Nrf1-abhängige Expression proteasomaler Gene. (A) SH-SY5Y Zellen wurden entweder mit 150 nM Thapsigargin (TG) bzw. mit EtOH als Lösungsmittelkontrolle für 6 h oder mit 10 µg/ml Tunicamycin (TU) bzw. PBS als Kontrolle für 4 h behandelt. Anschließend wurde die TCF11/Nrf1 Proteinmenge mittels Immunoblot analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B) EA.hy926 Zellen wurden mit 10 µg/ml Tunicamycin für 4 h behandelt. Die mRNA Menge von *PSMB6/β1* und *HSP90B1/GRP94* wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± S.D. relativ zu der PBS Kontrolle von drei (■) bzw. zwei (□) unabhängigen Experimenten.

Die Thapsigarginbehandlung hatte keinen Einfluss auf den TCF11/Nrf1 Proteinspiegel (Abb. 3.13 A). Tunicamycin-behandelte Zellen zeigten hingegen eine leichte Zunahme der Proteinmenge. Zudem resultierte die Behandlung in einer schneller migrierenden Form der Isoformen TCF11 und Nrf1. Hierbei handelt es sich um die nicht-glykosylierten Formen, da

Tunicamycin die N-Glykosylierung inhibiert (Abb. 3.13 A). Um zu überprüfen, ob der ER-Stressor einen Einfluss auf die TCF11/Nrf1-vermittelte Expression proteasomaler Untereinheiten hat, wurde exemplarisch die mRNA Menge der *PSMB6/β1* Untereinheit mittels Real-Time PCR bestimmt. Zur Kontrolle wurde die Induktion der ER Stressantwort durch Tunicamycin über die *HSP90B1/GRP94* Expression überprüft (Abb. 3.13 B). Tunicamycin erhöhte zwar die Expression des ER Chaperons, einem Marker für ER-Stress, um das etwa 5 fache, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die endogene *PSMB6/β1* Expression. In Zusammenarbeit mit Dr. A. Koch wurde auch in Reporterassay-Experimenten durch Tunicamycin keine Aktivierung des *PSMB6/β1*-Promotors beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Thapsigargin- und Tunicamycin-induzierter ER-Stress führte unter den verwendeten Bedingungen zu keiner Induktion der TCF11/Nrf1-abhängigen *PSMB6/β1* Genexpression. Aus diesem Grund lässt sich vermuten, dass der Proteasominhibitor-induzierte ER-Stress nicht der Auslöser für die TCF11/Nrf1-abhängige Induktion der Proteasomexpression ist. Da sich die Stressoren in Ihrer Wirkung unterscheiden, stimuliert möglicherweise ein anderes Signal während der Proteasominhibition die Aktivierung von TCF11/Nrf1.

3.2.2. TCF11/Nrf1-abhängige Regulation der Proteasomexpression unter oxidativem Stress

TCF11/Nrf1 ist neben Nrf2 an der Regulation antioxidativer Gene in Antwort auf oxidativen Stress beteiligt. Beide Transkriptionsfaktoren aktivieren die Transkription ihrer Zielgene durch Bindung der ARE Motive in deren Promotoren (siehe Kapitel 1.2.3.1; (Sykiotis and Bohmann, 2010)). Auch die TCF11/Nrf1-abhängige Expression des 26S/30S Proteasoms wird über die regulatorischen ARE Motive der Promotoren der proteasomalen Untereinheiten vermittelt (Abb. 3.7 A und Abb. 3.8 B; (Steffen et al., 2010)). Zudem spielt das UPS eine große Bedeutung in der antioxidativen Stressantwort. Unter oxidativen Bedingungen degradiert das Proteasom oxidativ geschädigte Proteine und schützt die Zelle dadurch vor toxischen Aggregaten (siehe Kapitel 1.2.3.2; (Kriegenburg et al., 2011; Shang and Taylor, 2011)). Die hohe Relevanz des Proteasoms in der zellulären, antioxidativen Stressantwort und dessen TCF11/Nrf1-abhängige Regulation über die ARE Motive lassen vermuten, dass oxidativer Stress eine entscheidende Rolle bei der Regulation der TCF11/Nrf1-abhängigen Expressionsinduktion spielt.

3.2.2.1. *Proteasominhibition verursacht intrazellulären oxidativen Stress*

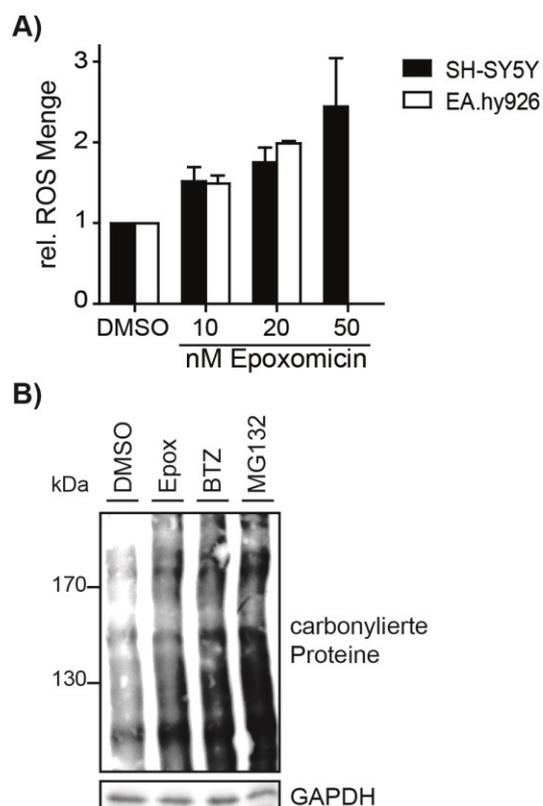
Um zu untersuchen, ob oxidativer Stress einen Einfluss auf die TCF11/Nrf1 Aktivierung hat, wurde zunächst überprüft, ob Proteasominhibition oxidativen Stress induziert.

Zur Bestimmung der intrazellulären ROS wurden SH-SY5Y Zellen mit 10 bis 50 nM Epoxomicin behandelt. EA.hy926 Zellen wurden nur mit 10 und 20 nM Proteasominhibitor

exponiert, da eine Behandlung mit 50 nM zu Zelltod führte. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart des zellpermeablen DCFH-DA kultiviert. Dieses wird intrazellulär zu dem nicht fluoreszierenden DCFH deacetyliert und schließlich von ROS zu dem stark fluoreszierenden DCF oxidiert. Die Epoxomicinbehandlung resultierte in einer konzentrationsabhängigen Zunahme intrazellulärer ROS in SH-SY5Y und EA.hy926 Zellen (Abb. 3.14 A).

Ob dieser Proteasominhibitor-induzierte Anstieg an ROS zu einer Schädigung zellulärer Proteine führt, wurde durch Detektion carbonylierter Proteine mittels Immunoblot untersucht. Carbonylgruppen entstehen durch Oxidation verschiedener Aminosäureseitenketten, und dienen somit als Marker für irreversible Proteinoxidation. Die SH-SY5Y Zellen wurden zunächst mit Epoxomicin, Bortezomib oder MG132 behandelt. Zum Nachweis wurden die Carbonylgruppen durch Zugabe von DNPH zu den Zelllysaten in die entsprechenden DNP-Derivaten umgewandelt und letztlich unter Verwendung eines DNP spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht. Der Immunoblot zeigte eine Zunahme carbonylierter, oxidativ geschädigter Proteine in Zellen, in denen das Proteasom inhibiert wurde (Abb. 3.14 B).

Abb. 3.14: Proteasominhibition induziert oxidativen Stress. (A) SH-SY5Y oder EA.hy926 Zellen wurden für 16-18 h mit 10-50 nM Epoxomicin oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt. Die relative Menge intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurde unter Verwendung von DCFH-DA mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen ROS Menge \pm S.D. von sechs (SH-SY5Y) bzw. zwei (EA.hy926) unabhängigen Experimenten. **(B)** SH-SY5Y Zellen wurden für 18 h mit 10 nM Epoxomicin (Epo), 10 nM Bortezomib (BTZ), 100 nM MG132 oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Carbonylgruppen wurden zunächst mit DNPH derivatisiert und anschließend mit einem spezifischen Antikörper gegen die DNP-Derivate sichtbar gemacht. Ein Immunoblot gegen GAPDH diente als Ladekontrolle.



3.2.2.2. Intrazellulärer oxidativer Stress fördert die TCF11/Nrf1-abhängige Induktion der PSMB6/ β 1 Genexpression

Da Proteasominhibition zu oxidativem Stress führt (siehe Kapitel 3.2.2.1), stellte sich im Folgenden die Frage, ob eine Imbalance im Redoxgleichgewicht für die Induktion der Proteasomexpression nötig ist.

Um diese Frage zu beantworten, wurden SH-SY5Y Zellen parallel mit Epoxomicin und einem Antioxidans behandelt und anschließend die Auswirkung auf die Expressionsinduktion untersucht. Hierzu wurden die Antioxidantien Sulforaphan und Ascorbinsäure verwendet. Sulforaphan wirkt als ein indirektes Antioxidans, indem es die Nrf2-Keap1 antioxidative Stressantwort aktiviert (siehe Kapitel 1.3.1.2 und 1.2.3.1; (Dinkova-Kostova et al., 2002)). Hierbei reagiert das elektrophile Kohlenstoffatom der Isothiocyanatgruppe von Sulforaphan mit den Redox-sensitiven Cysteinen des Nrf2 Repressors Keap1. Daraufhin wird der Nrf2 Abbau gehemmt und der Transkriptionsfaktor akkumuliert im Nukleus, wo er die Expression seiner antioxidativen und detoxifizierenden Zielgene induziert. Neben der Anknüpfung von Elektrophilen an die Redox-sensitiven Cysteine von Keap1 aktiviert die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken durch Oxidantien die Nrf2-vermittelte Expression zytoprotektiver Gene. Im Gegensatz zu Sulforaphan stellt die Ascorbinsäure aufgrund seiner reduzierenden Eigenschaften ein direktes Antioxidans dar.

Beide Antioxidantien reduzieren die Epoxomicin-induzierte ROS-Produktion in SH-SY5Y Zellen (Abb. 3.15 A). Die Untersuchung der *PSMB6*/ β 1 Expression unter Verwendung des CAT-Reporterassays zeigte ferner, dass die Epoxomicin-abhängige 2 bis 3 fache Induktion der Promotoraktivität durch Ko-Behandlung mit beiden Antioxidantien signifikant verringert wurde (Abb. 3.15 B). Hierbei wies Sulforaphan einen stärkeren Effekt als die Ascorbinsäure auf. Außerdem beeinflusste Sulforaphan schon die basale Aktivierung des *PSMB6*/ β 1 Promotors. Zusätzlich zu der *PSMB6*/ β 1 Promotoraktivität wurde die mRNA Menge mittels Real-Time PCR quantifiziert. Wie die Ergebnisse des CAT-Reporterassays, zeigte auch die Analyse der mRNA Menge eine Abnahme der Epoxomicin-induzierten 2 fachen *PSMB6*/ β 1 Expression (Abb. 3.15 C).

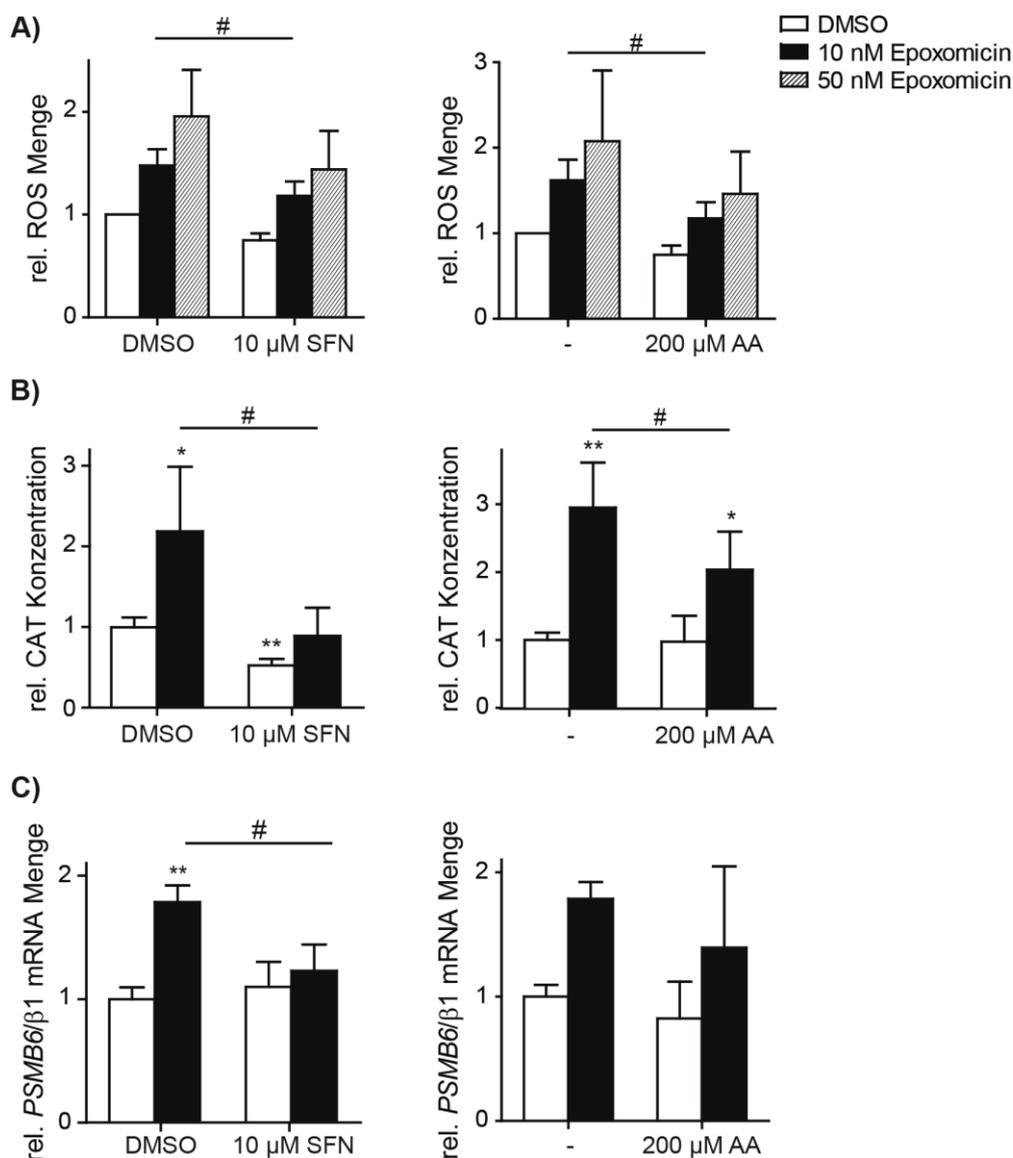


Abb. 3.15: Oxidativer Stress fördert die Epoxomicin-induzierte Zunahme der proteasomalen Genexpression. SH-SY5Y Zellen wurden für 20 h mit 10 μM Sulforaphan (SFN) oder 200 μM Ascorbinsäure (AA) und 10 nM Epoxomicin oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO kokubiert. **(A)** Die relative Menge intrazellulärer ROS wurde unter Verwendung von DCFH-DA mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen ROS Menge ± S.D. von fünf (SFN) oder sieben (AA) unabhängigen Experimenten. **(B)** SH-SY5Y Zellen wurden mit einem *PSMB6/β1* Promotor-enthaltenden CAT-Reportergenkonstrukt und pcDNA3.1-lacZ kotransfiziert. Nach 6 h erfolgte die Behandlung der Zellen wie oben beschrieben. Die CAT-Konzentration der Zelllysate wurde mittels ELISA bestimmt und auf die β-Galaktosidaseaktivität normiert. Dargestellt ist die gemittelte CAT Konzentration relativ zu der DMSO Kontrolle ± S.D. von 6 Replikaten aus drei unabhängigen Experimenten. **(C)** Die mRNA Menge von *PSMB6/β1* wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± S.D. relativ zu den Lösungsmittelkontrollen von drei unabhängigen Experimenten. (#/*: p<0,05; **: p<0,005)

Da TCF11/Nrf1 auch in SH-SY5Y Zellen einen wichtigen Regulator der Proteasomexpression in Antwort auf eine verringerte proteasomale Aktivität darstellt (Abb. 3.9), wurde im Folgenden überprüft, ob die Antioxidantien einen Einfluss auf die Stabilisierung und den nukleären Transfer des Transkriptionsfaktors haben. Hierzu wurden die Zellen wieder parallel mit Epoxomicin und Sulforaphan oder Ascorbinsäure behandelt und die Zelllysate oder subzellulären Fraktionen mittels Immunoblot untersucht (Abb.

3.16 A, B). Wie zu erwarten, resultiert die Behandlung mit Epoxomicin in einer Stabilisierung und nukleären Akkumulation des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1. Jedoch hatte eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit einem der beiden Antioxidantien keinen Effekt auf die TCF11/Nrf1 Proteinmenge (Abb. 3.16 A). Auch die Epoxomicin-induzierte nukleäre Lokalisation von TCF11/Nrf1 wurde nicht durch die Antioxidantien beeinflusst (Abb. 3.16 B).

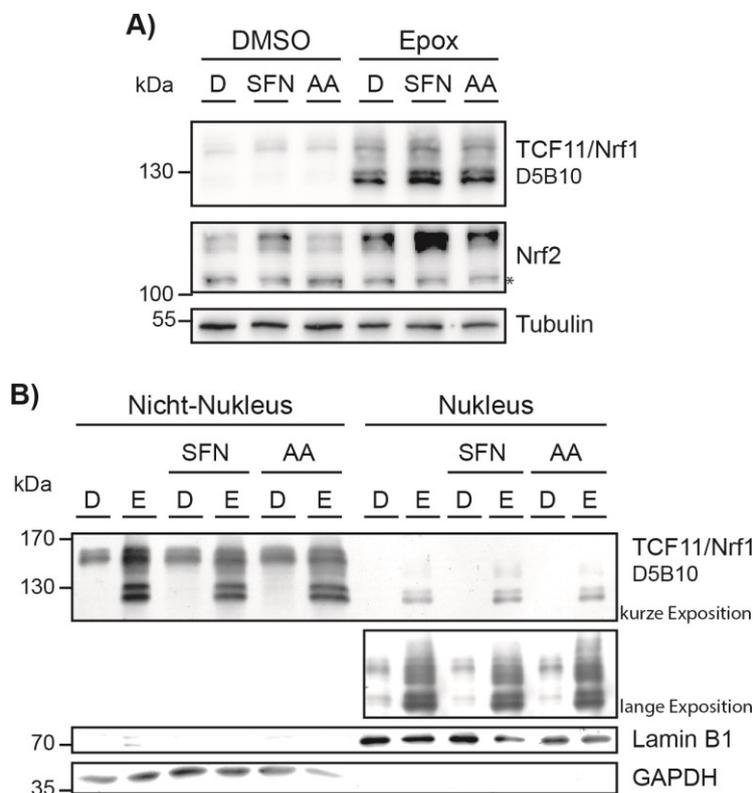


Abb. 3.16: Oxidativer Stress hat keinen Einfluss auf die Proteinmenge und Lokalisation von TCF11/Nrf1. SH-SY5Y Zellen wurden für 20 h mit 10 μ M Sulforaphan (SFN) oder 200 μ M Ascorbinsäure (AA) und 10 nM Epoxomicin (Epoxy/E) oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO (D) kokubiert. Die Expression und Lokalisation von TCF11/Nrf1 und Nrf2 wurde durch Immunoblot Analyse entweder der Gesamtllysate (**A**) oder der subzellulären Fraktionen (**B**) untersucht. *unspezifisches Signal

Neben TCF11/Nrf1 wurde auch die Proteinmenge von Nrf2 betrachtet. Die indirekte antioxidative Wirkung von Sulforaphan beruht, wie bereits oben beschrieben, auf der Aktivierung der Nrf2-vermittelten Expression antioxidativer und detoxifizierender Gene. So zeigten die Sulforaphan-behandelten Zellen eine Zunahme der Nrf2 Proteinmenge (Abb. 3.16 A). Zudem wurde der Faktor, welcher proteasomal abgebaut wird (Kobayashi et al., 2004), wie erwartet durch Epoxomicin stabilisiert (Abb. 3.16 A). Jedoch wurde dessen Beteiligung an der Epoxomicin-induzierten Expression der proteasomalen Untereinheiten in SH-SY5Y Zellen in siRNA Experimenten bereits ausgeschlossen (Abb. 3.9). Zudem zeigte eine Behandlung mit Ascorbinsäure keinen Effekt auf den Nrf2 Proteinspiegel (Abb. 3.16 A), aber beeinflusste die Epoxomicin-induzierte Expression der proteasomalen Untereinheiten (Abb. 3.15 B, C). Dies deutet auf die Existenz eines Nrf2-unabhängigen Wirkmechanismus der Antioxidantien auf die Epoxomicin-induzierte Proteasominhibition hin. Jedoch lassen die

Ergebnisse, dass Sulforaphan im Gegensatz zu Ascorbinsäure die basale *PSMB6/β1* Promotoraktivität verringert und Nrf2 aktiviert, eine teilweise Beteiligung des Transkriptionsfaktors unter diesen Bedingungen vermuten.

Die Anreicherung eines Transkriptionsfaktors im Nukleus, fördert zwar zumeist die Induktion der Transkription seiner Zielgene, ist allerdings nicht in jedem Fall ausreichend für eine Aktivierung der Expression. Beispielsweise können Kofaktoren oder post-translationale Modifizierungen des Transkriptionsfaktors für die Bindung und Aktivierung der Promotoren nötig sein (Todeschini et al., 2014). Um zu untersuchen, ob Sulforaphan die TCF11/Nrf1-vermittelte Genexpression beeinflusst, wurde exemplarisch die Bindung an das regulatorische ARE-17 Motiv des *PSMB6/β1* Promotors nach Behandlung mit Epoxomicin allein oder zusätzlich mit dem Antioxidans mittels ChIP untersucht (Abb. 3.17 A).

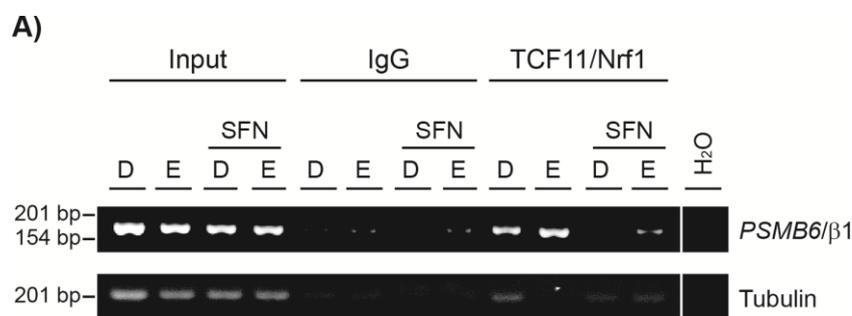
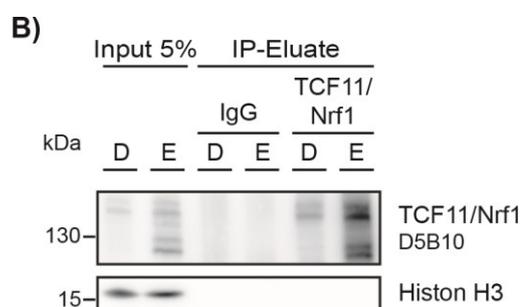


Abb. 3.17: Oxidativer Stress fördert die Bindung von TCF11/Nrf1 an den PSMB6/β1 Promotor. SH-SY5Y Zellen wurden für 20 h mit 10 μM Sulforaphan (SFN) und 10 nM Epoxomicin oder 0,1% DMSO koinkubiert. **(A)** Danach wurden die Proteine mit der DNA fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen TCF11/Nrf1 oder einer unspezifischen IgG Kontrolle präzipitiert. Nachdem die DNA von den Proteinen abgetrennt wurde, wurde eine PCR mit spezifischen Primern gegen die ARE-17 Sequenz des *PSMB6/β1* Promotors durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Primer gegen eine Sequenz des β-Tubulin Promotors. **(B)** Die Spezifität der Immunpräzipitation wurde zusätzlich durch Immunoblotanalyse der Präzipitate mit einem spezifischen Antikörper gegen TCF11/Nrf1 und Histon H3 überprüft.



Wie erwartet erhöht Epoxomicin im Vergleich zu DMSO-Kontrollzellen die Bindung von TCF11/Nrf1 an den Promotor (siehe Abb. 3.8). In Gegenwart von Sulforaphan ist zwar eine Zunahme durch Epoxomicin im Vergleich zu Sulforaphan und DMSO-behandelten SH-SY5Y Zellen detektierbar, jedoch verringert sich insgesamt die Bindung des Transkriptionsfaktors an den Promotor. Zur Kontrolle der IP Spezifität wurden Primer gegen eine Sequenz des β-Tubulin Promotors verwendet (Abb. 3.17 A; (Sun et al., 2007)). Außerdem wurden die präzipitierten Chromatin-TCF11/Nrf1 Komplexe zusätzlich mittels Immunoblot analysiert (Abb. 3.17 B). Tubulin wurde im Input, jedoch auch marginal in wenigen ChIP-Präzipitaten detektiert. TCF11/Nrf1 konnte im Input und in den TCF11/Nrf1 Präzipitaten nachgewiesen

werden. Insgesamt zeigen die Kontrollen, dass die TCF11/Nrf1 Immunopräzipitation spezifisch war.

Zusammengenommen ergaben die Untersuchungen, dass Antioxidantien zwar nicht die Lokalisation des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 beeinflussten, jedoch die Epoxomicin-induzierte Bindung an den Promotor der *PSMB6*/β1 Untereinheit und folglich dessen Expression verringerten.

3.2.3. Das Pro-Oxidans Rotenon induziert eine frühe TCF11/Nrf1-vermittelte Expression proteasomaler Untereinheiten

Das natürlich vorkommende Pestizid Rotenon wird häufig in Tier- sowie Zellkultur-Modellen zur Erforschung Parkinson-ähnlicher Veränderungen verwendet. Als Inhibitor des Komplex I der Atmungskette induziert Rotenon zellulären, oxidativen Stress und fungiert damit als Pro-Oxidans. Ferner führt die Exposition mit Rotenon zu einer Anreicherung von proteotoxischen Proteinaggregaten sowie zur Neurodegeneration (Xiong et al., 2012).

3.2.3.1. *Rotenon verursacht intrazellulären oxidativen und proteotoxischen Stress*

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass oxidativer Stress die Aktivierung des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 fördert (siehe Kapitel 3.2.2). Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit dem Pro-Oxidans Rotenon TCF11/Nrf1 beeinflusst, wurde zunächst überprüft, ob Rotenon in den SH-SY5Y Zellen oxidativen und proteotoxischen Stress induziert. Hierzu wurde die ROS Menge in Rotenon-behandelten Zellen untersucht. Das Pro-Oxidans induzierte nach 6 h eine konzentrationsabhängige bis 5 fache Zunahme der intrazellulären ROS (Abb. 3.18 A). Zudem zeigte die Untersuchung carbonylierter Proteine im Immunoblot, dass die Rotenonbehandlung in einer Anreicherung oxidativ beschädigter Proteine resultiert (Abb. 3.18 B). Eine Behandlung der SH-SY5Y Zellen für 24 h mit Rotenon hatte außerdem eine Zunahme polyubiquitinerter Proteine zur Folge (Abb. 3.18 C).

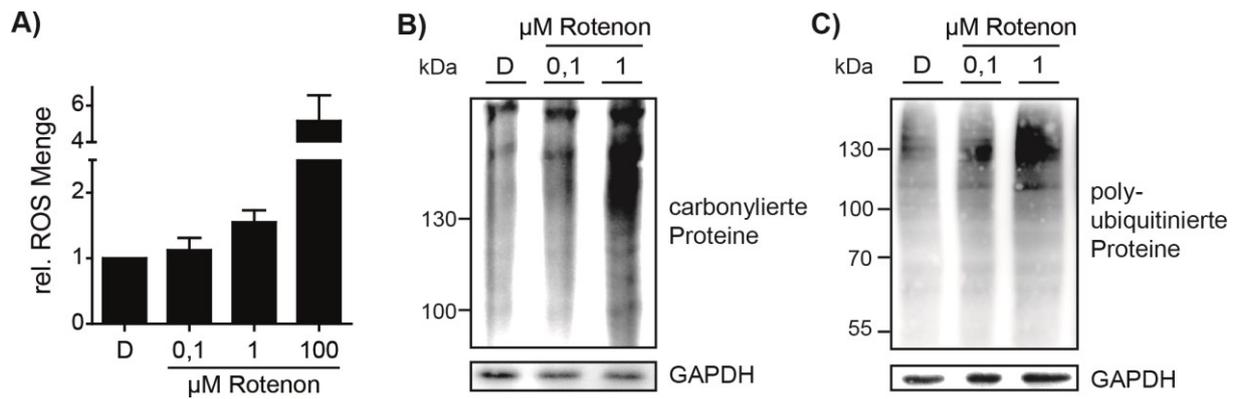


Abb. 3.18: Rotenon verursacht oxidativen und proteotoxischen Stress. (A) SH-SY5Y Zellen wurden für 6 h mit 0,1–100 μM Rotenon oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO (D) behandelt. Die relative Menge intrazellulärer ROS wurde unter Verwendung von DCFH-DA mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen ROS Menge \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten. (B) SH-SY5Y Zellen wurden für 6 h mit 0,1–1 μM Rotenon oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Die Carbonylgruppen wurden zunächst mit DNPH derivatisiert und anschließend mit einem spezifischen Antikörper gegen die DNP-Derivate sichtbar gemacht. Ein Immunoblot gegen GAPDH diente als Ladekontrolle. (C) SH-SY5Y Zellen wurden für 24 h mit 0,1–1 μM Rotenon oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Polyubiquitinierte Proteine wurden mittels Immunoblot analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Des Weiteren wurde überprüft, ob Rotenonbehandlung zu programmierten Zelltod führt. Hierzu wurde einerseits die Caspase-3/7 Aktivität, welche den apoptotischen Zelltod charakterisiert, und andererseits die metabolische Aktivität, die der Zellviabilität entspricht, untersucht. Eine Behandlungsdauer von 24 h mit dem Komplex I Inhibitor resultiert in einer signifikanten Zunahme der Caspase-3/7 Aktivität bei einer Konzentration von 1–10 μM um etwa 40 bis 60 %. Eine Behandlung der Zellen mit einer hohen Konzentration des Proteasominhibitors MG132 diente als Positivkontrolle und induzierte folglich einen starken Anstieg der Caspase-3/7 Aktivität (Abb. 3.19 A). Die Zellviabilität wurde mittels XTT-Assay bestimmt und ergab ebenfalls eine Rotenon-induzierte, konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität (Abb. 3.19 B). Eine Beeinträchtigung der metabolischen Aktivität war schon bei geringen Konzentrationen zu erkennen. Bei einer Rotenonkonzentration von 1 μM nahm die Caspase-3/7 Aktivität zu und die Zellviabilität war um mehr als 50 % reduziert. Aus diesem Grund wurden für die folgenden Untersuchungen Konzentrationen kleiner 1 μM verwendet.

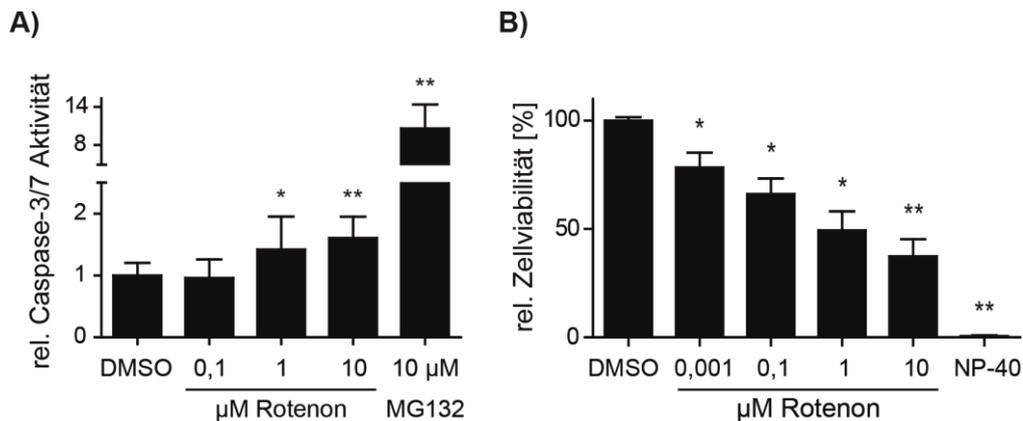


Abb. 3.19: Rotenonbehandlung führt zu Zelltod. (A) SH-SY5Y Zellen wurden für 24 h mit 0,1-10 µM Rotenon, 10 µM MG132 als Positivkontrolle oder 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Anschließend wurde die relative Caspase-3/7 Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. von fünf unabhängigen Experimenten. (B) SH-SY5Y Zellen wurden für 20 h mit 0,001-10 µM Rotenon oder 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Als Negativkontrolle dienten mit 0,5 % NP-40-behandelte Zellen. Anschließend wurde die relative Zellviabilität mittels XTT Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. von drei unabhängigen Experimenten. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$)

3.2.3.2. Eine kurze Rotenonbehandlung induziert die nukleäre Lokalisation von TCF11/Nrf1

Da oxidativer Stress die TCF11/Nrf1-abhängige Induktion der Expression proteasomaler Untereinheiten in Antwort auf Proteasominhibition fördert (siehe Kapitel 3.2.2) und Rotenon oxidativen Stress induziert (siehe Kapitel 3.2.3.1), sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Proteinmenge und die Lokalisation des Transkriptionsfaktors durch Rotenon beeinflusst wird. Hierzu wurden Gesamtzelllysate oder subzelluläre Fraktionen Rotenon-behandelter SH-SY5Y Zellen untersucht.

Der Immunoblot ergab eine leichte Zunahme von TCF11/Nrf1 in Zellen, die für kurze Zeit in Gegenwart von 100 nM Rotenon kultiviert wurden. Neben der Zunahme der höhermolekularen Form war zusätzlich die niedermolekulare Form detektierbar (Abb. 3.20 A). Des Weiteren war vor allem eine Rotenon-abhängige Zunahme des Transkriptionsfaktors in den Fraktionen nukleärer sowie Chromatin-gebundener Proteine zu erkennen (Abb. 3.20 B). Zudem nahm die TCF11/Nrf1 Menge auch in der Cytosol- und Membranfraktion zu. Die nukleäre Anreicherung des Transkriptionsfaktors wurde zusätzlich mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt (Abb. 3.20 C). Unter stressfreien Bedingungen (DMSO) kolokalisierte TCF11/Nrf1 mit dem ER-Membranmarker Calnexin. Eine Behandlung mit Rotenon resultierte in einer verstärkten nukleären Lokalisation des Transkriptionsfaktors.

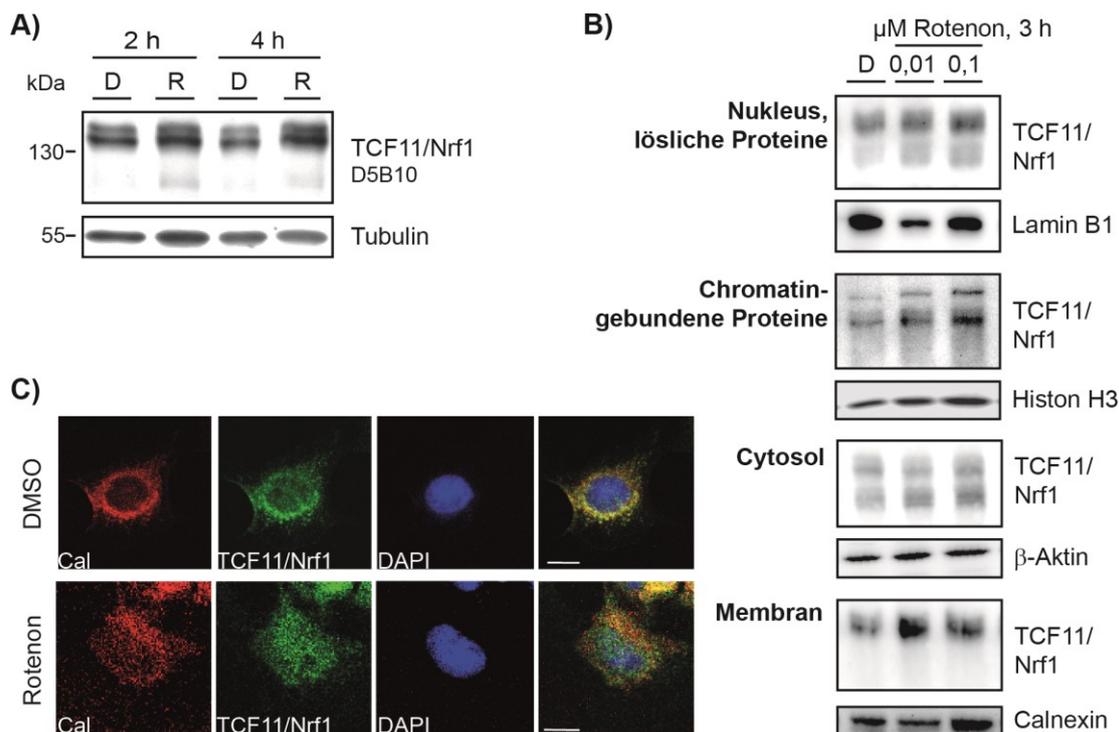


Abb. 3.20: Kurze Rotenonbehandlung fördert die nukleäre Lokalisation von TCF11/Nrf1. (A) SH-SY5Y Zellen wurden für 2 oder 4 h mit 100 nM Rotenon (R) oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Die Proteinmenge von TCF11/Nrf1 wurde anschließend mittels Immunoblot analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) SH-SY5Y Zellen wurden für 3 h mit 10-100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Anschließend wurden lösliche Proteine des Nukleus, Chromatin-gebundene Proteine, Cytosol- und Membranproteine isoliert und die subzelluläre Lokalisation von TCF11/Nrf1 mittels Immunoblot untersucht. Spezifische Antikörper gegen Lamin B1, Histon H3, β -Aktin und Calnexin dienten als Markerproteine für die subzellulären Fraktionen. (C) SH-SY5Y Zellen wurden mit 100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO für 2 h behandelt und mit PFA fixiert. Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie wurde die zelluläre Lokalisation von TCF11/Nrf1 unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers analysiert. Ein spezifischer Antikörper gegen Calnexin wurde als ER-Membranmarker verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 10 μ m.

3.2.3.3. TCF11/Nrf1 induziert die Proteasomexpression in Rotenon-behandelten SH-SY5Y Zellen

Eine Anreicherung eines Transkriptionsfaktors im Nukleus fördert zumeist die Transaktivierung seiner Zielgene. Mit zunehmender Konzentration des Faktors erhöht sich die Wahrscheinlichkeit dessen Bindung an die spezifischen, regulatorischen DNA Motive und folglich der Einleitung der Transkription (Todeschini et al., 2014).

Da Rotenon die nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 fördert, sollte nun untersucht werden, ob das Pro-Oxidans die Expression der Zielgene von TCF11/Nrf1 induziert. Hierzu wurde zunächst die Expression auf Ebene der Transkription mittels Real-Time PCR und CAT-Reporterassay exemplarisch für die proteasomale Untereinheit *PSMB6*/ β 1 betrachtet. Mit Rotenon-behandelte SH-SY5Y Zellen zeigten einen Anstieg der *PSMB6*/ β 1 Expression um etwa 50 %. Zudem induzierte Rotenon auch die Promotoraktivität der proteasomalen Untereinheit um etwa 25 % (Abb. 3.21 A, B). Zusammengenommen fördert das Pro-Oxidans die Aktivierung der *PSMB6*/ β 1 Transkription.

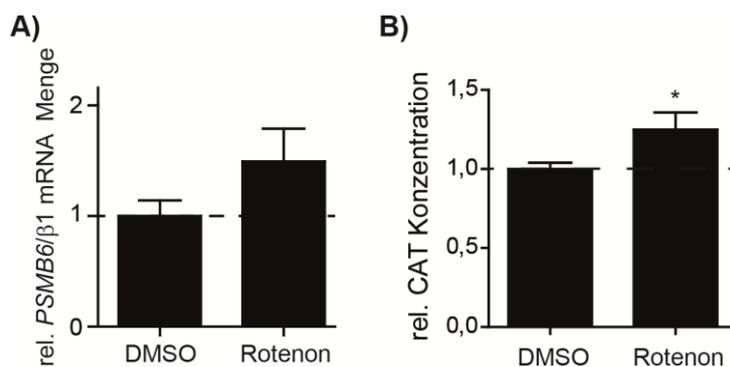


Abb. 3.21: Rotenon induziert die Transkription proteasomaler Untereinheiten. (A) SH-SY5Y Zellen wurden für 8 h mit 100 nM Rotenon oder DMSO behandelt. Die mRNA Menge von *PSMB6/β1* wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die *HPRT1* Menge normiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.D. relativ zu der DMSO Kontrolle von drei unabhängigen Experimenten. (B) SH-SY5Y Zellen wurden mit dem *PSMB6/β1* Promotor-enthaltenen Reporter-genkonstrukt pCAT1500 und pcDNA3.1-lacZ kotransfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen für 4 h mit 100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO behandelt. Die CAT-Konzentration der Zelllysate wurde mittels ELISA bestimmt und auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert. Dargestellt ist die gemittelte CAT Konzentration relativ zu der DMSO Kontrolle \pm S.D. von sechs biologischen Replikaten aus drei unabhängigen Experimenten. (*: $p < 0,05$)

Um zu überprüfen, ob die Rotenon-abhängige Transkriptionsinduktion von *PSMB6/β1* auch in einer Zunahme aktiver Proteasomkomplexe resultiert, wurden SH-SY5Y Zellen für 8 h mit Rotenon oder DMSO behandelt und die Proteasomkomplexe unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Darauf folgte die Bestimmung der proteasomalen Aktivität im Gel. Diese ergab eine signifikante, reproduzierbare Rotenon-induzierte Zunahme des Substratumsatzes der hochmolekularen 19S-enthaltenden sowie der niedermolekularen Proteasomkomplexe um etwa 40 % (Abb. 3.22 A). Im Anschluss zu der Aktivitätsbestimmung wurde die Menge der Proteasomkomplexe mittels Immunoblot analysiert. Unter Verwendung eines *PSMA1/α6* oder *PSMB6/β1* spezifischen Antikörpers war vor allem eine Zunahme der hochmolekularen, 19S-enthaltenden Komplexe zu erkennen (Abb. 3.22 B). Insgesamt entsprach die relative Zunahme der Gesamtmenge der Proteasomkomplexe in etwa dem relativen Anstieg der totalen Proteasomaktivität. Der Zugang zu dem proteolytischen Zentrum ist bei dem freien 20S Proteasom verschlossen (Groll et al., 1997) und der 20S Komplex demnach im Aktivitätsassay weitestgehend inaktiv. Die Beobachtung, dass im Substrat-Overlay auf der Höhe des 20S Proteasoms ein starkes Signal zu beobachten war und eine Doppelbande in diesem Bereich im *PSMA1/α6* und *PSMB6/β1* Immunoblot vorlag, lassen eine Interaktion des 20S Komplex mit dem PA28 Aktivator vermuten. Die Anwesenheit von PA28-enthaltenen Komplexen wurde unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen PA28β überprüft (Abb. 3.22 C). Der Immunoblot belegte die Existenz PA28-gebundener niedermolekularer Proteasomkomplexe in SH-SY5Y Zellen. Zudem war neben dem 26S Proteasom auch das Hybridproteasomen, welches nur schwer von dem 26S Komplex zu trennen ist, in den SH-SY5Y Zellen vorhanden. Ferner war eine leichte Rotenon-abhängige Zunahme des PA28-gebundenen, niedermolekularen Komplexes zu erkennen.

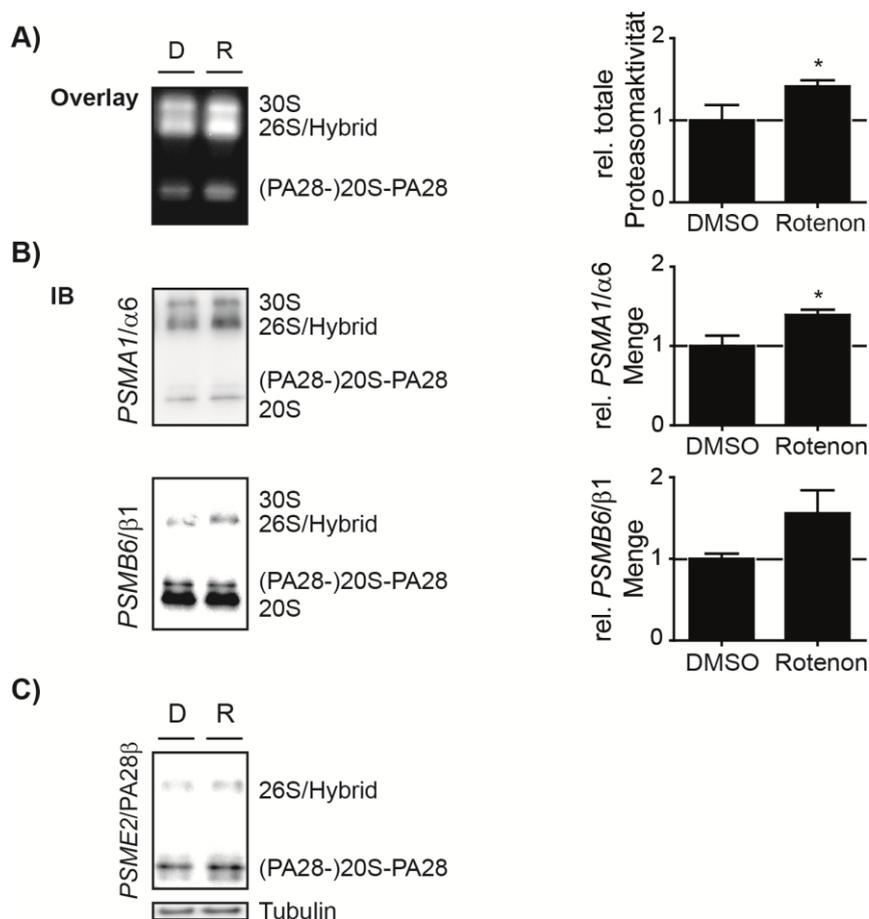


Abb. 3.22: Rotenon induziert die Neubildung aktiver Proteasomkomplexe. SH-SY5Y Zellen wurden mit 100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO für 8 h behandelt. Anschließend wurden die Proteasomkomplexe unter nativen Bedingungen aufgetrennt. **(A)** Die folgende Aktivitätsmessung im Gel („Overlay“) wurde unter Verwendung des fluorogenen Peptids Suc-LLVY-AMC durchgeführt. Die Proteasomaktivität dreier unabhängiger Experimente wurde densitometrisch bestimmt und ist rechts neben dem NATIV Gel dargestellt (Mittelwert \pm S.D., $n=3$) **(B)** Im Anschluss wurden die Komplexe mittels Immunoblot mit einem Antikörper gegen *PSMA1/α6* und *PSMB6/β1* analysiert. Die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung dreier ($\alpha6$) oder zweier ($\beta1$) unabhängiger Experimente ist rechts neben den Immunoblots dargestellt. **(C)** Zusätzlich erfolgte ein Immunoblot gegen *PSME2/PA28β*. (*: $p<0,05$)

Da die Expression der proteasomalen Gene durch Rotenon induziert wird, wurde im Folgenden mittels ChIP untersucht, ob TCF11/Nrf1 unter diesen Bedingungen an deren Promotoren bindet. In den Präzipitaten des TCF11/Nrf1-Chromatin-Komplexes konnte das ARE-17 Motiv des Promotors der *PSMB6/β1* Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 3.23). In Rotenon-behandelten Zellen war zudem eine höhere Menge der Sequenz im Präzipitat vorhanden. Des Weiteren war in dem TCF11/Nrf1-Präzipitat Rotenon-behandelter Zellen auch das ARE-45 Motiv der *PSMA3/α7* Untereinheit detektierbar, aber nicht in Kontrollzellen. Demnach verstärkt der Komplex I Inhibitor die Bindung von TCF11/Nrf1 an die regulatorischen ARE Motive seiner Zielgene und fördert dadurch vermutlich deren Expression.

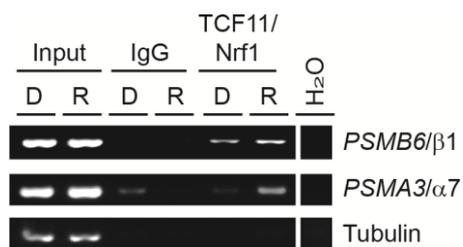


Abb. 3.23: TCF11/Nrf1 bindet an die Promotoren proteasomaler Untereinheiten in Antwort auf Rotenon. SH-SY5Y Zellen wurden für 3 h mit 100 nM Rotenon (R) bzw. 0,1 % DMSO (D) behandelt. Die Bindung von TCF11/Nrf1 an den *PSMB6/β1* und *PSMA3/α7* Promotor wurde mittels ChIP untersucht. Hierzu wurden die Proteine mit der DNA fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen TCF11/Nrf1 oder einer unspezifischen IgG Kontrolle präzipitiert. Nachdem die DNA von den Proteinen abgetrennt wurde, erfolgte eine PCR mit spezifischen Primern gegen die ARE-17 Sequenz im *PSMB6/β1* Promotor oder die ARE-45 Sequenz im *PSMA3/α7* Promotor. Als Negativkontrolle dienten Primer gegen eine Sequenz des β -Tubulin Promotors.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass TCF11/Nrf1 in Antwort auf Rotenon-induzierten Stress die Expression proteasomaler Untereinheiten aktiviert, wurden im Folgenden siRNA Experimente durchgeführt. Zunächst wurde die Abhängigkeit der Stress-induzierten *PSMB6/β1* Promotoraktivierung von TCF11/Nrf1 überprüft. Hierzu wurde die TCF11/Nrf1 Menge in SH-SY5Y Zellen durch Transfektion einer spezifischen siRNA depletiert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit der Kontroll-siRNA. Die TCF11/Nrf1-depletierten Zellen sowie Kontrollzellen wurden mit dem pCAT1500 Reportergenkonstrukt transfiziert und am Folgetag mit Rotenon oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die Bestimmung der CAT-Konzentration Rotenon-behandelter Zellen relativ zu den DMSO-Kontrollen ergab einen Rotenon-induzierten Anstieg der Promotoraktivität von etwa 35 % in Anwesenheit von TCF11/Nrf1 (Abb. 3.24 A). Eine Verminderung der TCF11/Nrf1 Menge verhinderte die Induktion des *PSMB6/β1* Promotors durch Rotenon. Dies weist darauf hin, dass die Transkription der proteasomalen Untereinheiten abhängig von diesem Transkriptionsfaktor ist. Um die Vermutung weiter zu bekräftigen, wurden TCF11/Nrf1-depletierte Zellen sowie Kontrollzellen mit Rotenon oder DMSO behandelt und anschließend die endogene Expression von TCF11/Nrf1 als Kontrolle für die Depletion, der beiden 20S Untereinheiten *PSMA2/α2* und *PSMB6/β1* sowie der 19S Untereinheit *PSMC4/Rpt3* mittels Real-Time PCR bestimmt (Abb. 3.24 B,C). Rotenon erhöhte die Expression der Untereinheiten signifikant um das etwa 1,5 bis 2 fache. In TCF11/Nrf1-depletierten Zellen war die Rotenon-induzierte Transkription der Untereinheiten verringert (Abb. 3.24 C). Jedoch verhindert die verminderte TCF11/Nrf1 Expression nicht vollständig die Zunahme der Transkription der proteasomalen Untereinheiten. Ein Grund hierfür kann sein, dass durch die spezifische siRNA die TCF11/Nrf1 Menge um etwa 70% und demnach nicht vollständig verringert wurde (Abb. 3.24 B).

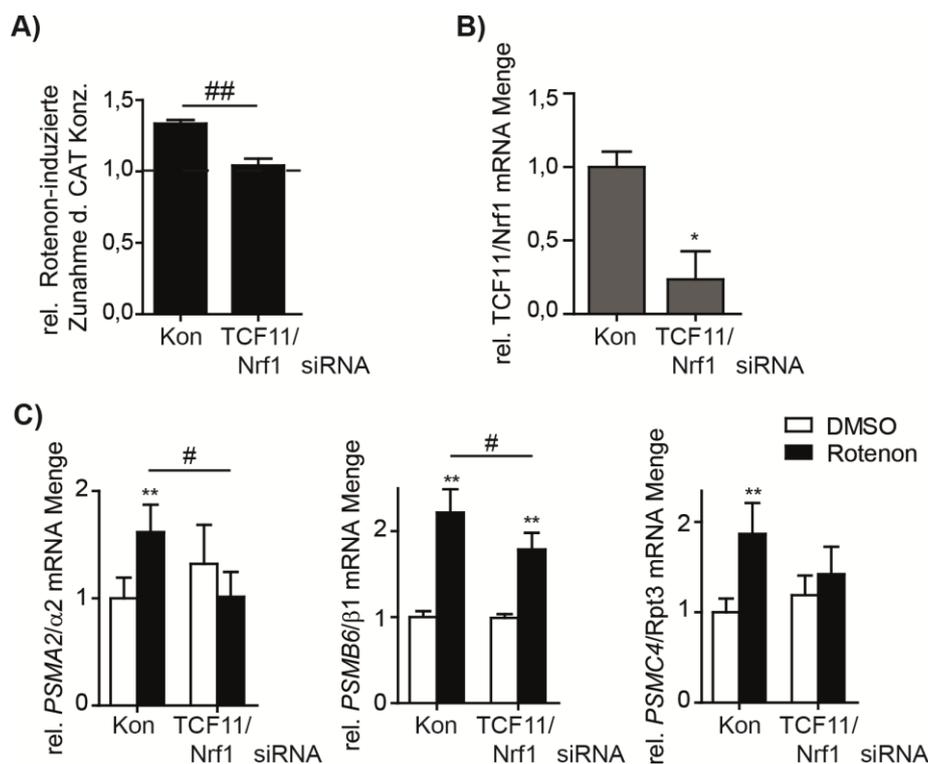


Abb. 3.24: Die Rotenon-induzierte Proteasomexpression ist abhängig von TCF11/Nrf1. SH-SY5Y Zellen wurden mit siRNA gegen TCF11/Nrf1 oder Kontroll (Kon) siRNA transfiziert. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO. **(A)** 24 h nach der siRNA Zugabe erfolgte die Transfektion des pCAT1500 Repotergenkonstrukts und pcDNA3.1-lacZ. Am Folgetag wurden die Zellen für 4 h mit Rotenon behandelt. Die CAT-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und auf die β -Galaktosidaseaktivität normiert. Dargestellt ist die gemittelte CAT Konzentration relativ zu der entsprechenden DMSO Kontrolle \pm S.D. von sechs biologischen Replikaten aus drei unabhängigen Experimenten. **(B,C)** Während der letzten 16-18 h der 48 stündigen siRNA Behandlung wurden die Zellen in Gegenwart von Rotenon kultiviert. Die mRNA Menge von TCF11/Nrf1 **(B)**, *PSMA2/α2*, *PSMB6/β1* und *PSMC4/Rpt3* **(C)** wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm S.D. relativ zu der Kontrolle (Kon/DMSO) von vier unabhängigen Experimenten. (#/*: $p < 0,05$; ##/**: $p < 0,005$)

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die verminderte Transkription der proteasomalen Untereinheiten auch auf die Translation und Assemblierung proteasomaler Komplexe auswirkt. Nach der [35 S] Markierung der SH-SY5Y Zellen wurden neu gebildete Proteasomkomplexe mit einem spezifischen Antikörper gegen die 20S Untereinheit *PSMA1/α6* präzipitiert. Die Analyse der präzipitierten Komplexe zeigte, dass die Rotenon-induzierte Transkriptionszunahme auch in einer erhöhten Synthese und Neubildung proteasomaler Komplexe von etwa 30 % resultiert (Abb. 3.25 A). Zudem wurde die Induktion durch Verminderung der TCF11/Nrf1 Expression signifikant verringert. Die Effizienz der siRNA Behandlung wurde mittels RT-PCR überprüft und ergab eine Abnahme der TCF11/Nrf1 mRNA Menge (Abb. 3.25 B).

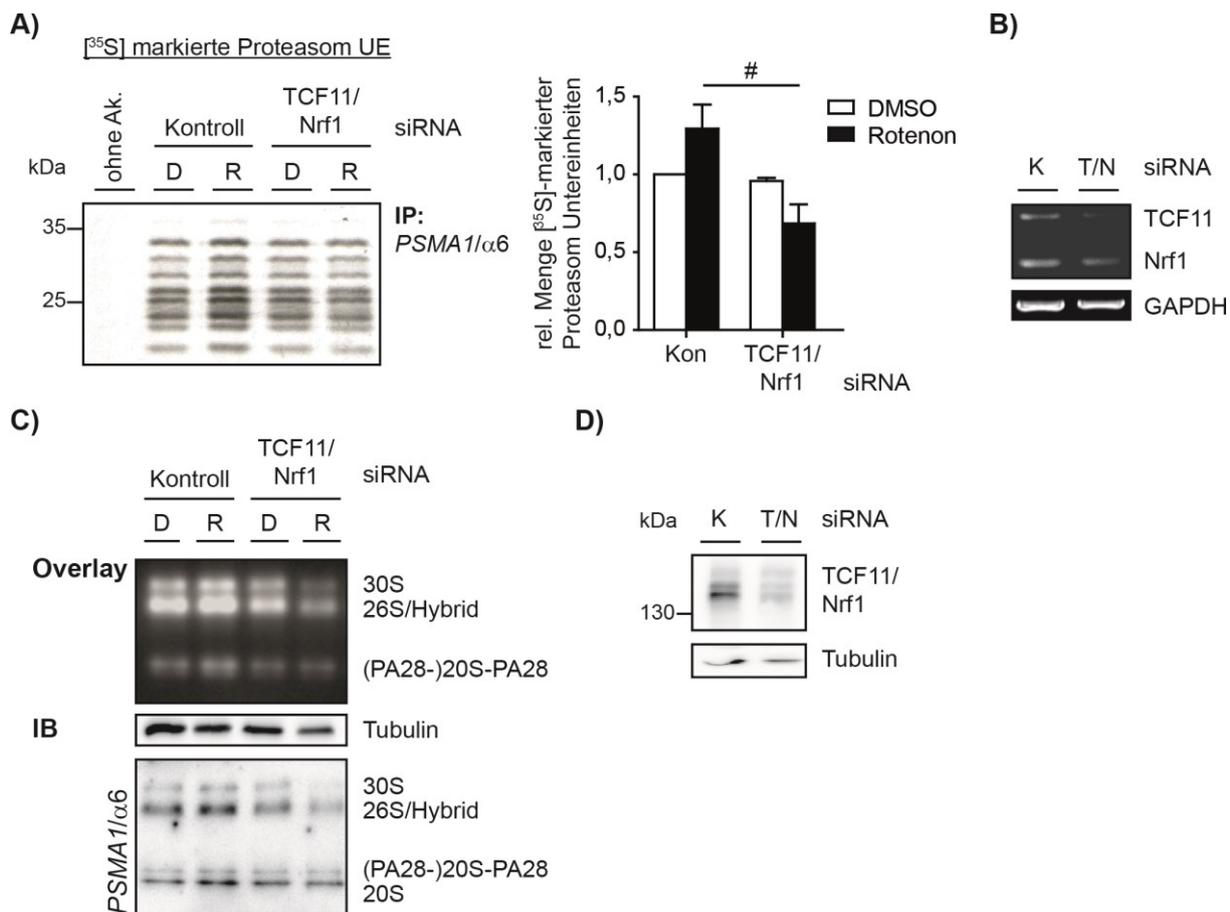


Abb. 3.25: Die Rotenon-induzierte Proteasomexpression ist abhängig von TCF11/Nrf1. SH-SY5Y Zellen wurden mit siRNA gegen TCF11/Nrf1 (T/N) oder Kontroll (Kon, K) siRNA transfiziert. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 100 nM Rotenon (R) oder 0,1 % DMSO (D). **(A)** TCF11/Nrf1-depletierte oder Kontrollzellen wurden für 20 h mit Rotenon behandelt und zum Schluss mit [³⁵S]-Methionin/[³⁵S]-Cystein metabolisch markiert. Anschließend wurde der 20S Komplex mit einem spezifischen Antikörper gegen *PSMA1/α6* präzipitiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie. Die relative Menge markierter Untereinheiten normiert auf das Inputsignal ± S.D. von drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch bestimmt und ist rechts neben dem Autoradiogramm dargestellt. **(B)** Die siRNA Effizienz wurde mittels PCR mit spezifischen Primern gegen TCF11/Nrf1 überprüft. **(C)** Die Zellen wurden für 8 h mit Rotenon behandelt. Die Proteasomkomplexe wurden in einem NATIV-Gel aufgetrennt und die Aktivität im Gel („Overlay“) mit dem fluorogenen Peptid Suc-LLVY-AMC gemessen. Im Anschluss wurden die Komplexe mittels *PSMA1/α6* Immunoblot analysiert. **(D)** Die siRNA Effizienz wurde durch Auftrennung der Lysate mittels SDS-PAGE und einem TCF11/Nrf1 Immunoblot überprüft. Tubulin diente als Ladekontrolle. (#: p<0,05)

Um zu überprüfen ob die Stress-induzierte Neubildung proteasomaler Komplexe sich auch in einem Anstieg proteolytisch aktiver Komplexe widerspiegelt, wurde die Proteasomaktivität von Rotenon-behandelten TCF11/Nrf1-depletierten Zellen oder Kontrollzellen bestimmt. Analog zu den vorangegangenen Untersuchungen führte die Rotenonbehandlung zu einem Anstieg der Proteasomaktivität sowie der Menge proteasomaler Komplexe in Kontrollzellen (Abb. 3.25 C). Eine verminderte TCF11/Nrf1 Expression hingegen, die mittels Immunoblot überprüft wurde (Abb. 3.25 D), verringerte die Stress-induzierte Proteasomaktivität und Menge proteasomaler Komplexe.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass TCF11/Nrf1 die Proteasomexpression in Antwort auf Rotenon-induzierten Stress in SH-SY5Y Zellen aktiviert.

3.2.3.4. Nrf2 ist neben TCF11/Nrf1 an der Regulation der Rotenon-induzierten Expression proteasomaler Untereinheiten beteiligt

Nrf2 ist der Hauptregulator einer Vielzahl antioxidativer, ARE-gesteuerter Gene in Antwort auf oxidativen Stress (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014). Zudem wurde eine Nrf2-vermittelte Induktion proteasomaler Untereinheiten in Antwort auf die indirekten Antioxidantien Sulforaphan und 1,2-Dithiol-3-thion beschrieben (Kwak et al., 2003a; Kwak et al., 2003b). Andererseits zeigten Ergebnisse vorangegangener Studien unserer Arbeitsgruppe sowie dieser Arbeit, dass die Epoxomicin-induzierte Proteasomexpression unabhängig von Nrf2 ist (Abb. 3.9; (Steffen et al., 2010)).

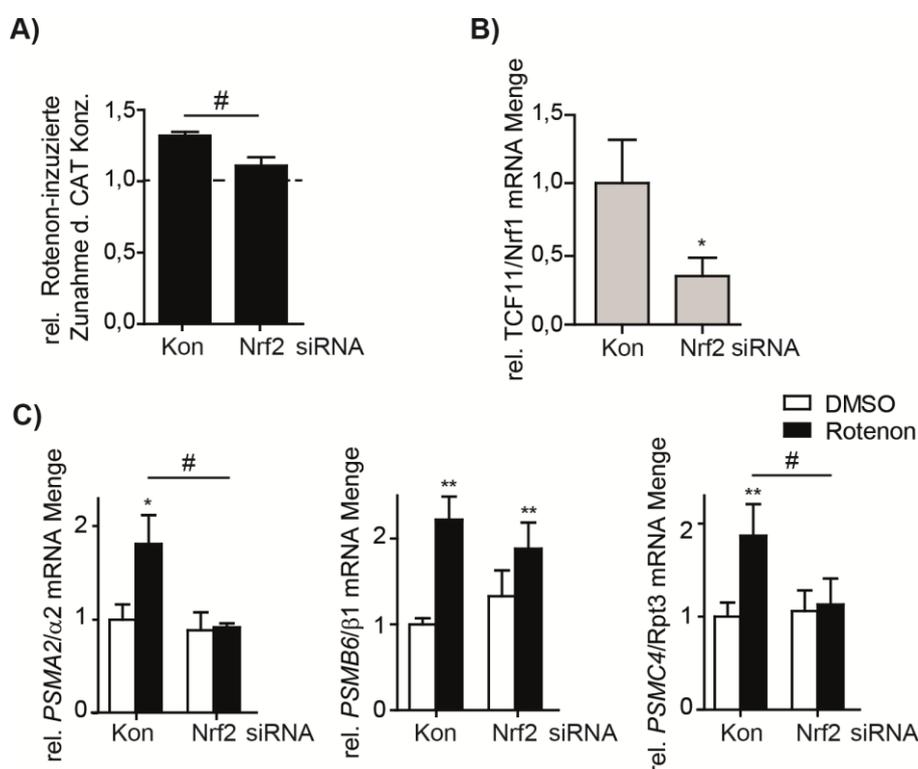


Abb. 3.26: Die Rotenon-induzierte Proteasomexpression ist auch abhängig von Nrf2. SH-SY5Y Zellen wurden mit siRNA gegen Nrf2 oder Kontroll (Kon) siRNA transfiziert. **(A)** 24 h nach der siRNA Zugabe erfolgte die Transfektion mit dem *PSMB6/β1* Promotor-enthaltenden pCAT1500 Konstrukt und pcDNA3.1-lacZ. Am Folgetag wurden die Zellen für 4 h mit 100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO behandelt. Die CAT Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt und auf die β-Galaktosidaseaktivität normiert. Dargestellt ist die gemittelte CAT Konzentration relativ zu der entsprechenden DMSO Kontrolle ± S.D. von sechs biologischen Replikaten aus drei unabhängigen Experimenten. **(B,C)** Während der letzten 16-18 h der 48 stündigen siRNA Behandlung wurden die SH-SY5Y Zellen mit 100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO behandelt. Die mRNA Menge von *PSMA2/α2*, *PSMB6/β1*, *PSMC4/Rpt3* **(C)** und Nrf2 **(B)** wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± S.D. relativ zu der Kontrolle (Kon/DMSO) von drei (*PSMA2/α2*, Nrf2) oder vier (*PSMB6/β1*, *PSMC4/Rpt3*) unabhängigen Experimenten. (*/#: p<0,05; **: p<0,005)

Um zu klären, ob Nrf2 die Rotenon-vermittelte Expressionszunahme des Proteasoms beeinflusst, wurden siRNA Experimente durchgeführt. Eine Depletion der Nrf2 Expression resultierte in einer signifikanten Minderung der Rotenon-induzierten *PSMB6/β1* Promotoraktivität (Abb. 3.26 A). Die Depletion von Nrf2 wurde mittels Real-Time PCR kontrolliert und ergab eine Reduktion von etwa 65 % (Abb. 3.26 B). Analog zu dem

Reporterassay zeigte auch die Untersuchung der Expression der *PSMA2/α2* und *PSMC4/Rpt3* Untereinheiten eine signifikante Verringerung der etwa 2 fachen Rotenon-abhängigen Induktion. Allerdings war im Fall der *PSMB6/β1* Untereinheit nur ein Trend der Induktionsabnahme zu erkennen (Abb. 3.26 C). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Transkription der proteasomalen Untereinheiten in Antwort auf Rotenonbehandlung neben TCF11/Nrf1 auch von Nrf2 reguliert wird.

3.2.3.5. *Eine lang andauernde Rotenonbehandlung führt zu der Abnahme der TCF11/Nrf1 Proteinmenge*

Die bisherigen Untersuchungen ergaben, dass TCF11/Nrf1 nach einer etwa zwei- bis vierstündigen Behandlungsdauer mit Rotenon aktiviert und in den Nukleus transferiert wird. Hier bindet der Transkriptionsfaktor an die regulatorischen ARE Motive der Promotoren der proteasomalen Untereinheiten und induziert dadurch deren Transkription (siehe Kapitel 3.2.3.2 und 3.2.3.3). Ob eine länger andauernde Exposition der Zellen mit dem Komplex I Inhibitor zu einer verstärkten TCF11/Nrf1 Aktivierung führt, wurde im Folgenden untersucht. Hierzu wurden SH-SY5Y Zellen mit 100 bis 500 nM Rotenon für 18 h behandelt und anschließend die TCF11/Nrf1 Proteinmenge mittels Immunoblot analysiert (Abb. 3.27 A). Dieser zeigte eine Abnahme von TCF11/Nrf1 in Rotenon-behandelten Zellen. Die Reduktion der Proteinmenge kann seine Ursache in einem verstärkten Proteinabbau, einer verringerten Transkription oder Translation haben. Diese verschiedenen Möglichkeiten sollten im Folgenden überprüft werden.

Ob die Abnahme der Proteinmenge auf einem verstärkten Abbau beruht, wurde mit Hilfe eines Cycloheximid-Abbau-Experiments untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit Rotenon oder DMSO behandelt und anschließend die Translation für 0 bis 30 min mit Cycloheximid inhibiert (Abb. 3.27 B). Die densitometrische Auswertung des Immunoblots zeigte, dass die TCF11/Nrf1 Abbaurate Rotenon-behandelter Zellen nicht verringert war. Eher war im Vergleich zu den Kontrollzellen eine leichte Stabilisierung des Transkriptionsfaktors zu erkennen. Dennoch war die TCF11/Nrf1 Menge in Rotenon-behandelten Zellen schon zum Zeitpunkt Null geringer als in den Kontrollzellen.

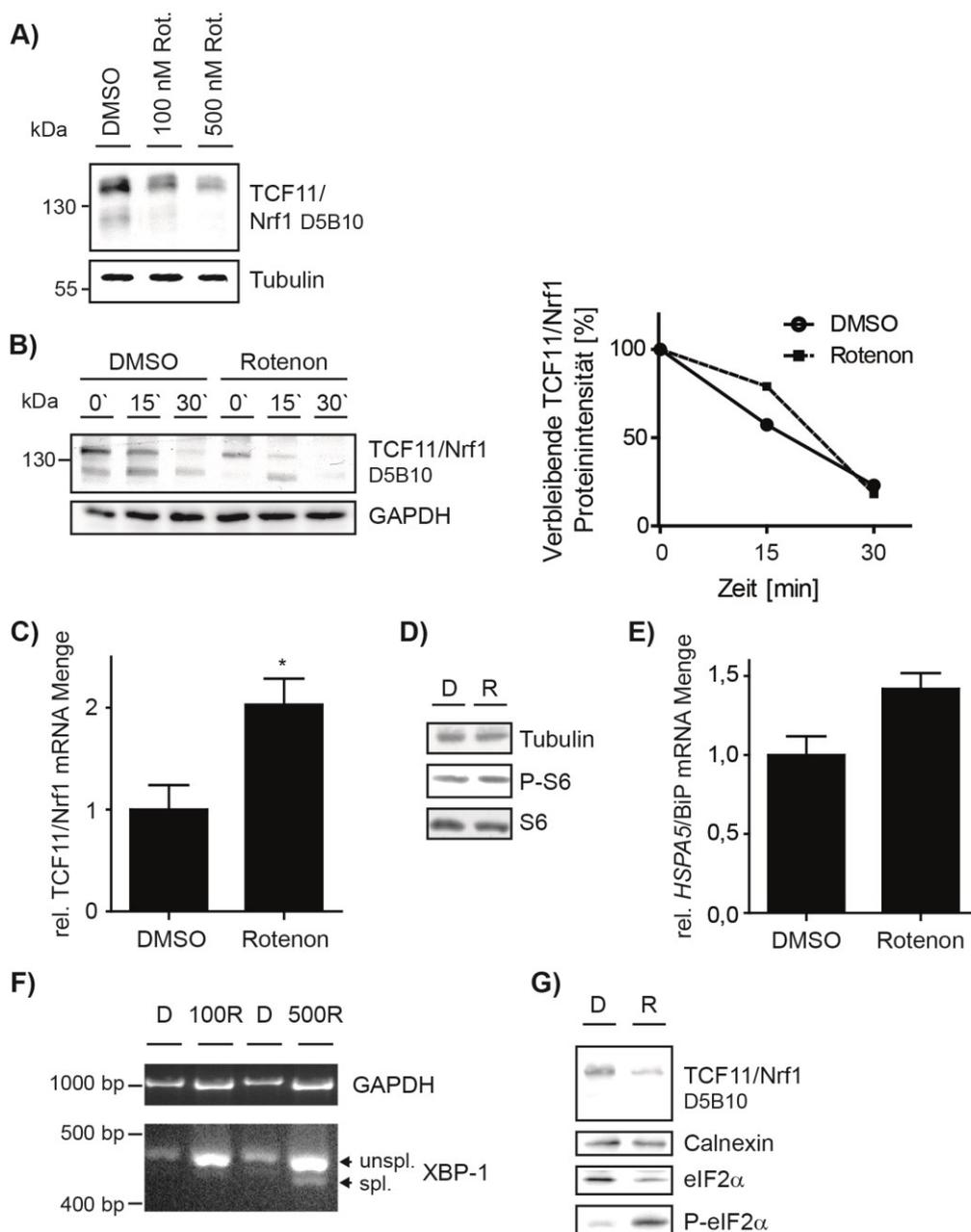


Abb. 3.27: Rotenon induzierter ER-Stress vermittelt die Abnahme der TCF11/Nrf1 Translation. (A) SH-SY5Y Zellen wurden für 18 h mit 100 -500 nM Rotenon (Rot.) oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Proteinmenge von TCF11/Nrf1 wurde anschließend mittels Immunoblot analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) Zur Bestimmung der Abbaurates wurden SH-SY5Y Zellen für 18 h mit 100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO behandelt und dann für 0-30 min in Gegenwart von 50 µg/ml Cycloheximid (CHX) kultiviert. Die TCF11/Nrf1 Proteinmenge wurde mittels Immunoblot und densitometrischer Analyse ausgewertet. Dargestellt ist die verbleibende TCF11/Nrf1 Proteinmenge normiert zu GAPDH. (C, E) SH-SY5Y Zellen wurden für 18 h mit 100 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO behandelt. Die mRNA Menge von TCF11/Nrf1 oder HSPA5/BiP wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und auf die HPRT1 Menge normiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± S.D. relativ zu der DMSO Kontrolle von drei (C) bzw. zwei (E) unabhängigen Experimenten. (D) SH-SY5Y Zellen wurden für 18 h mit 100 nM Rotenon (R) oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Die Proteinmenge von S6 und P-S6 wurde anschließend mittels Immunoblot analysiert. Tubulin diente als Ladekontrolle. (F) SH-SY5Y Zellen wurden für 48 h mit 100 nM-500 nM Rotenon (R) oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Anschließend erfolgte eine PCR unter Verwendung von spezifischen Primern, die sowohl die ungespleißte als auch die gespleißte Form des XBP-1 Faktors erkennen. Spezifische Primer gegen GAPDH dienten als Kontrolle. (G) SH-SY5Y Zellen wurden für 48 h mit 100 nM Rotenon (R) oder 0,1 % DMSO (D) behandelt. Im Anschluss wurde die Proteinmenge von eIF2α, P-eIF2α und TCF11/Nrf1 mittels Immunoblot analysiert. Hierbei diente Calnexin als Ladekontrolle. (*: p<0,05)

Da der Komplex I Inhibitor nicht die Stabilität von TCF11/Nrf1 beeinflusst, lag die Vermutung nahe, dass die Synthese des Faktors verringert ist. Um dies zu überprüfen wurde zunächst die Expression mittels Real-Time PCR untersucht. Überraschenderweise zeigte sich eine 2 fache Zunahme der TCF11/Nrf1 mRNA Menge in Rotenon-behandelten Zellen (Abb. 3.27 C). Zusammengenommen deuten die mRNA Zunahme und gleichzeitige Abbau-unabhängige Abnahme der Proteinmenge auf eine reduzierte Translation hin. Rotenon hemmt durch Inhibition der Atmungskette die Bildung von ATP und ein Mangel an ATP wiederum inhibiert die mTOR-vermittelte Proteinsynthese (Dennis et al., 2001). Um zu untersuchen, ob die Translation durch Rotenon beeinflusst wird, wurde im Folgenden die mTOR-abhängigen Phosphorylierung der ribosomalen Untereinheit S6 betrachtet. Der Immunoblot zeigte keine Änderung der translationsfördernden S6 Phosphorylierung in Rotenon-behandelten Zellen (Abb. 3.27 D). Somit lässt sich eine verringerte mTOR-vermittelte Proteintranslation unter vorliegenden Bedingungen in SH-SY5Y Zellen ausschließen.

Ein weiterer Effekt einer Rotenonbehandlung ist zellulärer ER-Stress und folglich die Aktivierung der UPR (Chen et al., 2008). Um zu untersuchen, ob die Rotenonbehandlung ER-Stress in SH-SY5Y Zellen induziert, wurden zunächst die *HSPA5*/BiP sowie die XBP-1 Expression analysiert (Abb. 3.27 E). Die Rotenonbehandlung resultierte in einer etwa 40 %igen Zunahme der *HSPA5*/BiP Expression. Ebenfalls war ein Rotenon-abhängiger Anstieg der XBP-1 Transkription zu erkennen. Zusätzlich wurde bei einer Rotenonkonzentration von 500 nM auch die gespleißte XBP-1 Form detektiert. Neben der Aktivierung molekularer Chaperone und ERAD Komponenten vermittelt die UPR die Reduktion der Proteinsynthese über die Phosphorylierung von eIF2 α (siehe Kapitel 1.2.2; (Harding et al., 2000b)). In Rotenon-behandelten SH-SY5Y Zellen war eine Zunahme des phosphorylierten eIF2 α und gleichzeitig eine Abnahme von TCF11/Nrf1 zu erkennen (Abb. 3.27 E). Diese Daten lassen vermuten, dass die Hemmung der Proteinsynthese durch eine Rotenon-vermittelte eIF2 α Phosphorylierung die Proteinmenge des kurzlebigen Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 verringert.

3.2.3.6. *TCF11/Nrf1 schützt vor Rotenon-induziertem Zelltod*

Aus den vorangegangenen Experimenten ergibt sich die Frage, ob die frühe Aktivierung von TCF11/Nrf1 einen Teil der zytoprotektiven Stressantwort darstellt. Hierzu wurde untersucht ob der Faktor die Zellviabilität Rotenon-behandelter Zellen beeinflusst.

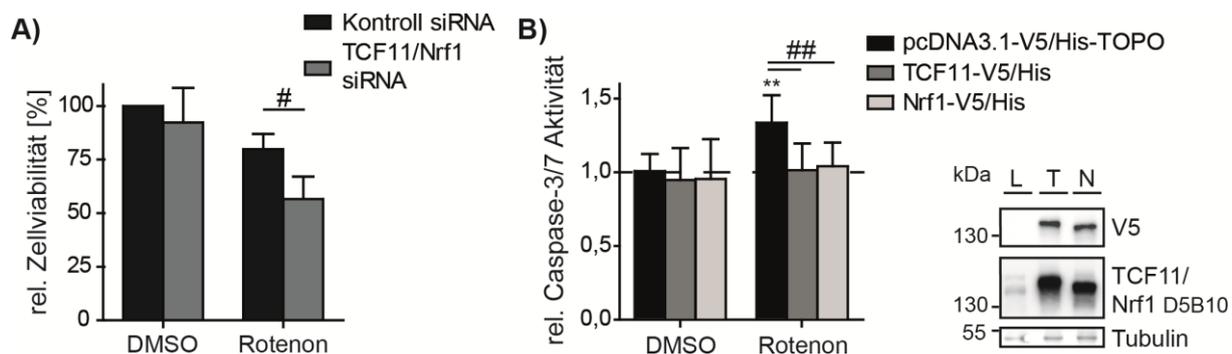


Abb. 3.28: TCF11/Nrf1 schützt vor Rotenon-induziertem Zelltod. (A) SH-SY5Y Zellen wurden mit siRNA gegen TCF11/Nrf1 oder Kontroll (Kon)-siRNA transfiziert. Am Folgetag wurde die 20 stündige Behandlung der Zellen mit 1 nM Rotenon oder 0,1 % DMSO gestartet. Die Zellviabilität wurde im Anschluss mittels XTT Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte relativ zu den Kontrollzellen (Kontroll-siRNA + DMSO) \pm S.D. aus drei unabhängigen Experimenten. (B) SH-SY5Y Zellen wurden mit dem Expressionsvektor TCF11-V5/His (T), Nrf1-V5/His (N) oder dem Leervektor pcDNA3.1-V5/His-TOPO (L) transfiziert und für 24 h mit 10 μ M Rotenon oder DMSO behandelt. Anschließend wurde die Caspase-3/7 Aktivität bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.D. relativ zu den Kontrollzellen (Leervektor + DMSO) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Expression von TCF11-V5/His und Nrf1-V5/His wurde mittels Immunoblot überprüft. (#: $p < 0,05$; **/###: $p < 0,005$)

Eine Verringerung der TCF11/Nrf1 Expression erhöhte die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Pro-Oxidans Rotenon. Verdeutlicht wurde dies durch die signifikante Reduktion der Viabilität Rotenon-behandelter Zellen von etwa 80 % in Kontrollzellen auf etwa 57 % in TCF11/Nrf1-depletierten Zellen (Abb. 3.28 A). Die TCF11/Nrf1 Depletion beeinflusste die Zellviabilität unter DMSO Kontrollbedingungen dagegen nur marginal. Umgekehrt schützte die Überexpression der V5-markierten Isoformen TCF11 sowie Nrf1 die Zelle vor Rotenon-induzierter Apoptose. So steigerte Rotenon die Caspase-3/7 Aktivität zwar in Kontrollzellen um etwa 33 %, aber nicht in Zellen, die TCF11 oder Nrf1 überexprimierten (Abb. 3.28 B). Unter DMSO Kontrollbedingungen war die Caspase-3/7 in TCF11- und Nrf1-exprimierenden Zellen kaum verändert. Die Überexpression der Isoformen wurde mit einem spezifischen Antikörper entweder gegen den V5-Tag oder gegen TCF11/Nrf1 bestätigt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass TCF11/Nrf1 in der Antwort auf Rotenon-induzierten zellulären Stress von relevanter Bedeutung ist. Hierbei beruht die zytoprotektive Eigenschaft des Transkriptionsfaktors zumindest teilweise auf einer Regulation der Anpassung des Proteasomsystems an eine steigende Nachfrage proteolytischer, proteasomaler Aktivität unter Stressbedingungen.

4. Diskussion

4.1. Ein autoregulatorischer Rückkopplungsmechanismus gewährleistet die Aufrechterhaltung der Proteasom Homöostase in verschiedenen Zelltypen

Der zelluläre Bedarf an proteasomaler Aktivität ist ein dynamischer Zustand, der durch endogene Prozesse sowie exogene Stimuli beeinflusst wird. Die Anpassung der proteasomalen Aktivität an die schwankende Nachfrage erfordert eine feinabgestimmte Regulation der proteasomalen Genexpression, Komposition und Assemblierung des Proteasoms (siehe Kapitel 1.1.2 bis 1.1.4. und 1.3). Wie frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, stellt der Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 den Hauptregulator des adaptiven Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Proteasom Homöostase dar (Radhakrishnan et al., 2010; Steffen et al., 2010). Diese publizierten Daten konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt und erweitert werden (Abb. 3.1 bis Abb. 3.9 und Abb. 4.1).

So konnte gezeigt werden, dass TCF11/Nrf1 in verschiedenen Zelllinien unter stressfreien Bedingungen in der ER-Membran lokalisiert (Abb. 3.1 B, Abb. 3.8 A; (Steffen et al., 2010; Wang and Chan, 2006; Zhang et al., 2006)), hier dem ERAD-vermittelten Proteinabbau zugeführt und zügig proteasomal abgebaut wird (Abb. 3.2 A und schematisch in Abb. 4.1 A; (Steffen et al., 2010; Wang and Chan, 2006; Zhang et al., 2006)). Die Hemmung der proteasomalen Aktivität durch Inhibitoren resultierte in einer Stabilisierung und nukleären Lokalisation von TCF11/Nrf1 (Abb. 3.1, Abb. 3.2 A, Abb. 3.3 und Abb. 3.8 A). Im Nukleus angekommen, bindet der Transkriptionsfaktor, wie bereits in EA.hy926 Zellen gezeigt wurde (Steffen et al., 2010), auch in den neuronalen SH-SY5Y Zellen an die regulatorischen ARE Motive der Promotoren der proteasomalen Untereinheiten und induziert dadurch deren Transkription (Abb. 3.4, Abb. 3.7. A, B, Abb. 3.8 B und Abb. 3.9). Die Induktion der Genexpression durch Proteasominhibition resultiert schließlich in einer Zunahme proteasomaler Untereinheiten und folglich der Proteasomkomplexe (Abb. 3.3, Abb. 3.7 C und schematisch in Abb. 4.1 B). Wie bereits frühere Untersuchungen unserer Gruppe zeigten, handelt es sich hierbei um frisch assemblierte Komplexe (Meiners et al., 2003; Steffen et al., 2010). Außerdem ergaben Experimente, in denen TCF11/Nrf1 überexprimiert wurde, dass diese neu gebildeten Proteasomkomplexe proteolytisch aktiv sind (Steffen et al., 2010). Neben den proteasomalen Untereinheiten werden auch weitere Gene der UPS-abhängigen Abbaumaschinerie TCF11/Nrf1-abhängig hochreguliert (Steffen et al., 2010).

Zusätzlich zu der Verringerung der proteasomalen Aktivität durch Proteasominhibition führte eine Aktivitätsabnahme durch Depletion der 19S Untereinheit *PSMD4/Rpn10* oder der 20S Untereinheit *PSMB4/β7* ebenfalls zu einer Stabilisierung von TCF11/Nrf1 (Abb. 3.10 B). Zudem wurde unter diesen Bedingungen eine Induktion der Expression proteasomaler Gene

beobachtet (Abb. 3.10 A und Abb. 3.11). Die Aktivierung des autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus nach Verringerung der proteasomalen Aktivität durch RNAi wurde bereits in *Drosophila* beobachtet (Wojcik and DeMartino, 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass die TCF11/Nrf1-abhängige Proteasomexpression grundsätzlich durch Hemmung des UPS-vermittelten Proteinabbaus induziert wird.

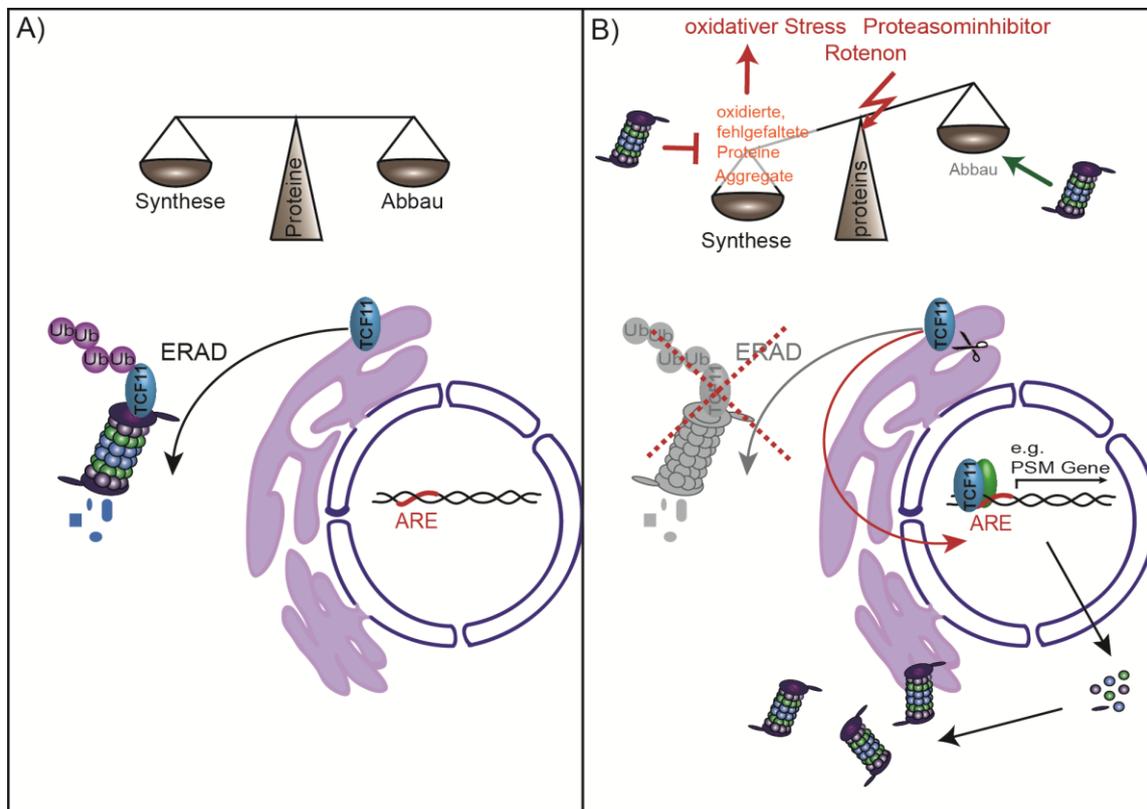


Abb. 4.1: Regulation der TCF11/Nrf1-abhängigen Expression proteasomaler Gene. (A) Wird die proteasomale Aktivität den zellulären proteolytischen Bedarf gerecht, herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Proteinsynthese und dem Proteinabbau. Unter diesen Bedingungen lokalisiert TCF11/Nrf1 in der ER-Membran und wird zügig ERAD-abhängig abgebaut. (B) Eine Störung der Protein Homöostase, beispielsweise durch Proteasominhibitoren, hat zur Folge, dass proteasomale Substrate, wie oxidierte oder fehlgefaltete Proteine nicht mehr abgebaut werden und folglich akkumulieren. Die Anreicherung oxidierten Proteine führt wiederum zu oxidativen Stress, z.B.: induziert durch Rotenon, führt zu vermehrter Oxidation von Proteinen und infolgedessen zu einer Imbalance der Protein Homöostase. Unter diesen Bedingungen, wird TCF11/Nrf1 aktiviert und in den Nucleus transferiert. Hier bindet der Transkriptionsfaktor an die ARE Motive in den Promotoren der proteasomalen Gene (PSM Gene). Dadurch aktiviert er deren Genexpression und somit die Neubildung aktiver Proteasomkomplexe. Dies hat letztlich eine Zunahme der Proteasomaktivität zur Folge, die den steigenden proteolytischen Bedarf kompensiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren ferner, dass der adaptive Regulationsmechanismus einen generellen, kompensatorischen Mechanismus in Mammalia darstellt. So konnte eine Stabilisierung von TCF11/Nrf1 sowie die Induktion der Genexpression proteasomaler Untereinheiten in verschiedenen Zelllinien beobachtet werden (Abb. 3.1 und Abb. 3.4 A), darunter die schon in früheren Untersuchungen verwendete Endothelzelllinie EA.hy926, die epitheliale Zervixkarzinomzelllinie HeLa und die Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y. In unterschiedlichen Studien der letzten Jahre wurde ebenfalls die Proteasominhibitor-induzierte Proteasomexpression in unterschiedlichen

Zelltypen charakterisiert, beispielsweise in einer humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie (Balasubramanian et al., 2012), in Maus-Hepatozyten (Lee et al., 2013), in humanen Prostatakrebszelllinien oder in embryonalen Mausfibroblasten (Radhakrishnan et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Krebszelllinien HeLa und SH-SY5Y eine geringere relative Induzierbarkeit der Expression proteasomaler Untereinheiten im Vergleich zu den EA.hy926 Zellen aufweisen (Abb. 3.4 A). Die EA.hy926 Zellen sind Hybridzellen aus primäreren Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 und weisen Eigenschaften von differenzierten Endothelzellen auf. Ähnliche Beobachtungen machten zuvor Meiners und Kollegen. Sie beschrieben eine Zunahme der Proteasomexpression in primären Gefäßmuskelzellen, aber eine vergleichsweise geringe Aktivierung der Expression in HeLa Zellen (Meiners et al., 2003). Tumorzellen sind empfindlicher gegenüber Proteasominhibitoren als gesunde Zellen. So findet auch der Proteasominhibitor Bortezomib Anwendung in der Behandlung des multiplen Myeloms (Adams, 2004). Die höhere Toxizität von Proteasominhibitoren in Krebszellen beruht vermutlich teilweise auf einer Störung des Zellzyklus und dem Verhältnis zwischen anti- und pro-apoptotischen Proteinen (Kisselev and Goldberg, 2001). Möglicherweise trägt auch die verminderte Anpassungsfähigkeit des Proteasomsystems zu der höheren Sensitivität der Krebszellen bei. Da TCF11/Nrf1 als Regulator der Proteasomexpression die Zelle vor Proteasominhibitor-induzierten Zelltod schützt (Radhakrishnan et al., 2010; Steffen et al., 2010), ist ein besseres Verständnis des Aktivierungsmechanismus des Transkriptionsfaktors von Interesse für die Krebstherapie.

Neben dem nukleären Transfer stellt die Deglykosylierung und proteolytische Prozessierung von TCF11/Nrf1 einen Teil der Aktivierungskaskade dar (Steffen et al., 2010). Wie Ergebnisse des Cycloheximid-Abbau-Experiments zeigten, nimmt die glykosylierte, unprozessierte, hochmolekulare TCF11/Nrf1 Form nach proteasomaler Inhibition langsam ab, aber nicht die niedermolekulare Form (Abb. 3.2 A). Radhakrishnan und Kollegen beobachteten ebenfalls die Abnahme der hochmolekularen Form in ihren Abbauxperimenten (Radhakrishnan et al., 2014). Der Grund hierfür ist, dass nach Hemmung des Proteasoms der Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 durch eine limitierte Proteolyse prozessiert wird. Zudem identifizierten Radhakrishnan und Kollegen die Schnittstelle der proteolytischen Prozessierung nach dem Tryptophanrest an Position 103. Bevor die proteolytische Prozessierung stattfindet, wird das Membranprotein abhängig von der AAA-ATPase VCP/p97 aus der Membran transloziert (Radhakrishnan et al., 2014; Sha and Goldberg, 2014). In Experimenten dieser Arbeit wurde die deglykosylierte, prozessierte Form sowohl nach Proteasominhibition als auch nach Depletion einer proteasomalen 26S Untereinheit beobachtet (Abb. 3.1, Abb. 3.3 und Abb. 3.10 B). Dies bekräftigt, dass eine

unzureichende proteasomale Aktivität in der Zelle generell zu einer Aktivierung von TCF11/Nrf1 führt.

Auch wenn die Schnittstelle identifiziert werden konnte, ist die Identität der fungierenden Protease noch umstritten. Sha und Goldberg diskutieren eine Proteasom- und Ubiquitin-abhängige Prozessierung des Transkriptionsfaktors (Sha and Goldberg, 2014). Sie demonstrierten in SH-SY5Y Zellen, dass hohe Inhibitorkonzentrationen weder die proteolytische Prozessierung von TCF11/Nrf1 noch die Expression proteasomaler Gene induzieren. Untersuchungen in dieser Arbeit hingegen zeigten, dass auch bei einer Bortezomibkonzentration von 5 μM die Proteasomexpression aktiviert wird, jedoch schon nach einer vierstündigen Behandlung (Abb. 3.5). Ebenso demonstrierten frühere Untersuchungen, dass die Induktion der Expression proteasomaler Gene durch Proteasominhibitoren zeit- und konzentrationsabhängig verläuft (Meiners et al., 2003). Mit zunehmender Expositionsdauer oder Inhibitorkonzentration führt die Hemmung des Proteasoms außerdem zu Apoptose (Kisselev and Goldberg, 2001). So induzierte die Behandlung der SH-SY5Y Zellen mit 10 μM MG132 die Caspase-3/7-Aktivität in SH-SY5Y Zellen (Abb. 3.19 A). Diese Versuchsbedingung wurde in den Untersuchungen von Sha und Goldberg verwendet, führte jedoch in deren Experimenten nicht zu Zelltod (Sha and Goldberg, 2014). Unter apoptotischen Bedingungen ist eine zytoprotektive Adaptation des Proteasomsystems nicht mehr zu erwarten. Ob die proteolytische Aktivierung tatsächlich Proteasom-abhängig ist, oder die Ergebnisse von Sha und Goldberg unter den verwendeten Versuchsbedingungen durch apoptotische Effekte beeinflusst werden, bedarf weiterer Untersuchungen.

Neben der Abhängigkeit von der proteasomalen Aktivität wurde vorgeschlagen, dass TCF11/Nrf1 für die limitierte Proteolyse ubiquitiniert werden muss. Dabei wurde die Induktion der TCF11/Nrf1-vermittelten Expression proteasomaler Untereinheiten durch Hemmung des E1 Enzyms sowie des Ubiquitinrezeptors Rpn13 verringert (Sha and Goldberg, 2014). Eine Depletion des Ubiquitinrezeptors Rpn10, der wie Rpn13 eine Untereinheit des 19S Regulators darstellt, resultierte in dieser Arbeit hingegen in einer Aktivierung der Proteasomexpression (Abb. 3.11). Da sich Rpn10 und Rpn13 teilweise in ihrer Funktion unterscheiden (Husnjak et al., 2008), ist möglicherweise auch ihre Wirkung gegenüber dem Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1 verschieden.

Für eine Beteiligung der Calpain Protease an der Aktivierung von TCF11/Nrf1 sprechen die Ergebnisse von Zhang und Kollegen. Sie beobachteten eine Verminderung der t-Butylhydroquinon-induzierten Transaktivierung von TCF11/Nrf1 sowie eine Stabilisierung des Faktors in der Membran nach Behandlung der Zellen mit einem Calpain-Inhibitor (Zhang and Hayes, 2013; Zhang et al., 2009). Eine Interaktion zwischen der großen Calpain 1

Untereinheit und TCF11/Nrf1 wurde in einer Hefe-Zwei-Hybrid Studie demonstriert (Jiang et al., 2002). Ebenfalls sprechen erste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe für eine Beteiligung von Calpain 1 an der proteolytischen Prozessierung des Transkriptionsfaktors. So wurde in den Untersuchungen die Epoxomicin-induzierte nukleäre Lokalisation von TCF11/Nrf1 durch Depletion oder Inhibition von Calpain gehemmt (unveröffentlichte Daten, Koch und Krüger).

4.2. Das Proteasomsystem in neuronalen Zellen

Das UPS spielt eine bedeutende Rolle für Wachstum und Entwicklung von Neuronen sowie für die synaptische Funktion und Plastizität reifer Neuronen (Yi and Ehlers, 2007). Zudem steht eine Störung des UPS im engen Zusammenhang mit der Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen. So ist eine Anreicherung zytotoxischer Proteinaggregate charakteristisch beispielsweise für Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Chorea Huntington (Kriegenburg et al., 2011; Yi and Ehlers, 2007). Die Aufrechterhaltung des UPS und eine Anpassung der proteasomalen Aktivität an den schwankenden Bedarf sind essentiell um die neuronale Funktionsfähigkeit zu gewährleisten. So führt die Depletion der 19S Untereinheit *PSMC1/Rpt2* in Neuronen des Prosencephalons oder den dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* Region in Mausgehirnen zu einer Anreicherung von Proteinaggregaten, zu oxidativem Stress und zur Neurodegeneration (Bedford et al., 2008; Elkharaz et al., 2013). Ähnlich resultiert der Verlust des Hauptregulators der proteasomalen Genexpression, TCF11/Nrf1, in Gehirnen von Mäusen zu einer verringerten Proteasomexpression, Akkumulation ubiquitinerter Proteine und zu neuronalem Zelltod (Kobayashi et al., 2011; Lee et al., 2011). Dies unterstreicht die hohe Relevanz des Transkriptionsfaktors für die Funktionalität und Viabilität von Neuronen durch eine Aufrechterhaltung der Proteasom Homöostase.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die TCF11/Nrf1-abhängige Expression proteasomaler Gene in Antwort auf eine verringerte Proteasomaktivität in der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y charakterisiert. Die Untersuchungen ergaben, dass Zellen neuronalen oder glialen Ursprungs eine vergleichsweise hohe basale sowie induzierte TCF11/Nrf1 Proteinmenge aufwiesen (Abb. 3.1). Diese Ergebnisse korrespondieren mit der Expressionsverteilung des Faktors in unterschiedlichen Regionen des humanen Körpers mit einer überdurchschnittlich hohen Expression von TCF11/Nrf1 im Gehirn (Abb. 6.1). Die Hemmung des Proteasoms in SH-SY5Y Zellen führte zu einer erhöhten TCF11/Nrf1-abhängigen, ARE-gesteuerten Transkription der proteasomalen Untereinheiten und folglich zu einer Zunahme an Proteasomkomplexen (Abb. 3.7 bis Abb. 3.9).

Erstmalig wurde beobachtet, dass die Differenzierung der SH-SY5Y Zellen mit Retinsäure in einer Reduktion von TCF11/Nrf1 und der Epoxomicin-induzierten Expression der proteasomalen Standard Untereinheiten resultiert (Abb. 3.6 A, D). Dies hat möglicherweise

eine eingeschränkte Adaptation des Standard Proteasomsystems zur Folge. So demonstrierten Untersuchungen eine erhöhte Empfindlichkeit mit Retinsäure differenzierter SH-SY5Y Zellen gegenüber dem Neurotoxin Rotenon (Jantas et al., 2013). Interessanterweise führte die Retinsäurebehandlung zu einer erhöhten Expression der induzierbaren Immuno-Untereinheit *PSMB8/LMP7* sowie deren Einbau in neugebildete, aktive Proteasomkomplexe (Abb. 3.6 A-C). Zwar konnten in den Promotoren der Immuno-Untereinheiten potentielle ARE Sequenzen gefunden werden (Anhang Tab. 6.1), jedoch zeigten frühere Untersuchungen in EA.hy926 und SH-SY5Y Zellen, dass TCF11/Nrf1 nicht die Expression der induzierbaren Untereinheiten nach Hemmung des Proteasoms aktiviert (Sha and Goldberg, 2014; Steffen et al., 2010). Ferner inhibiert TCF11/Nrf1 die TGF β (*Transforming growth factor beta*)-induzierte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase und weist somit unter diesen Bedingungen eine anti-inflammatorische Funktion auf (Berg et al., 2007). Andererseits weisen verschiedene Studien darauf hin, dass das Immunoproteasom mit verantwortlich für die Bortezomibresistenz in Myelomzellen ist (Kuhn et al., 2009). Außerdem wird bei der Betrachtung Proteasom-assoziiertes autoinflammatorischer Erkrankungen ein enger Zusammenhang zwischen einer Dysregulation des Proteasomsystems und der Autoinflammation deutlich. So wurden beispielsweise Mutationen in der *PSMB8/LMP7* Immuno-Untereinheit für das CANDLE-Syndrom beschrieben (Brehm and Kruger, 2015). Neben diesen bekannten Mutationen ergaben Studien unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von R. Goldbach-Mansky die Existenz weiterer Mutationen in proteasomalen Immuno- sowie Standard Untereinheiten in Patienten mit einer CANDLE-ähnlichen autoinflammatorischen Erkrankung. Die Ergebnisse zeigen, dass eine verringerte Proteasomaktivität in einer erhöhten Expression pro-inflammatorischer Zytokine resultiert (unveröffentlichte Daten, Brehm und Krüger). Inwiefern TCF11/Nrf1 bzw. die TCF11/Nrf1-abhängige Proteasomregulation an diesem Prozess beteiligt ist, ist bisher nicht bekannt.

Neben der erhöhten *PSMB8/LMP7* Menge, war eine Zunahme der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in differenzierten Zellen zu beobachten (Abb. 3.6 C). Struktur- und biochemische Analysen ergaben, dass die Immuno-Untereinheit *PSMB8/LMP7* im Vergleich zu der *PSMB5/β5* Untereinheit eine schnellere Hydrolyse ermöglicht, was sich in einer erhöhten Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität äußert (Huber et al., 2012; Seifert et al., 2010). Dies könnte die Aktivitätszunahme nach Retinsäurebehandlung erklären. Beobachtungen von Jantas und Kollegen zeigten außerdem, dass differenzierte SH-SY5Y Zellen weniger sensitiv als undifferenzierte Zellen gegen Proteasominhibition sind. Dies beruht teilweise darauf, dass differenzierte Zellen nicht mehr proliferieren und somit eine Induktion der Apoptose durch eine Dysregulation des Zellzyklus nicht mehr stattfindet (siehe Kapitel 4.1 (Jantas et al., 2013)). Zudem lässt sich vermuten, dass auch die veränderte Proteasomkomposition und –

aktivität in differenzierten Zellen eine zytoprotektive Wirkung gegenüber der Proteasominhibition hat. Die Differenzierung der neuronalen Vorläufer Zellen Ntera 2/D1 mit Retinsäure resultierte ebenfalls in einer Zunahme der induzierbaren Untereinheiten LMP7 und LMP2 (Wojcik and Wilk, 1999). Ob es sich bei der Induktion der Expression der Immununtereinheiten um einen Effekt der Retinsäure handelt oder um einen Differenzierungs-abhängigen Prozess, ist nicht geklärt. Regulatorische *retinoic acid responsive elements* (RAREs), die eine direkte Regulation durch die Retinsäure ermöglichen würden, konnten im Rahmen dieser Arbeit sowie in früheren Untersuchungen nicht in den Promotoren von LMP7 und LMP2 identifiziert werden (Daten nicht gezeigt und (Wojcik and Wilk, 1999)).

Insgesamt ist die Expression des Immunoproteasoms in Neuronen umstritten. In gesunden Gehirnen werden nur geringe Mengen des induzierbaren Komplexes exprimiert (Noda et al., 2000). Schröter und Kollegen zeigten, dass in neuronalen Zellkulturen die Neuronen kein Immunoproteasom synthetisieren, da die IRF1 Bindestelle im *PSMB8/LMP7* Promotor methyliert vorliegt. Nur durch gleichzeitige Hemmung des Aktionspotentials und durch Stimulation mit IFN γ konnte eine Induktion der LMP7 Expression in reifen Neuronen erreicht werden (Dissertation F. Schröter). Eine Erkrankung des Gehirns resultiert zumeist in einer Zunahme von Immunoproteasomen in verschiedenen Zellen. Beispielsweise wurde im Fall der Multiplen Sklerose in Endothelzellen, Oligodendrozyten, Astrozyten, Lymphozyten und Neuronen das Immunoproteasom detektiert (Mishto et al., 2010). Bei Morbus Alzheimer wurde die Expression des Immunoproteasoms in Astrozyten, Neuronen, Endothelzellen und Mikrogliazellen nachgewiesen (Mishto et al., 2006; Orre et al., 2013) und in Chorea Huntington wurde der induzierbare Proteasomkomplex ebenfalls in Neuronen detektiert (Diaz-Hernandez et al., 2003). Zudem weisen weitere Studien darauf hin, dass die Expression des Immunoproteasoms im Gehirn mit dem Alter zunimmt (Giannini et al., 2013; Mishto et al., 2006).

4.3. Intrazellulärer oxidativer Stress, aber nicht Thapsigargin- oder Tunicamycin-induzierter ER-Stress, fördert die TCF11/Nrf1-abhängige Expression proteasomaler Untereinheiten

Zellulärer Stress – speziell ER-Stress und oxidativer Stress – stehen, wie auch eine Störung des UPS, im engen Zusammenhang mit der Entstehung verschiedenen Krankheiten, wie Krebs, Diabetes mellitus, neurodegenerativer sowie kardiovaskuläre Erkrankungen (Chaudhari et al., 2014; Hetz et al., 2013). Die Zelle besitzt verschiedene adaptive Mechanismen, wie die UPR und die antioxidative Stressantwort, die es ihr ermöglichen Störungen der Proteinfaltung im ER oder Schwankungen des Redox-Gleichgewichts auszugleichen (Chaudhari et al., 2014).

4.3.1. Thapsigargin und Tunicamycin induzieren nicht die TCF11/Nrf1-vermittelte Expression proteasomaler Untereinheiten

Neuere Arbeiten beschreiben, dass TCF11/Nrf1 eine protektive Eigenschaft gegenüber ER-Stress aufweist. So zeigten Untersuchungen in der Mausleber, dass der spezifische Verlust an TCF11/Nrf1 zu einer Verringerung der basalen und induzierten Proteasomexpression und der Hochregulation von UPR Markern resultiert. Zudem litten heterozygote Tiere unter einem verstärkten Bortezomib-induzierten ER-Stress sowie *Steatosis hepatis* (Lee et al., 2013). Die zytoprotektive Wirkung von TCF11/Nrf1 gegenüber ER-Stress wurde in einem neuronalen Zellkulturmodell bestätigt. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch das Flavonol Icariin schützte die Zellen vor Tunicamycin-induzierter Apoptose, teilweise durch die TCF11/Nrf1-vermittelte Hochregulation der Hrd1/Synoviolin Expression (Li et al., 2015).

Auch die verwendeten Proteasominhibitoren und Konzentrationen in dieser Arbeit führten zu ER-Stress, erkennbar an der Hochregulation verschiedener UPR Marker (Abb. 3.12). Aufgrund dieser Befunde lässt sich vermuten, dass TCF11/Nrf1 in Antwort auf eine Störung der ER Homöostase aktiviert wird, um dieser wiederum entgegenzuwirken. Untersuchungen dieser Arbeit jedoch, konnten diese Hypothese nicht bestätigen. Eine Behandlung mit dem ER Stressor Thapsigargin zeigte keine Anreicherung des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1. Tunicamycin führte zwar zu einer leichten Zunahme der TCF11/Nrf1 Proteinmenge, jedoch war keine Induktion der Expression der proteasomalen Untereinheit *PSMB6*/ β 1 detektierbar (Abb. 3.13 und nicht gezeigte Daten). Dieses Ergebnis wurde in den letzten Jahren durch weitere Studien bekräftigt. Es konnten weder eine verstärkte nukleäre Lokalisation von TCF11/Nrf1 noch eine Induktion der Genexpression in Antwort auf Tunicamycin oder Thapsigargin beobachtet werden (Sha and Goldberg, 2014; Zhang et al., 2009). Vielmehr beschrieben Zhang und Kollegen eine durch die ER-Stressoren bedingte Verringerung der Nrf1-induzierten Transaktivierung (Zhang et al., 2009). Im Gegensatz dazu zeigten Wang und Chan in Antwort auf Tunicamycin eine Akkumulation von Nrf1 im Nukleus, führten jedoch keine Untersuchungen bezüglich der transkriptionellen Aktivität durch (Wang and Chan, 2006). Allerdings beschreibt eine kürzlich erschienene Untersuchung in Wildtyp und Nrf1^{-/-} MEF Zellen, dass bereits die basale sowie die Tunicamycin-induzierte HERP (*HERPUD1*) Genexpression von Nrf1 abhängig ist (Ho and Chan, 2015). Ergebnisse der Microarray Analyse von J. Steffen zeigten zwar eine Epoxomicin-induzierte Hochregulation von HERP, deuten aber nicht auf eine Abhängigkeit von TCF11/Nrf1 hin (unveröffentlichte Daten, Steffen und Krüger). Allerdings sollte an dieser Stelle bemerkt werden, dass proteasomale Inhibition zwar auch ER-Stress induziert (Abb. 3.12 und (Choy et al., 2011; Fribley et al., 2004)), sich aber dennoch von der Wirkung von Tunicamycin unterscheidet. Tunicamycin inhibiert die N-Glykosylierung von Proteinen. Da die Glykosylierung die

Proteinfaltung fördert, führt die Behandlung mit Tunicamycin zu einer Anreicherung fehlgefalteter Proteine im ER und demzufolge zu ER-Stress. Zudem beeinflusst Tunicamycin direkt den Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1, der selbst in seiner NST Domäne glykosyliert wird (siehe Abb. 1.9). Eine Hemmung der Glykosylierung resultiert in einer schneller migrierenden, deglykosylierten Form des Transkriptionsfaktors (Abb. 3.13 A). Die N-Glykosylierung scheint essentiell für das Erreichen der korrekten Topologie und folglich der Aktivierbarkeit des Transkriptionsfaktors zu sein. Andererseits wird die Transaktivierung TCF11/Nrf1-gesteuerter Gene durch die Deglykosylierung des Faktors, die während der Aktivierungskaskade und dem nukleären Transfers stattfindet, gefördert (Steffen et al., 2010; Zhang et al., 2014c).

Auch wenn TCF11/Nrf1 nicht durch Thapsigargin und Tunicamycin aktiviert wird, widerspricht dies nicht der zytoprotektiven Funktion des Transkriptionsfaktors. Durch einen Mangel an TCF11/Nrf1 wird teilweise schon die basale sowie die induzierte Expression proteasomaler und UPS-verwandter Gene, wie auch HRD1 und HERP, verringert (Ho and Chan, 2015; Lee et al., 2013; Li et al., 2015; Steffen et al., 2010). Dies hat zur Folge, dass der UPS-vermittelte Proteinabbau, darunter der ERAD-vermittelte Abbau, eingeschränkt ist, oder zumindest schon kleine Bedarfsschwankungen nicht mehr kompensiert werden können. Somit führt ein steigender Bedarf proteasomaler Aktivität in TCF11/Nrf1-depletierten Zellen einerseits zu einer Anreicherung von fehlgefalteten und fehlerhaften, zellulären Proteinen, einschließlich von ER-Proteinen. Dies führt letztlich zu ER-Stress. Andererseits akkumulieren fehlgefaltete Proteine in Antwort auf eine gestörte ER Homöostase schneller, wenn die basale ERAD-Aktivität durch einen Mangel an TCF11/Nrf1 eingeschränkt ist und dies induziert letztlich auch schneller ER-Stress.

4.3.2. Oxidativer Stress fördert die Proteasominhibitor-induzierte Expression proteasomaler Untereinheiten

TCF11/Nrf1 vermittelt die Expression proteasomaler Untereinheiten über Bindung der ARE Motive in deren Promotoren (Steffen et al., 2010). Diese regulatorischen Elemente sind hauptsächlich in den Promotoren von Genen der antioxidativen Stressantwort enthalten und werden durch die Vertreter der Nrf Transkriptionsfaktoren reguliert (siehe Kapitel 1.2.3.1, 1.3.1 und (Itoh et al., 1997; Jaiswal, 2004; Rushmore et al., 1991; Venugopal and Jaiswal, 1998)). Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass oxidativer Stress eine Rolle bei der TCF11/Nrf1-vermittelten Induktion der Expression proteasomaler Untereinheiten spielt.

Die Hemmung des Proteasoms führte zu oxidativen Stress, erkennbar an einer erhöhten intrazellulären ROS Menge und der Anreicherung oxidierten Proteine (Abb. 3.14). Eine Zunahme der ROS Produktion durch Proteasominhibition ist bedeutend für die folgende Induktion des apoptotischen Zelltods (Fribley et al., 2004). Untersuchungen zeigten, dass die

erhöhte Radikalmenge ihren Ursprung in der Beeinträchtigung der Mitochondrien hat, die vermutlich auf der Anreicherung polyubiquitinerter, mitochondrialer Proteine durch Proteasominhibition beruht (Hemion et al., 2014; Maharjan et al., 2014). Da frisch synthetisierte und naszierende Proteine sehr anfällig gegenüber oxidativer Beschädigung sind und oxidierte Proteine ein Substrat des UPS-abhängigen Proteinabbaus darstellen, hat die Hemmung des Proteasoms eine Anreicherung oxidierten Proteine zur Folge (Dudek et al., 2005; Medicherla and Goldberg, 2008; Seifert et al., 2010; Steffen et al., 2010).

Um der Frage nachzugehen, ob der Proteasominhibitor-induzierte oxidative Stress bedeutend für die Expressionsinduktion ist, wurde dieser durch Ko-Behandlung mit Antioxidantien eingedämmt. Hierbei wurde einerseits die Ascorbinsäure verwendet, die aufgrund ihrer reduzierenden Eigenschaften als ein direktes Antioxidans wirkt. Des Weiteren wurde das indirekte Antioxidans Sulforaphan verwendet, welches aufgrund seines elektrophilen Charakters die Nrf2-Keap1 vermittelte antioxidative Stressantwort induziert (siehe Kapitel 1.2.3.1 und 1.3.1.2; Abb. 3.16 A; (Dinkova-Kostova et al., 2002)). Die Reduktion des oxidativen Stresses resultierte in einer Abnahme der Bindung von TCF11/Nrf1 an das ARE Motiv des *PSMB6*/β1 Promotors und folglich in einer verringerten Epoxomicin-induzierten *PSMB6*/β1 Expression (Abb. 3.15 und Abb. 3.17). Sie beeinflusste allerdings nicht die Lokalisation des Transkriptionsfaktors (Abb. 3.16 B). Die Behandlung mit Sulforaphan zeigte zudem eine starke Aktivierung von Nrf2 und neben der starken Abnahme der induzierten Promotoraktivität von *PSMB6*/β1, schon eine Reduktion der basalen Expression (Abb. 3.16 A und Abb. 3.17). Möglicherweise verdrängt der Faktor Nrf2 unter diesen Bedingungen TCF11/Nrf1 von dem regulatorischen ARE Motiv (siehe Kapitel 4.4.3). Da die Überexpression von Nrf2 im Vergleich zu TCF11/Nrf1 nur eine geringere Aktivierung der Genexpression proteasomaler Untereinheiten aufweist (Steffen et al., 2010), würde eine Bindung von Nrf2 anstelle der von TCF11/Nrf1 eine generelle Abnahme der Promotoraktivität erklären. Allerdings ist nach Behandlung mit der Ascorbinsäure keine Zunahme von Nrf2 zu beobachten, aber eine Verringerung der Expressionsinduktion. Somit scheint oxidativer Stress die TCF11/Nrf1-vermittelte Induktion der proteasomalen Genexpression, zumindest teilweise unabhängig von Nrf2, positiv zu regulieren. Möglicherweise induziert das oxidative Milieu über einen Signalweg eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Beispielsweise induzieren oxidativer Stress sowie die Hemmung des Proteasoms den JNK Signalweg (Dissertation J. Steffen und (Shen and Liu, 2006; Yin et al., 2005)). Zudem ist neben der Dimerisierung des TCF11/Nrf1 Transkriptionsfaktors mit kleinen Maf Proteinen auch eine Assoziation mit den Jun Transkriptionsfaktoren beschrieben (Johnsen et al., 1996; Venugopal and Jaiswal, 1998). Da durch Antioxidantien keine veränderte Lokalisation von TCF11/Nrf1 beobachtet wurde, sondern nur die Epoxomicin-induzierte Bindung an das ARE Motiv verringert war, ist eine Regulation durch einen Interaktionspartner denkbar. Doch auch

eine post-translationale Modifizierung könnte die Affinität von TCF11/Nrf1 zu dem regulatorischen Element beeinflussen (Todeschini et al., 2014). So wird beispielsweise die reprimierende Wirkung von TCF11/Nrf1 auf die Expression von DSPP (*Dentin Sialophosphoprotein*) in Odontoblasten durch Interaktion mit C/EBP β (*CCAAT enhancer-binding protein beta*) verstärkt. Zudem wird die Assoziation der Transkriptionsfaktoren durch eine Phosphorylierung von TCF11/Nrf1 gefördert (Narayanan et al., 2004). Außerdem inhibiert die Casein Kinase 2-abhängige Phosphorylierung die TCF11/Nrf1-vermittelte Expression der proteasomalen Gene (Tsuchiya et al., 2013). Die Aktivität des nahe verwandten Transkriptionsfaktors Nrf2 wird ebenfalls durch Phosphorylierung und Acetylierung beeinflusst (siehe Kapitel 1.3.1.2; (Jain and Jaiswal, 2006)). Einen positiven Effekt auf die Nrf2 Aktivität hat außerdem die Oxidation eines Redox-sensitiven Cysteinrests innerhalb seiner NES Sequenz (Li et al., 2006). Dieser Cysteinrest ist zwar nicht in TCF11/Nrf1 konserviert, jedoch weist das NES im kodierenden Exons 3 der TCF11 Isoform einen Cysteinrest auf (NES Sequenz: L₂₅₁SLEECLRL₂₅₉). Eine Oxidation dieser Sequenz erklärt möglicherweise die Beobachtung aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die ergab, dass TCF11 die Expression der proteasomalen Untereinheiten stärker aktiviert als Nrf1 (Steffen et al., 2010).

4.4. Die Expression proteasomaler Untereinheiten wird durch das Pro-Oxidans Rotenon in SH-SY5Y Zellen induziert

Wie bereits in Kapitel 4.1 diskutiert, haben Zellen einen adaptiven Regulationsmechanismus entwickelt, der eine Anpassung des UPS an den schwankenden Bedarf proteasomaler Aktivität gewährleistet. Eine Störung des UPS führt zu einer Akkumulation fehlgefalteter oder fehlerhafter, ubiquitinerter Proteine. Diese toxischen Proteinaggregate sind unter anderem charakteristisch für neurodegenerative Erkrankungen, wie Morbus Parkinson. Die Erkrankung tritt zumeist idiopathisch auf. Dennoch wurden 15 Gene entdeckt, deren Mutationen die familiäre Form der parkinsonschen Erkrankung auslösen. Unter diesen befinden sich auch drei Mitglieder des Ubiquitinsystems, die Deubiquitinase UCH-L1, und die E3 Ubiquitin Ligasen Parkin sowie FBXO7 (Goldberg, 2003; Kriegenburg et al., 2011). Die sporadische parkinsonsche Erkrankung ist assoziiert mit einer Störung der mitochondrialen Aktivität, die zu einer erhöhten ROS Produktion und folglich einer Stress-bedingten Zunahme oxidierter Proteine führt. Verschiedene Metaanalysen zeigten, dass der Umgang mit Pestiziden das Risiko an Morbus Parkinson zu erkranken erhöht (Priyadarshi et al., 2001; van der Mark et al., 2012). Auch im Tiermodell konnte ein Zusammenhang zwischen Pestiziden und der Ausbildung von Morbus Parkinson hergestellt werden. Beispielsweise wiesen Ratten, die chronisch mit der natürlich vorkommenden Substanz Rotenon behandelt wurden, neuropathologische Eigenschaften und für die Erkrankung typische

Verhaltensmuster auf (Betarbet et al., 2000). Wie auch andere Pestizide inhibiert Rotenon den Komplex I der Atmungskette. Diese Störung des Elektronentransfers resultiert in oxidativem Stress, einem ATP Mangel und letztlich Neurodegeneration in Tier- sowie Zellkulturmodellen (Betarbet et al., 2000; Shamoto-Nagai et al., 2003; Xiong et al., 2012; Zeevalk and Bernard, 2005). Wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, bewirkt eine Zunahme an zellulären ROS eine Anreicherung oxidativ beschädigter Proteine. Außerdem wird die TCF11/Nrf1-vermittelte Proteasomsynthese durch oxidative Bedingungen gefördert. Andersherum verursacht ein spezifischer Mangel an Nrf1 in Maus-Gehirnen oxidativen Stress (Kobayashi et al., 2011).

4.4.1. TCF11/Nrf1 reguliert die Rotenon-induzierte Proteasomexpression

Das Pestizid Rotenon rief, wie erwartet, eine erhöhte ROS Produktion sowie eine Anreicherung oxidiertes und ubiquitiniertes Proteine in SH-SY5Y Zellen hervor (Abb. 3.18). Schon Mitte der 1980er wurde gezeigt, dass eine Oxidation von Proteinen mit einer erhöhten Proteolyse einhergeht (Pacifci et al., 1989; Rivett, 1985). Seither wurde durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt, dass oxidierte Proteine Substrate des Proteasoms darstellen, wobei die Beteiligung des Ubiquitinsystems an deren Abbau kontrovers diskutiert wird (siehe 1.2.3.2). So wurden oxidierte Proteine in Ubiquitinierungs-defizienten Zellen ebenso effizient proteasomal abgebaut, wie in wildtypischen Zellen (Shringarpure et al., 2003). Zudem demonstrierten siRNA Experimente, dass durch Depletion der katalytischen 20S Untereinheit *PSMB5/β5* der Abbau des oxidierten Hämoglobins *in vitro* um etwa 80 %, der Mangel an der 19S Untereinheit *PSMC1/S4* jedoch nur eine Reduktion um etwa 30 % bewirkt (Pickering et al., 2010). Andererseits zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass carbonylierte, zelluläre Proteine teilweise ubiquitiniert vorliegen und andersherum der Pool an ubiquitinierten Proteinen teilweise carbonyliert ist (Dudek et al., 2005; Seifert et al., 2010; Shang et al., 2001). Zwar ist nicht auszuschließen, dass bereits ubiquitinierte Proteine oxidiert wurden, dennoch unterstützen verschiedene Beobachtungen, dass oxidierte Proteine mit Ubiquitinmolekülen für den Abbau markiert werden. So resultierte beispielsweise eine Hemmung des Ubiquitin-abhängigen Abbaus in einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Stress (Dudek et al., 2005). Zudem wurde gezeigt, dass fehlgefaltete, fehlerhafte oder oxidierte Proteine durch die E3 Ligase CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*) für den proteasomalen Abbau mit Ubiquitin markiert werden. Dabei interagieren zunächst die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 mit dem fehlgefalteten oder beschädigten Substratprotein. CHIP erkennt wiederum die Chaperone und vermittelt folglich die Ubiquitinierung des Substrates (Pratt et al., 2010).

Die Exposition mit dem Pro-Oxidans Rotenon resultierte in einer erhöhten Transkription von 20S sowie 19S Untereinheiten und folglich in einer Zunahme aktiver Proteasomkomplexe

(Abb. 3.21, Abb. 3.22, Abb. 3.24 und schematisch in Abb. 4.1). Da der 26S/30S Proteasomkomplex hauptsächlich ubiquitinierte Substrate abbaut, deuten die Induktion der 19S Untereinheit auf eine Beteiligung des Ubiquitinsystems an der Rotenon-induzierten Adaptation der Proteasomaktivität hin. Eine transiente Hochregulation des Proteasomsystems durch oxidativen Stress wurde bereits mehrfach beobachtet. Beispielsweise erhöht eine Exposition mit Hydrogenperoxid oder Paraquat den proteasomalen Abbau kurzlebiger sowie langlebiger Proteine in K562 Zellen (Grune et al., 1996). In Hepatozyten war eine Zunahme der Proteasomaktivität nach Behandlung mit verschiedenen pro-oxidativen Toxinen zu beobachten (Pirlich et al., 2002). Pickering und Kollegen zeigten, dass eine durch oxidativen Stress induzierte Zunahme der proteasomalen Aktivität abhängig von der Proteasomsynthese ist. Neben dem 20S Proteasom beobachteten sie die Induktion des Immunproteasoms sowie des PA28 $\alpha\beta$ Regulators (Pickering et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit war ebenfalls eine leichte Rotenon-abhängige Zunahme PA28 β -gebundener niedermolekularer 20S Proteasomkomplexe zu beobachten (Abb. 3.22). Auch eine Exposition von mesenzephalischen Zellen oder SH-SY5Y Zellen mit dem Pestizid Rotenon resultierte in früheren Studien in einer erhöhten Proteasomaktivität sowie einer Zunahme des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 (Bauereis et al., 2011; McNaught et al., 2010; Zeevalk and Bernard, 2005). Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass sich die Zellen durch Hochregulation der Proteasomsynthese und infolgedessen der proteasomalen Aktivität an Rotenon-induzierten zellulären Stress anpassen.

Obwohl einige Studien eine Adaptation des UPS an Rotenon-induzierten Stress zeigten, wurde der fungierende Transkriptionsfaktor nicht beschrieben. In Experimenten dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der SH-SY5Y Zellen für wenige Stunden mit einer nicht-toxischen Rotenonkonzentration die Menge des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 sowie seine nukleäre Lokalisation erhöht (Abb. 3.20). Im Nukleus bindet TCF11/Nrf1, wie nach der Aktivierung durch Proteasominhibition (siehe Kapitel 4.1 und Abb. 4.1), an die regulatorischen ARE Motive der Promotoren der proteasomalen Gene und induziert dadurch deren Transkription (Abb. 3.21, Abb. 3.23 und Abb. 3.24). Diese resultiert letztlich in einer TCF11/Nrf1-abhängigen Zunahme frisch translaterter und assemblierter Proteasomkomplexe sowie einer erhöhten Proteasomaktivität (Abb. 3.22 und Abb. 3.25). Eine akute Exposition mit Rotenon für einen Tag unterdrückte in murinen C2C12 Zellen die nukleäre Translokation von TCF11/Nrf1 (Furuya et al., 2014). Jedoch resultierte Arsen-induzierter oxidativer Stress in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors in humanen Keratinozyten und einer TCF11/Nrf1-vermittelten Hochregulation der Expression der Glutamatcysteinylgase (Zhao et al., 2011).

Zusammengenommen demonstrieren diese Beobachtungen, dass TCF11/Nrf1 durch oxidativen Stress aktiviert wird und die Expression seiner Zielgene, wie der proteasomalen Untereinheiten, induziert. Somit ist die TCF11/Nrf1-vermittelte Proteasomsynthese ein bedeutender Bestandteil der zellulären, antioxidativen Stressantwort.

4.4.2. Andauernde Rotenonexposition führt zu zellulären Stress und Zelltod

Rotenon führt zeit- und konzentrationsabhängig zu neuronalem Zelltod. Die Neurodegeneration beruht dabei zumindest teilweise auf Apoptose (Ahmadi et al., 2003; Bauereis et al., 2011; Hartley et al., 1994; Samantaray et al., 2007). So wurde auch in den Gehirnen von Parkinsonpatienten die Aktivierung der Caspase-3, welche charakteristisch für apoptotischen Zelltod ist, nachgewiesen (Anglade et al., 1997). In SH-SY5Y Zellen wurde ebenfalls neben einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität eine Induktion der Caspase-3/7 Aktivität beobachtet (Abb. 3.19). Neben der Anreicherung oxidierter sowie ubiquitinerter Proteine und dem programmierten Zelltod wird häufig eine Abnahme der proteasomalen Aktivität nach einer Rotenonexposition von über 24 h diskutiert (Chou et al., 2010; Shamoto-Nagai et al., 2003). Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Reduktion der Proteasomaktivität auf einer verringerten Proteasommenge beruht (Chou et al., 2010; Yap et al., 2013) und andere argumentieren, dass eine oxidative Modifizierung des Proteasoms dessen Funktion hemmt (Shamoto-Nagai et al., 2003).

Wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, aktivierte die Behandlung von SH-SY5Y Zellen mit dem Pestizid schon nach wenigen Stunden den Transkriptionsfaktor TCF11/Nrf1. Dieser wiederum vermittelte folglich eine Induktion der Genexpression der proteasomalen Untereinheiten (Abb. 4.1). Eine Hemmung der Proteasomaktivität wurde in anderen Studien zumeist nach einer Behandlungsdauer von 24 h und länger beobachtet (Chou et al., 2010; Shamoto-Nagai et al., 2003). In Experimenten dieser Arbeit war unter diesen Bedingungen die Proteinmenge des Transkriptionsfaktors TCF11/Nrf1 verringert (Abb. 3.27 A). Eine Abnahme der proteasomalen Aktivität und der Menge proteasomaler Komplexe wurde nach einer Behandlungsdauer von 72 h beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Da Rotenon die Kinase GSK3 β aktiviert (Chen et al., 2008), welche den proteasomalen Abbau von nukleären TCF11/Nrf1 fördert (Biswas et al., 2013), lag die Vermutung nahe, dass der Faktor unter diesen Bedingungen verstärkt abgebaut wurde. Abbauxperimente ließen jedoch keine erhöhte Degradation erkennen (Abb. 3.27 B). Vielmehr deuteten sie auf eine leichte Stabilisierung von TCF11/Nrf1 hin. Da die verringerte Proteinmenge nicht auf einem erhöhten Abbau beruhte, wurde folglich vermutet, dass Rotenon die Expression des Transkriptionsfaktors beeinflusste. Die Ergebnisse der Real-time PCR ergaben überraschenderweise eine Zunahme der mRNA Menge des Transkriptionsfaktors (Abb. 3.27

C). Die Abnahme der Proteinmenge und gleichzeitige Zunahme der mRNA Menge ließ vermuten, dass die TCF11/Nrf1 mRNA aufgrund einer Translationshemmung angereichert war. Rotenon verringert durch Inhibition der Atmungskette die zelluläre ATP Menge (Shamoto-Nagai et al., 2003; Zeevalk and Bernard, 2005). Ein Mangel an ATP wiederum wirkt sich negativ auf die Aktivität der Kinase mTOR aus (Dennis et al., 2001). mTOR ist ein positiver Regulator der Biogenese von Ribosomen und der Translation. Durch Phosphorylierung kontrolliert mTOR die Translationsregulatoren S6K1 (*S6 kinase 1*) und 4E-BP1 (*initiation factor 4E binding protein*) (siehe Abb. 4.2; (Bhat et al., 2015)). Zudem demonstrierten Zhang und Kollegen, dass mTOR die TCF11/Nrf1 Expression und folglich die Proteasomsynthese stimuliert (Zhang et al., 2014a). Dies bedeutet, dass eine Hemmung der mTOR Aktivität eine Abnahme der Transkription sowie der Translation von TCF11/Nrf1 zur Folge hätte. Eine verringerte Phosphorylierung der ribosomalen Untereinheit S6, die ein Substrat von S6K1 darstellt, konnte in SH-SY5Y Zellen nach Exposition mit Rotenon nicht beobachtet werden (Abb. 3.27 D). Demnach scheint unter den verwendeten Bedingungen die S6K1 Aktivität sowie die vorgeschaltete mTOR Aktivität nicht beeinflusst zu sein. Möglicherweise war die ATP Menge noch nicht ausreichend gesunken, um die mTOR Aktivität zu hemmen.

Die Inhibition der Translation ist außerdem Bestandteil der UPR. In Antwort auf ER-Stress phosphoryliert der Sensor PERK den Translationsregulator eIF2 α und hemmt dadurch die Translationsinitiation. Neben PERK können drei weitere Stress-induzierte Kinasen eIF2 α phosphorylieren (siehe Abb. 4.2, Kapitel 1.2.2 und (Bhat et al., 2015; Harding et al., 2000b)). Eine Zunahme von UPR Markern durch Behandlung mit Rotenon wurde bereits beschrieben (Bauereis et al., 2011; Chen et al., 2008) und ebenfalls in der vorliegenden Arbeit beobachtet (Abb. 3.27 E, F). Zudem führte eine 48 stündige Rotenonexposition zu einer erhöhten Phosphorylierung von eIF2 α (Abb. 3.27 G). Diese hemmt die Cap-abhängige mRNA Translation und erklärt die beobachtete Abnahme der TCF11/Nrf1 Proteinmenge. Da der Transkriptionsfaktor mit einer Halbwertszeit von etwa 20 min kurzlebig ist, macht sich eine verringerte Translation schnell bemerkbar. Dass TCF11/Nrf1 nicht zu den wenigen Proteinen gehört, deren Translation durch phosphoryliertes eIF2 α verbessert wird, wurde in Polyribosomen Experimenten gezeigt (Harding et al., 2000a).

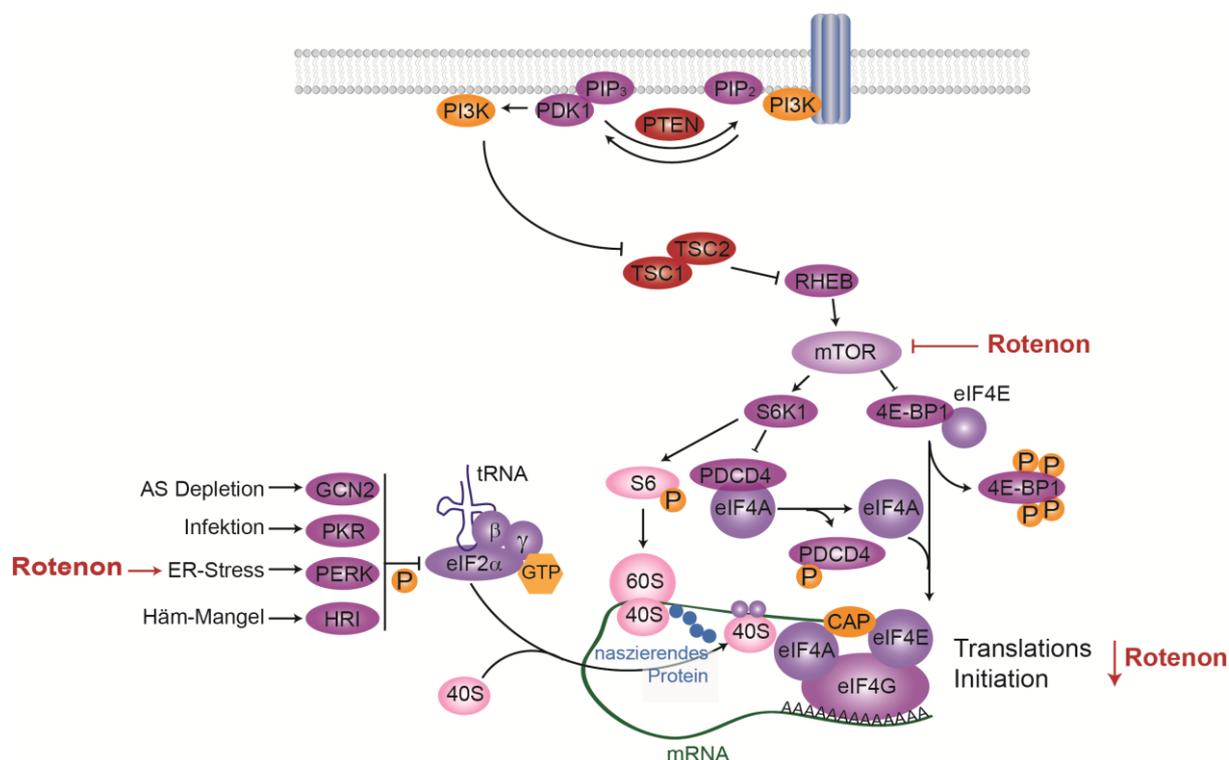


Abb. 4.2: Regulation der Translationsinitiation. Der PI3K-mTOR Signalweg fördert die Initiation der Translation einerseits indem mTOR durch Phosphorylierung des eIF4E-bindenden Proteins 4E-BP1 die reprimierende Bindung zu dessen Interaktionspartners eIF4E löst. Andererseits aktiviert mTOR die Kinase S6K1 durch Phosphorylierung. Diese wiederum aktiviert die ribosomale Untereinheit S6 und hemmt PDCD4, einen Repressor des Initiationsfaktors eIF4A. Neben mTOR sind die eIF2 α Kinasen an der Regulation der Translationsinitiation beteiligt. Die phosphorylierte Form von eIF2 α ist inaktiv und hemmt somit die Initiation. eIF2 α wird bei einem Aminosäuremangel von der Kinase GCN2, nach Infektion durch PKR, bei ER-Stress durch PERK und bei Häm-Mangel durch Häm-Mangel durch HRI phosphoryliert. Eine anhaltende Rotenonbehandlung hemmt die Proteintranslation, da sie zu ER-Stress und somit zu der Aktivierung von PERK führt und andererseits durch Reduktion der zellulären ATP-Menge, was wiederum in einer Abnahme der mTOR Aktivität resultiert. [modifiziert nach (Bhat et al., 2015)]

Obwohl eine anhaltende Rotenonbehandlung zu einer Abnahme der TCF11/Nrf1 Proteinmenge und einer Hemmung der Proteasomaktivität führt, zeigt eine frühe transiente TCF11/Nrf1-abhängige Hochregulation des Proteasomsystems, die Existenz eines adaptiven Regulationsmechanismus. Zudem ergaben Experimente dieser Arbeit, dass TCF11/Nrf1 die SH-SY5Y Zellen vor Rotenon-induzierten Zelltod schützt (Abb. 3.28). Diese protektive Eigenschaft beruht sehr wahrscheinlich auf der TCF11/Nrf1-vermittelten Induktion der Expression proteasomaler, UPS-verwandter sowie weiterer antioxidativer Gene. Dass die Anpassung des Proteasomsystems an den durch Rotenon-hervorgerufenen Stress von großer Bedeutung ist, zeigen auch Experimente in denen mit dem Neurotoxin behandelte Zellen zusätzlich Proteasominhibitoren ausgesetzt wurden. Die Hemmung des Proteasoms verstärkte die Rotenon-induzierte Aggregation von α -Synuclein und neuronalen Zelltod (Hoglinger et al., 2003; Lev et al., 2006).

Einer zeitabhängigen Rotenon-induzierten Abnahme der Proteasomaktivität ging in verschiedenen Untersuchungen eine Aktivitätszunahme voran (Betarbet et al., 2006;

Shamoto-Nagai et al., 2003). Gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Arbeit deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass zunächst die Proteasomaktivität abhängig von TCF11/Nrf1 induziert wird, um eine Störung der Redox- und Protein Homöostase durch Rotenon zu kompensieren. Hält der zelluläre Stress an und kann nicht ausreichend durch die zellulären Schutzmechanismen gedämpft werden, führt er letztlich zum Zelltod. Unter diesen Bedingungen scheint die proteasomale Aktivität abzunehmen. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine *in vivo* Untersuchung von Betarbet und Kollegen. Diese zeigte eine Abnahme der proteasomalen Aktivität und Anreicherung ubiquitinerter Proteine im ventralen Mesencephalon Rotenon-behandelter Ratten. Jedoch galt dies nur für Tiere in denen bereits Läsionen auftraten. In mit Rotenon-behandelten Ratten ohne Läsionen war hingegen eine Aktivitätszunahme zu erkennen (Betarbet et al., 2006). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die proteasomale Aktivität zunächst induziert und erst zu einem späteren Zeitpunkt beeinträchtigt ist.

Rotenon führt zu ER-Stress, aktiviert die UPR und beeinträchtigt die ATP Produktion. Anhaltender ER-Stress resultiert letztlich in durch die UPR-vermittelten, programmierten Zelltod (Chaudhari et al., 2014; Eletto et al., 2014). Beides, die UPR und der ATP Mangel, führen zu einer Hemmung der Translation, die sich schon sehr früh auf die Synthese von TCF11/Nrf1 auswirkt. Eine verringerte TCF11/Nrf1 Menge hat eine Abnahme der Proteasomsynthese und folglich der Proteasomaktivität zur Folge. Zudem ist die Funktion des UPS, speziell die Ubiquitinierungskaskade und die 26S Aktivität, direkt abhängig von ATP. In mesenzephalischer Zellkultur führte die akute Behandlung mit Rotenon schnell zu einer Abnahme der Proteasomaktivität, hingegen war eine erhöhte proteasomale Aktivität nach der Exposition mit einer geringen Rotenonkonzentration zu beobachten. Dieses Ergebnis korrelierte mit der zellulären ATP Menge nach der Rotenonbehandlung (Zeevalk and Bernard, 2005). Dies bekräftigt die hohe Bedeutung von ATP für die Aufrechterhaltung der Proteasom Homöostase und der Zellviabilität.

4.4.3. Die Wechselbeziehung zwischen TCF11/Nrf1 und Nrf2 in der Regulation der Expression proteasomaler Untereinheiten

Nrf2 ist der zentrale Akteur der antioxidativen Stressantwort. In Antwort auf elektrophilen oder oxidativen Stress akkumuliert Nrf2 im Zellkern, bindet gemeinsam mit kleinen Maf Proteinen an die ARE Motive seiner Zielgene und aktiviert dadurch deren Transkription (siehe Kapitel 1.3.1.2; (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014)). TCF11/Nrf1 ist neben Nrf2 an der Regulation antioxidativer und detoxifizierender Gene beteiligt. So wird die Expression der Glutathionsynthase, der NAD(P)H:Quinonoxidoreduktase (NQO1) und der regulatorischen Untereinheit der γ -Glutamylcystein-Synthetase (GCS) durch beide Transkriptionsfaktoren reguliert (Kwong et al., 1999; Leung et al., 2003; Venugopal and Jaiswal, 1996). Eine

Überexpression von TCF11/Nrf1 erhöht die Genexpression der regulatorischen GCS Untereinheit (Chepelev et al., 2013; Myhrstad et al., 2001) und andersherum resultierte ein Verlust von TCF11/Nrf1 in murinen Fibroblasten in einer Abnahme der basalen und Stress-induzierten Expression (Chepelev et al., 2013; Myhrstad et al., 2001). Im Fall der katalytischen GCS Untereinheit führt eine Depletion von TCF11/Nrf1 in humanen, bronchialen Epithelzellen oder ein Verlust in murinen Hepatozyten zu einer erhöhten Nrf2-vermittelte Genexpression (Chepelev et al., 2013; Ohtsuji et al., 2008). Dass das Fehlen von TCF11/Nrf1 oder Nrf2 zu einer Reduktion verschiedener antioxidativer Gene führt, wurde ebenfalls von Leung und Kollegen gezeigt. Außerdem beobachteten sie, dass bei einem gleichzeitigen Verlust beider Transkriptionsfaktoren die Expression noch einmal drastisch sinkt. Dies spricht dafür, dass beide Transkriptionsfaktoren ihre Funktion gegenseitig, zumindest teilweise, kompensieren können (Leung et al., 2003). Auch wenn ein Teil der ARE-gesteuerten Gene gleichermaßen durch Nrf2 und TCF11/Nrf1 reguliert wird, steht die Transkription mancher Gene bevorzugt unter Kontrolle eines der beiden Faktoren. So wird die Genexpression von Metallothionein 1 sowie 2 primär durch TCF11/Nrf1 und die Expression der katalytischen GCS Untereinheit durch Nrf2 reguliert (Chepelev et al., 2013; Ohtsuji et al., 2008). Das sich TCF11/Nrf1 und Nrf2 in ihren Zielgenen teilweise unterscheiden, wird auch bei Betrachtung der unterschiedlichen Phänotypen derer Knockout Mäuse deutlich. Der Verlust von Nrf1 in Mäusen ist aufgrund eines Defekts in der Erythropoese embryonal lethal (Chan et al., 1998). Hingegen entwickeln sich Nrf2^{-/-} Mäuse normal und weisen keine offensichtlichen Veränderung auf (Chan et al., 1996). Jedoch ist in den Tieren die Menge antioxidativer und detoxifizierender Proteine verringert und macht sie empfindlicher gegenüber oxidativem Stress (Chan and Kan, 1999). Unsere Ergebnisse identifizierten TCF11/Nrf1 als Hauptregulator der ARE-gesteuerten Expression proteasomaler Untereinheiten in Antwort auf eine verringerte Proteasomaktivität (siehe Kapitel 4.1, 4.2 und Abb. 3.9). Die Epoxomicin-induzierte Zunahme der Expression war unabhängig von Nrf2 in EA.hy926 sowie in SH-SY5Y Zellen, obwohl Nrf2 durch Proteasominhibition aktiviert wird (Abb. 3.9 und Abb. 3.16 (Dreger et al., 2009; Steffen et al., 2010)).

Interessanterweise ergaben die Untersuchungen dieser Arbeit, dass die Rotenon-induzierte Transkription proteasomaler Gene neben TCF11/Nrf1 ebenfalls abhängig von Nrf2 ist (Abb. 3.24 und Abb. 3.26). Dass Nrf2 die ARE-abhängige Genexpression proteasomaler Untereinheiten aktivieren kann, wurde bereits in früheren Untersuchungen gezeigt. So wurde eine Nrf2-vermittelte Hochregulation proteasomaler Untereinheiten nach Behandlung mit Nrf2 Aktivatoren, wie Elektrophile (Sulforaphan) und Oxidantien (H₂O₂), beobachtet (Arlt et al., 2009; Kwak et al., 2003a; Kwak et al., 2003b; Pickering et al., 2012). Während Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Nrf2 die Genexpression der 26S

Untereinheiten nach Rotenonbehandlung reguliert, so beschrieben Pickering und Kollegen eine Nrf2-vermittelte Induktion der 20S Untereinheiten und des PA28 Regulators in Antwort auf eine Exposition mit Hydrogenperoxid (Pickering et al., 2012). Außerdem kann Nrf2 an die ARE-17 Promotorsequenz der *PSMB6/β1* Untereinheit binden und die Promotoraktivität im Reporterassay induzieren. Jedoch hat die Überexpression von Nrf2 kaum eine Auswirkung auf die Transkription der endogenen proteasomalen Untereinheiten in EA.hy926 Zellen (Steffen et al., 2010).

Dass eine Überexpression von Nrf2 in EA.hy926 Zellen kaum die Expression proteasomaler Gene induziert, hingegen in Kolonkarzinomzellen zu einer erhöhten Genexpression führt (Arlt et al., 2009; Steffen et al., 2010), indiziert, dass sich unterschiedliche Zelltypen in ihrem Transkriptionsmechanismus unterscheiden. So kann Nrf2 in humanen, bronchialen Epithelzellen einen TCF11/Nrf1 Mangel in Bezug auf die Expression der regulatorischen GCS Untereinheit ausgleichen, induziert diese sogar (Chepelev et al., 2013). Hingegen gelingt die Kompensation der Genexpression in MEF Zellen nicht vollständig, so dass ein Verlust von Nrf1 in einer Abnahme der Expression resultiert (Kwong et al., 1999). Ein denkbarer Grund für diese unterschiedlichen Wirkmechanismen ist, dass sich die basale Expression der Transkriptionsfaktoren sowie das Verhältnis der Faktoren zueinander in unterschiedlichen Zellen oder Geweben voneinander unterscheiden. So ergab die Recherche in der biologischen Datenbank BioGPS, dass beispielsweise im Herzen, im Skelettmuskel und im Gehirn überdurchschnittlich viel TCF11/Nrf1 (NFE2L1) exprimiert wird, jedoch nicht Nrf2 (NFE2L2). Andersherum findet man in Monozyten, natürlichen Killerzellen und bronchialen Epithelzellen eine hohe Nrf2 Menge. In anderen Geweben, wie der Epiphyse, liegt die Expression beider Transkriptionsfaktoren über dem Mittelwert (Abb. 6.1 und Abb. 6.2). Kolonkarzinomzellen weisen außerdem eine erhöhte Nrf2 Menge im Vergleich zu normalen Gewebe auf (Arlt et al., 2009). So ist die Wahrscheinlichkeit, dass Nrf2 in diesen Zellen auch an die ARE Sequenzen proteasomaler Untereinheiten bindet erhöht. Andererseits war die Epoxomicin-induzierte Adaptation der Proteasomsynthese weder in EA.hy926 Zellen noch in der Neuroblastomazelllinie SH-SY5Y abhängig von Nrf2.

Des Weiteren könnte der Stimulus entscheidend dafür sein, welcher Transkriptionsfaktor an der Regulation der proteasomalen Genexpression beteiligt ist. Wie bereits beschrieben, resultiert die Exposition bekannter Nrf2 Aktivatoren in einer Nrf2-vermittelten Expressionszunahme proteasomaler Untereinheiten, jedoch nicht die Behandlung mit Proteasominhibitoren, obwohl diese oxidativen Stress induzieren. In Antwort auf die Behandlung mit dem Pro-Oxidans Rotenon wird neben TCF11/Nrf1 auch Nrf2 aktiviert und ist beteiligt an der Transkriptionsregulation der proteasomalen Gene sowie antioxidativer und detoxifizierender Gene, wie Ferritin H (Abb. 3.26 und (MacKenzie et al., 2008). Zwar

induziert Rotenon die Akkumulation von TCF11/Nrf1 im Nukleus, jedoch ist diese im Vergleich zur Proteasominhibition geringer. Daher unterscheidet sich das Verhältnis zwischen TCF11/Nrf1 und Nrf2 wahrscheinlich nach Rotenonbehandlung und nach Proteasominhibition voneinander. Da beide Faktoren um die Bindung an die ARE Sequenz und/oder die Interaktion mit ihren Dimerisierungspartnern, den kleinen Maf Proteinen, konkurrieren, ist das Verhältnis untereinander entscheidend. So wurde beispielsweise beschrieben, dass die kleine Isoform LCR-F1 die Nrf2-vermittelte Transkription der NQO1 und katalytischen GCS Untereinheit unterdrückt, indem sie mit Nrf2 um die Bindung von MafG und des ARE Elements konkurriert (Wang et al., 2007). Hierbei wird außerdem deutlich, dass auch den unterschiedlichen Isoformen möglicherweise eine Bedeutung bei der Regulation der proteasomalen Genexpression zukommt. So wurde ebenfalls gezeigt, dass LCR-F1 die TCF11-vermittelte Genexpression reprimiert (Husberg et al., 2001). Andersherum hemmen die Isoformen TCF11/Nrf1 sowie der Transkriptionsfaktor Nrf2 die LCR-F1-abhängige Transaktivierung *androgene response element*-gesteuerter Gene in Prostatakrebszellen (Schultz et al., 2014).

4.5. Fazit der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TCF11/Nrf1 essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Redox- und Protein Homöostase in Antwort auf oxidativen sowie proteotoxischen Stress ist. Eine erhöhte Nachfrage proteasomaler Aktivität induziert den Transkriptionsfaktor und folglich die Expression der proteasomalen Gene. Somit vermittelt TCF11/Nrf1 eine Zunahme der aktiven Proteasomkomplexe, die wiederum den Stress-bedingten, erhöhten Bedarf der proteolytischen Aktivität kompensieren (Abb. 4.1). Diese TCF11/Nrf1-abhängige Adaptation des Proteasomsystems ist somit von enormer Bedeutung bei der Vorbeugung neurodegenerativer Veränderungen und der Behandlung von Krebs. Daher ist auch in Zukunft die Aufklärung des TCF11/Nrf1 Aktivierungsmechanismus sowie der Regulation der transaktivierenden Aktivität des Transkriptionsfaktors, beispielsweise durch Interaktion mit Nrf2 oder posttranslationalen Modifizierungen, von großem Interesse.

5. Literaturverzeichnis

- Adams, J. (2004). The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer cell* 5, 417-421.
- Ahmadi, F.A., Linseman, D.A., Grammatopoulos, T.N., Jones, S.M., Bouchard, R.J., Freed, C.R., Heidenreich, K.A., and Zawada, W.M. (2003). The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. *Journal of neurochemistry* 87, 914-921.
- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1994). Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *Journal of biochemistry* 115, 257-269.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histology and histopathology* 12, 25-31.
- Arlt, A., Bauer, I., Schafmayer, C., Tepel, J., Muerkoster, S.S., Brosch, M., Roder, C., Kalthoff, H., Hampe, J., Moyer, M.P., *et al.* (2009). Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene* 28, 3983-3996.
- Asada, R., Kanemoto, S., Kondo, S., Saito, A., and Imaizumi, K. (2011). The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *Journal of biochemistry* 149, 507-518.
- Bai, M., Zhao, X., Sahara, K., Ohte, Y., Hirano, Y., Kaneko, T., Yashiroda, H., and Murata, S. (2014). Assembly mechanisms of specialized core particles of the proteasome. *Biomolecules* 4, 662-677.
- Baird, L., Lleres, D., Swift, S., and Dinkova-Kostova, A.T. (2013). Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 15259-15264.
- Baker, R.T., and Board, P.G. (1987). The human ubiquitin gene family: structure of a gene and pseudogenes from the Ub B subfamily. *Nucleic acids research* 15, 443-463.
- Balasubramanian, S., Kanade, S., Han, B., and Eckert, R.L. (2012). A proteasome inhibitor-stimulated Nrf1 protein-dependent compensatory increase in proteasome subunit gene expression reduces polycomb group protein level. *The Journal of biological chemistry* 287, 36179-36189.
- Barrault, M.B., Richet, N., Godard, C., Murciano, B., Le Tallec, B., Rousseau, E., Legrand, P., Charbonnier, J.B., Le Du, M.H., Guerois, R., *et al.* (2012). Dual functions of the Hsm3 protein in chaperoning and scaffolding regulatory particle subunits during the proteasome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, E1001-1010.
- Barriere, H., Nemes, C., Du, K., and Lukacs, G.L. (2007). Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Molecular biology of the cell* 18, 3952-3965.
- Barton, L.F., Cruz, M., Rangwala, R., Deepe, G.S., Jr., and Monaco, J.J. (2002). Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection. *J Immunol* 169, 3046-3052.
- Bauereis, B., Haskins, W.E., Lebaron, R.G., and Renthal, R. (2011). Proteomic insights into the protective mechanisms of an in vitro oxidative stress model of early stage Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 488, 11-16.
- Bedford, L., Hay, D., Devoy, A., Paine, S., Powe, D.G., Seth, R., Gray, T., Topham, I., Fone, K., Rezvani, N., *et al.* (2008). Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 8189-8198.
- Berg, D.T., Gupta, A., Richardson, M.A., O'Brien, L.A., Calnek, D., and Grinnell, B.W. (2007). Negative regulation of inducible nitric-oxide synthase expression mediated through transforming growth factor-beta-dependent modulation of transcription factor TCF11. *The Journal of biological chemistry* 282, 36837-36844.
- Betarbet, R., Canet-Aviles, R.M., Sherer, T.B., Mastroberardino, P.G., McLendon, C., Kim, J.H., Lund, S., Na, H.M., Taylor, G., Bence, N.F., *et al.* (2006). Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiology of disease* 22, 404-420.

- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 3, 1301-1306.
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 14, 261-278.
- Biedler, J.L., Helson, L., and Spengler, B.A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* 33, 2643-2652.
- Biedler, J.L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., and Freedman, L.S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research* 38, 3751-3757.
- Biswas, M., Kwong, E.K., Park, E., Nagra, P., and Chan, J.Y. (2013). Glycogen synthase kinase 3 regulates expression of nuclear factor-erythroid-2 related transcription factor-1 (Nrf1) and inhibits pro-survival function of Nrf1. *Experimental cell research* 319, 1922-1931.
- Biswas, M., Phan, D., Watanabe, M., and Chan, J.Y. (2011). The Fbw7 tumor suppressor regulates nuclear factor E2-related factor 1 transcription factor turnover through proteasome-mediated proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 286, 39282-39289.
- Bordallo, J., and Wolf, D.H. (1999). A RING-H2 finger motif is essential for the function of Der3/Hrd1 in endoplasmic reticulum associated protein degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 448, 244-248.
- Brannigan, J.A., Dodson, G., Duggleby, H.J., Moody, P.C., Smith, J.L., Tomchick, D.R., and Murzin, A.G. (1995). A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature* 378, 416-419.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature cell biology* 1, 221-226.
- Brehm, A., and Kruger, E. (2015). Dysfunction in protein clearance by the proteasome: impact on autoinflammatory diseases. *Semin Immunopathol* 37, 323-333.
- Bush, K.T., Goldberg, A.L., and Nigam, S.K. (1997). Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *The Journal of biological chemistry* 272, 9086-9092.
- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 739-751.
- Carvalho, P., Stanley, A.M., and Rapoport, T.A. (2010). Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell* 143, 579-591.
- Caterina, J.J., Donze, D., Sun, C.W., Ciavatta, D.J., and Townes, T.M. (1994). Cloning and functional characterization of LCR-F1: a bZIP transcription factor that activates erythroid-specific, human globin gene expression. *Nucleic acids research* 22, 2383-2391.
- Chan, J.Y., Han, X.L., and Kan, Y.W. (1993). Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 11371-11375.
- Chan, J.Y., Kwong, M., Lu, R., Chang, J., Wang, B., Yen, T.S., and Kan, Y.W. (1998). Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *The EMBO journal* 17, 1779-1787.
- Chan, K., Han, X.D., and Kan, Y.W. (2001). An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4611-4616.
- Chan, K., and Kan, Y.W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12731-12736.
- Chan, K., Lu, R., Chang, J.C., and Kan, Y.W. (1996). NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13943-13948.
- Chatterjee-Kishore, M., Kishore, R., Hicklin, D.J., Marincola, F.M., and Ferrone, S. (1998). Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 273, 16177-16183.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.

- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d'Hellencourt, C., and Ravanan, P. (2014). A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 213.
- Chen, Y.Y., Chen, G., Fan, Z., Luo, J., and Ke, Z.J. (2008). GSK3beta and endoplasmic reticulum stress mediate rotenone-induced death of SK-N-MC neuroblastoma cells. *Biochemical pharmacology* 76, 128-138.
- Chen, Z.J., and Sun, L.J. (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Molecular cell* 33, 275-286.
- Chepelev, N.L., Zhang, H., Liu, H., McBride, S., Seal, A.J., Morgan, T.E., Finch, C.E., Willmore, W.G., Davies, K.J., and Forman, H.J. (2013). Competition of nuclear factor-erythroid 2 factors related transcription factor isoforms, Nrf1 and Nrf2, in antioxidant enzyme induction. *Redox biology* 1, 183-189.
- Choe, K.P., Przybysz, A.J., and Strange, K. (2009). The WD40 repeat protein WDR-23 functions with the CUL4/DDB1 ubiquitin ligase to regulate nuclear abundance and activity of SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and cellular biology* 29, 2704-2715.
- Chondrogianni, N., and Gonos, E.S. (2012). Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: modulation of components. *Progress in molecular biology and translational science* 109, 41-74.
- Chou, A.P., Li, S., Fitzmaurice, A.G., and Bronstein, J.M. (2010). Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. *Neurotoxicology* 31, 367-372.
- Choy, M.S., Chen, M.J., Manikandan, J., Peng, Z.F., Jenner, A.M., Melendez, A.J., and Cheung, N.S. (2011). Up-regulation of endoplasmic reticulum stress-related genes during the early phase of treatment of cultured cortical neurons by the proteasomal inhibitor lactacystin. *Journal of cellular physiology* 226, 494-510.
- Christianson, J.C., Shaler, T.A., Tyler, R.E., and Kopito, R.R. (2008). OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nature cell biology* 10, 272-282.
- Chu-Ping, M., Vu, J.H., Proske, R.J., Slaughter, C.A., and DeMartino, G.N. (1994). Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *The Journal of biological chemistry* 269, 3539-3547.
- Ciechanover, A. (2005). Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell death and differentiation* 12, 1178-1190.
- Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R., and Hershko, A. (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 761-765.
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., and Diehl, J.A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and cellular biology* 23, 7198-7209.
- Dahlmann, B., Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S., and Kloetzel, P.M. (2000). Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *Journal of molecular biology* 303, 643-653.
- Davies, K.J., and Goldberg, A.L. (1987). Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *The Journal of biological chemistry* 262, 8227-8234.
- DeNicola, G.M., Karreth, F.A., Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., *et al.* (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475, 106-109.
- Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., and Rechsteiner, M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *The Journal of biological chemistry* 269, 7059-7061.
- Devling, T.W., Lindsay, C.D., McLellan, L.I., McMahon, M., and Hayes, J.D. (2005). Utility of siRNA against Keap1 as a strategy to stimulate a cancer chemopreventive phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7280-7285A.
- Diaz-Hernandez, M., Hernandez, F., Martin-Aparicio, E., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Castano, J.G., Ferrer, I., Avila, J., and Lucas, J.J. (2003). Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 11653-11661.
- Ding, Q., Reinacker, K., Dimayuga, E., Nukala, V., Drake, J., Butterfield, D.A., Dunn, J.C., Martin, S., Bruce-Keller, A.J., and Keller, J.N. (2003). Role of the proteasome in protein oxidation and neural viability following low-level oxidative stress. *FEBS letters* 546, 228-232.

- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., and Talalay, P. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 11908-11913.
- Diserens, A.C., de Tribolet, N., Martin-Achard, A., Gaide, A.C., Schnegg, J.F., and Carrel, S. (1981). Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. *Acta neuropathologica* *53*, 21-28.
- Dolfini, D., Gatta, R., and Mantovani, R. (2012). NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *47*, 29-49.
- Dreger, H., Westphal, K., Weller, A., Baumann, G., Stangl, V., Meiners, S., and Stangl, K. (2009). Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection. *Cardiovascular research* *83*, 354-361.
- Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., and Rechsteiner, M. (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *The Journal of biological chemistry* *267*, 22369-22377.
- Dudek, E.J., Shang, F., Valverde, P., Liu, Q., Hobbs, M., and Taylor, A. (2005). Selectivity of the ubiquitin pathway for oxidatively modified proteins: relevance to protein precipitation diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *19*, 1707-1709.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., and Graham, J.B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *80*, 3734-3737.
- Eletto, D., Chevet, E., Argon, Y., and Appenzeller-Herzog, C. (2014). Redox controls UPR to control redox. *Journal of cell science* *127*, 3649-3658.
- Elkharaz, J., Ugun-Klusek, A., Constantin-Teodosiu, D., Lawler, K., Mayer, R.J., Billett, E., Lowe, J., and Bedford, L. (2013). Implications for oxidative stress and astrocytes following 26S proteasomal depletion in mouse forebrain neurones. *Biochimica et biophysica acta* *1832*, 1930-1938.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews. Molecular cell biology* *4*, 181-191.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J.P., Tiwari, S., and Weissman, A.M. (2001). The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 14422-14427.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J., and Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* *268*, 726-731.
- Fleming, J.A., Lightcap, E.S., Sadis, S., Thoroddsen, V., Bulawa, C.E., and Blackman, R.K. (2002). Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 1461-1466.
- Flierman, D., Ye, Y., Dai, M., Chau, V., and Rapoport, T.A. (2003). Polyubiquitin serves as a recognition signal, rather than a ratcheting molecule, during retrotranslocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of biological chemistry* *278*, 34774-34782.
- Fogh, J., Wright, W.C., and Loveless, J.D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute* *58*, 209-214.
- Foss, G.S., and Prydz, H. (1999). Interferon regulatory factor 1 mediates the interferon-gamma induction of the human immunoproteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. *The Journal of biological chemistry* *274*, 35196-35202.
- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A., and Kloetzel, P.M. (1994). 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *Journal of molecular biology* *236*, 975-981.
- Fribley, A., Zeng, Q., and Wang, C.Y. (2004). Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Molecular and cellular biology* *24*, 9695-9704.
- Fricke, B., Heink, S., Steffen, J., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2007). The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum. *EMBO reports* *8*, 1170-1175.
- Fukunaga, K., Kudo, T., Toh-e, A., Tanaka, K., and Saeki, Y. (2010). Dissection of the assembly pathway of the proteasome lid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* *396*, 1048-1053.

- Funakoshi, M., Li, X., Velichutina, I., Hochstrasser, M., and Kobayashi, H. (2004). Sem1, the yeast ortholog of a human BRCA2-binding protein, is a component of the proteasome regulatory particle that enhances proteasome stability. *Journal of cell science* 117, 6447-6454.
- Furuya, N., Ikeda, S., Sato, S., Soma, S., Ezaki, J., Oliva Trejo, J.A., Takeda-Ezaki, M., Fujimura, T., Arikawa-Hirasawa, E., Tada, N., *et al.* (2014). PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy* 10, 631-641.
- Giannini, C., Kloss, A., Gohlke, S., Mishto, M., Nicholson, T.P., Sheppard, P.W., Kloetzel, P.M., and Dahlmann, B. (2013). Poly-Ub-substrate-degradative activity of 26S proteasome is not impaired in the aging rat brain. *PLoS one* 8, e64042.
- Giles, J. (2004). Chemistry Nobel for trio who revealed molecular death-tag. *Nature* 431, 729.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998a). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-623.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., and Finley, D. (1998b). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Molecular and cellular biology* 18, 3149-3162.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.
- Glynn, R., Powis, S.H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L.A., and Trowsdale, J. (1991). A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353, 357-360.
- Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.
- Grimberg, K.B., Beskow, A., Lundin, D., Davis, M.M., and Young, P. (2011). Basic leucine zipper protein Cnc-C is a substrate and transcriptional regulator of the *Drosophila* 26S proteasome. *Molecular and cellular biology* 31, 897-909.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., and Kloetzel, P.M. (1996). A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *European journal of immunology* 26, 863-869.
- Groettrup, M., Ruppert, T., Kuehn, L., Seeger, M., Standera, S., Koszinowski, U., and Kloetzel, P.M. (1995). The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro. *The Journal of biological chemistry* 270, 23808-23815.
- Groettrup, M., Standera, S., Stohwasser, R., and Kloetzel, P.M. (1997). The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 8970-8975.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000a). A gated channel into the proteasome core particle. *Nature structural biology* 7, 1062-1067.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Groll, M., Kim, K.B., Kairies, N., Huber, R., and Crews, C.M. (2000b). Crystal Structure of Epoxomicin: 20S Proteasome Reveals a Molecular Basis for Selectivity of α' , β' -Epoxyketone Proteasome Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, 1237-1238.
- Grune, T., Reinheckel, T., and Davies, K.J. (1996). Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *The Journal of biological chemistry* 271, 15504-15509.
- Grune, T., Reinheckel, T., Joshi, M., and Davies, K.J. (1995). Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *The Journal of biological chemistry* 270, 2344-2351.
- Gu, Z.C., and Enenkel, C. (2014). Proteasome assembly. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 4729-4745.
- Han, W., Ming, M., Zhao, R., Pi, J., Wu, C., and He, Y.Y. (2012). Nrf1 CNC-bZIP Protein Promotes Cell Survival and Nucleotide Excision Repair through Maintaining Glutathione Homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 287, 18788-18795.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000a). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell* 6, 1099-1108.

- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000b). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Molecular cell* 5, 897-904.
- Hartley, A., Stone, J.M., Heron, C., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. (1994). Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 63, 1987-1990.
- Hartmann-Petersen, R., Tanaka, K., and Hendil, K.B. (2001). Quaternary structure of the ATPase complex of human 26S proteasomes determined by chemical cross-linking. *Archives of biochemistry and biophysics* 386, 89-94.
- Hayes, J.D., and Dinkova-Kostova, A.T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences* 39, 199-218.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Molecular biology of the cell* 10, 3787-3799.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D.H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *The Journal of biological chemistry* 272, 25200-25209.
- Heinemeyer, W., Trondle, N., Albrecht, G., and Wolf, D.H. (1994). PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry* 33, 12229-12237.
- Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2005). IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 9241-9246.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* 73, 1019-1049.
- Hemion, C., Flammer, J., and Neutzner, A. (2014). Quality control of oxidatively damaged mitochondrial proteins is mediated by p97 and the proteasome. *Free radical biology & medicine*.
- Hendil, K.B., Khan, S., and Tanaka, K. (1998). Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *The Biochemical journal* 332 (Pt 3), 749-754.
- Hershko, A. (1996). Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends in biochemical sciences* 21, 445-449.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *The Journal of biological chemistry* 258, 8206-8214.
- Hetz, C., Chevet, E., and Harding, H.P. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* 12, 703-719.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M., and Wolf, D.H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Molecular cell* 24, 977-984.
- Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437, 1381-1385.
- Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., Kato, K., Tanaka, K., and Murata, S. (2008). Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *The EMBO journal* 27, 2204-2213.
- Hirotsu, Y., Hataya, N., Katsuoka, F., and Yamamoto, M. (2012). NF-E2-related factor 1 (Nrf1) serves as a novel regulator of hepatic lipid metabolism through regulation of the Lipin1 and PGC-1beta genes. *Molecular and cellular biology* 32, 2760-2770.
- Hirotsu, Y., Higashi, C., Fukutomi, T., Katsuoka, F., Tsujita, T., Yagishita, Y., Matsuyama, Y., Motohashi, H., Uruno, A., and Yamamoto, M. (2014). Transcription factor NF-E2-related factor 1 impairs glucose metabolism in mice. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 19, 650-665.
- Hirsch, C., Gauss, R., Horn, S.C., Neuber, O., and Sommer, T. (2009). The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* 458, 453-460.
- Ho, D.V., and Chan, J.Y. (2015). Induction of Herpud1 expression by ER stress is regulated by Nrf1. *FEBS letters* 589, 615-620.
- Hoglinger, G.U., Carrard, G., Michel, P.P., Medja, F., Lombes, A., Ruberg, M., Friguet, B., and Hirsch, E.C. (2003). Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between

- two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* **86**, 1297-1307.
- Hosokawa, N., Wada, I., Nagasawa, K., Moriyama, T., Okawa, K., and Nagata, K. (2008). Human XTP3-B forms an endoplasmic reticulum quality control scaffold with the HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex and BiP. *The Journal of biological chemistry* **283**, 20914-20924.
- Hu, R., Xu, C., Shen, G., Jain, M.R., Khor, T.O., Gopalkrishnan, A., Lin, W., Reddy, B., Chan, J.Y., and Kong, A.N. (2006). Gene expression profiles induced by cancer chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in the liver of C57BL/6J mice and C57BL/6J/Nrf2 (-/-) mice. *Cancer letters* **243**, 170-192.
- Huang, L.L., Shang, F., Nowell, T.R., Jr., and Taylor, A. (1995). Degradation of differentially oxidized alpha-crystallins in bovine lens epithelial cells. *Experimental eye research* **61**, 45-54.
- Huber, E.M., Basler, M., Schwab, R., Heinemeyer, W., Kirk, C.J., Groettrup, M., and Groll, M. (2012). Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* **148**, 727-738.
- Hughes, B.T., Nwosu, C.C., and Espenshade, P.J. (2009). Degradation of sterol regulatory element-binding protein precursor requires the endoplasmic reticulum-associated degradation components Ubc7 and Hrd1 in fission yeast. *The Journal of biological chemistry* **284**, 20512-20521.
- Husberg, C., Murphy, P., Bjorgo, E., Kalland, K.H., and Kolsto, A.B. (2003). Cellular localisation and nuclear export of the human bZIP transcription factor TCF11. *Biochimica et biophysica acta* **1640**, 143-151.
- Husberg, C., Murphy, P., Martin, E., and Kolsto, A.B. (2001). Two domains of the human bZIP transcription factor TCF11 are necessary for transactivation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 17641-17652.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., and Dikic, I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* **453**, 481-488.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., *et al.* (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications* **236**, 313-322.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* **13**, 76-86.
- Jacob, A., Zhang, Y., and George, A. (2014). Transcriptional regulation of dentin matrix protein 1 (DMP1) in odontoblasts and osteoblasts. *Connect Tissue Res* **55 Suppl 1**, 107-112.
- Jain, A.K., and Jaiswal, A.K. (2006). Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *The Journal of biological chemistry* **281**, 12132-12142.
- Jaiswal, A.K. (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free radical biology & medicine* **36**, 1199-1207.
- Jantas, D., Roman, A., Kusmierczyk, J., Lorenc-Koci, E., Konieczny, J., Lenda, T., and Lason, W. (2013). The extent of neurodegeneration and neuroprotection in two chemical in vitro models related to Parkinson's disease is critically dependent on cell culture conditions. *Neurotoxicity research* **24**, 41-54.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H., and Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nature cell biology* **4**, 134-139.
- Jiang, L.Q., Wen, S.J., Wang, H.Y., and Chen, L.Y. (2002). Screening the proteins that interact with calpain in a human heart cDNA library using a yeast two-hybrid system. *Hypertens Res* **25**, 647-652.
- Johnsen, O., Skammelsrud, N., Luna, L., Nishizawa, M., Prydz, H., and Kolsto, A.B. (1996). Small Maf proteins interact with the human transcription factor TCF11/Nrf1/LCR-F1. *Nucleic acids research* **24**, 4289-4297.
- Ju, D., Wang, L., Mao, X., and Xie, Y. (2004). Homeostatic regulation of the proteasome via an Rpn4-dependent feedback circuit. *Biochemical and biophysical research communications* **321**, 51-57.
- Kahn, N.W., Rea, S.L., Moyle, S., Kell, A., and Johnson, T.E. (2008). Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical journal* **409**, 205-213.
- Kanapin, A., Batalov, S., Davis, M.J., Gough, J., Grimmond, S., Kawaji, H., Magrane, M., Matsuda, H., Schonbach, C., Teasdale, R.D., *et al.* (2003). Mouse proteome analysis. *Genome research* **13**, 1335-1344.

- Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2009). Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell* 137, 914-925.
- Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G., and Yamamoto, M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2046-2051.
- Kelly, A., Powis, S.H., Glynn, R., Radley, E., Beck, S., and Trowsdale, J. (1991). Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353, 667-668.
- Kisselev, A.F., and Goldberg, A.L. (2001). Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemistry & biology* 8, 739-758.
- Kloetzel, P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 179-187.
- Kloetzel, P.M. (2004). Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TAP. *Nature immunology* 5, 661-669.
- Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Molecular and cellular biology* 24, 7130-7139.
- Kobayashi, A., Tsukide, T., Miyasaka, T., Morita, T., Mizoroki, T., Saito, Y., Ihara, Y., Takashima, A., Noguchi, N., Fukamizu, A., *et al.* (2011). Central nervous system-specific deletion of transcription factor Nrf1 causes progressive motor neuronal dysfunction. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 16, 692-703.
- Koch, A., Steffen, J., and Kruger, E. (2011). TCF11 at the crossroads of oxidative stress and the ubiquitin proteasome system. *Cell Cycle* 10, 1200-1207.
- Kock, M., Nunes, M.M., Hemann, M., Kube, S., Jurgen Dohmen, R., Herzog, F., Ramos, P.C., and Wendler, P. (2015). Proteasome assembly from 15S precursors involves major conformational changes and recycling of the Pba1-Pba2 chaperone. *Nature communications* 6, 6123.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions* 37, 937-953.
- Kotamraju, S., Matalon, S., Matsunaga, T., Shang, T., Hickman-Davis, J.M., and Kalyanaraman, B. (2006). Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free radical biology & medicine* 40, 1034-1044.
- Kriegenburg, F., Poulsen, E.G., Koch, A., Kruger, E., and Hartmann-Petersen, R. (2011). Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & redox signaling* 15, 2265-2299.
- Kruger, E., and Kloetzel, P.M. (2012). Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Current opinion in immunology* 24, 77-83.
- Kuhn, D.J., Hunsucker, S.A., Chen, Q., Voorhees, P.M., Orlowski, M., and Orlowski, R.Z. (2009). Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood* 113, 4667-4676.
- Kwak, M.K., Itoh, K., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2002). Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Molecular and cellular biology* 22, 2883-2892.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Greenlaw, J.L., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2003a). Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 23, 8786-8794.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2003b). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *The Journal of biological chemistry* 278, 8135-8145.
- Kwong, E.K., Kim, K.M., Penalosa, P.J., and Chan, J.Y. (2012). Characterization of Nrf1b, a novel isoform of the nuclear factor-erythroid-2 related transcription factor-1 that activates antioxidant response element-regulated genes. *PloS one* 7, e48404.
- Kwong, M., Kan, Y.W., and Chan, J.Y. (1999). The CNC basic leucine zipper factor, Nrf1, is essential for cell survival in response to oxidative stress-inducing agents. Role for Nrf1 in gamma-gcs(I) and gss expression in mouse fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 274, 37491-37498.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., and Pickart, C.M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-767.
- Lee, C.S., Ho, D.V., and Chan, J.Y. (2013). Nuclear factor-erythroid 2-related factor 1 regulates expression of proteasome genes in hepatocytes and protects against endoplasmic reticulum stress and steatosis in mice. *The FEBS journal* 280, 3609-3620.
- Lee, C.S., Lee, C., Hu, T., Nguyen, J.M., Zhang, J., Martin, M.V., Vawter, M.P., Huang, E.J., and Chan, J.Y. (2011). Loss of nuclear factor E2-related factor 1 in the brain leads to dysregulation of proteasome gene expression and neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 8408-8413.
- Lee, O.H., Jain, A.K., Papusha, V., and Jaiswal, A.K. (2007). An auto-regulatory loop between stress sensors INrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance. *The Journal of biological chemistry* 282, 36412-36420.
- Leung, L., Kwong, M., Hou, S., Lee, C., and Chan, J.Y. (2003). Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 278, 48021-48029.
- Lev, N., Melamed, E., and Offen, D. (2006). Proteasomal inhibition hypersensitizes differentiated neuroblastoma cells to oxidative damage. *Neuroscience letters* 399, 27-32.
- Li, F., Gao, B., Dong, H., Shi, J., and Fang, D. (2015). Icaritin induces synoviolin expression through NFE2L1 to protect neurons from ER stress-induced apoptosis. *PloS one* 10, e0119955.
- Li, W., Yu, S.W., and Kong, A.N. (2006). Nrf2 possesses a redox-sensitive nuclear exporting signal in the Neh5 transactivation domain. *The Journal of biological chemistry* 281, 27251-27263.
- Li, X., Matilainen, O., Jin, C., Glover-Cutter, K.M., Holmberg, C.I., and Blackwell, T.K. (2011). Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity. *PLoS genetics* 7, e1002119.
- Liang, J., Yin, C., Doong, H., Fang, S., Peterhoff, C., Nixon, R.A., and Monteiro, M.J. (2006). Characterization of erasin (UBXD2): a new ER protein that promotes ER-associated protein degradation. *Journal of cell science* 119, 4011-4024.
- Lilley, B.N., and Ploegh, H.L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-840.
- Loukissa, A., Cardozo, C., Altschuller-Felberg, C., and Nelson, J.E. (2000). Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity. *Cytokine* 12, 1326-1330.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
- Luna, L., Johnsen, O., Skartlien, A.H., Pedeutour, F., Turc-Carel, C., Prydz, H., and Kolsto, A.B. (1994). Molecular cloning of a putative novel human bZIP transcription factor on chromosome 17q22. *Genomics* 22, 553-562.
- Luna, L., Skammelsrud, N., Johnsen, O., Abel, K.J., Weber, B.L., Prydz, H., and Kolsto, A.B. (1995). Structural organization and mapping of the human TCF11 gene. *Genomics* 27, 237-244.
- Lundgren, J., Masson, P., Mirzaei, Z., and Young, P. (2005). Identification and characterization of a *Drosophila* proteasome regulatory network. *Molecular and cellular biology* 25, 4662-4675.
- Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions* 224C, 164-175.
- MacKenzie, E.L., Ray, P.D., and Tsuji, Y. (2008). Role and regulation of ferritin H in rotenone-mediated mitochondrial oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 44, 1762-1771.
- Maharjan, S., Oku, M., Tsuda, M., Hoseki, J., and Sakai, Y. (2014). Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Scientific reports* 4, 5896.
- Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I., and Feldmann, H. (1999). Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS letters* 450, 27-34.
- Manni, I., Caretti, G., Artuso, S., Gurtner, A., Emiliozzi, V., Sacchi, A., Mantovani, R., and Piaggio, G. (2008). Posttranslational regulation of NF-YA modulates NF-Y transcriptional activity. *Molecular biology of the cell* 19, 5203-5213.
- Mantovani, R. (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239, 15-27.
- McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2006). Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *The Journal of biological chemistry* 281, 24756-24768.

- McNaught, K.S., Jnobaptiste, R., Jackson, T., and Jengelley, T.A. (2010). The pattern of neuronal loss and survival may reflect differential expression of proteasome activators in Parkinson's disease. *Synapse* 64, 241-250.
- McNeill, H., Knebel, A., Arthur, J.S., Cuenda, A., and Cohen, P. (2004). A novel UBA and UBX domain protein that binds polyubiquitin and VCP and is a substrate for SAPKs. *The Biochemical journal* 384, 391-400.
- Medicherla, B., and Goldberg, A.L. (2008). Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *The Journal of cell biology* 182, 663-673.
- Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A., and Wolf, D.H. (2004). A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO reports* 5, 692-697.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2003). Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *The Journal of biological chemistry* 278, 21517-21525.
- Metzger, M.B., Hristova, V.A., and Weissman, A.M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of cell science* 125, 531-537.
- Mishto, M., Bellavista, E., Ligorio, C., Textoris-Taube, K., Santoro, A., Giordano, M., D'Alfonso, S., Listi, F., Nacmias, B., Cellini, E., *et al.* (2010). Immunoproteasome LMP2 60HH variant alters MBP epitope generation and reduces the risk to develop multiple sclerosis in Italian female population. *PloS one* 5, e9287.
- Mishto, M., Bellavista, E., Santoro, A., Stolzing, A., Ligorio, C., Nacmias, B., Spazzafumo, L., Chiappelli, M., Licastro, F., Sorbi, S., *et al.* (2006). Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of aging* 27, 54-66.
- Molofsky, A.V., Glasgow, S.M., Chaboub, L.S., Tsai, H.H., Murnen, A.T., Kelley, K.W., Fancy, S.P., Yuen, T.J., Madireddy, L., Baranzini, S., *et al.* (2013). Expression profiling of Aldh1l1-precursors in the developing spinal cord reveals glial lineage-specific genes and direct Sox9-Nfe2l1 interactions. *Glia* 61, 1518-1532.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155, 335-350.
- Myhrstad, M.C., Husberg, C., Murphy, P., Nordstrom, O., Blomhoff, R., Moskaug, J.O., and Kolsto, A.B. (2001). TCF11/Nrf1 overexpression increases the intracellular glutathione level and can transactivate the gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) heavy subunit promoter. *Biochimica et biophysica acta* 1517, 212-219.
- Namiki, S., Nakamura, T., Oshima, S., Yamazaki, M., Sekine, Y., Tsuchiya, K., Okamoto, R., Kanai, T., and Watanabe, M. (2005). IRF-1 mediates upregulation of LMP7 by IFN-gamma and concerted expression of immunosubunits of the proteasome. *FEBS letters* 579, 2781-2787.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B., and Monaco, J.J. (1997). Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *The EMBO journal* 16, 5363-5375.
- Narayanan, K., Ramachandran, A., Peterson, M.C., Hao, J., Kolsto, A.B., Friedman, A.D., and George, A. (2004). The CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)beta and Nrf1 interact to regulate dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene expression during odontoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* 279, 45423-45432.
- Nikaido, T., Shimada, K., Shibata, M., Hata, M., Sakamoto, M., Takasaki, Y., Sato, C., Takahashi, T., and Nishida, Y. (1990). Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved nuclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology* 79, 209-214.
- Noda, C., Tanahashi, N., Shimbara, N., Hendil, K.B., and Tanaka, K. (2000). Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 277, 348-354.
- Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Jr., Lee, K.P., and Boise, L.H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107, 4907-4916.
- Oh, D.H., Rigas, D., Cho, A., and Chan, J.Y. (2012). Deficiency in the nuclear-related factor erythroid 2 transcription factor (Nrf1) leads to genetic instability. *The FEBS journal* 279, 4121-4130.
- Ohtsui, M., Katsuoka, F., Kobayashi, A., Aburatani, H., Hayes, J.D., and Yamamoto, M. (2008). Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *The Journal of biological chemistry* 283, 33554-33562.
- Okuda-Shimizu, Y., and Hendershot, L.M. (2007). Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Molecular cell* 28, 544-554.

- Olzmann, J.A., Kopito, R.R., and Christianson, J.C. (2013). The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.
- Orre, M., Kamphuis, W., Dooves, S., Kooijman, L., Chan, E.T., Kirk, C.J., Dimayuga Smith, V., Koot, S., Mamber, C., Jansen, A.H., *et al.* (2013). Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology* 136, 1415-1431.
- Pacifici, R.E., Salo, D.C., and Davies, K.J. (1989). Macroxyproteinase (M.O.P.): a 670 kDa proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free radical biology & medicine* 7, 521-536.
- Paraskevopoulos, K., Kriegenburg, F., Tatham, M.H., Rosner, H.I., Medina, B., Larsen, I.B., Brandstrup, R., Hardwick, K.G., Hay, R.T., Kragelund, B.B., *et al.* (2014). Dss1 is a 26S proteasome ubiquitin receptor. *Molecular cell* 56, 453-461.
- Park, S., Li, X., Kim, H.M., Singh, C.R., Tian, G., Hoyt, M.A., Lovell, S., Battaile, K.P., Zolkiewski, M., Coffino, P., *et al.* (2013). Reconfiguration of the proteasome during chaperone-mediated assembly. *Nature* 497, 512-516.
- Pickering, A.M., and Davies, K.J. (2012). Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Progress in molecular biology and translational science* 109, 227-248.
- Pickering, A.M., Koop, A.L., Teoh, C.Y., Ermak, G., Grune, T., and Davies, K.J. (2010). The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28alpha-beta proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *The Biochemical journal* 432, 585-594.
- Pickering, A.M., Linder, R.A., Zhang, H., Forman, H.J., and Davies, K.J. (2012). Nrf2-dependent induction of proteasome and Pa28alpha-beta regulator are required for adaptation to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 287, 10021-10031.
- Pilon, M., Schekman, R., and Romisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *The EMBO journal* 16, 4540-4548.
- Pirlich, M., Muller, C., Sandig, G., Jakstadt, M., Sitte, N., Lochs, H., and Grune, T. (2002). Increased proteolysis after single-dose exposure with hepatotoxins in HepG2 cells. *Free radical biology & medicine* 33, 283-291.
- Plempner, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., and Wolf, D.H. (1997). Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388, 891-895.
- Pratt, W.B., Morishima, Y., Peng, H.M., and Osawa, Y. (2010). Proposal for a role of the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery in making triage decisions when proteins undergo oxidative and toxic damage. *Experimental biology and medicine* 235, 278-289.
- Priyadarshi, A., Khuder, S.A., Schaub, E.A., and Priyadarshi, S.S. (2001). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environmental research* 86, 122-127.
- Rada, P., Rojo, A.I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J.D., and Cuadrado, A. (2011). SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Molecular and cellular biology* 31, 1121-1133.
- Radhakrishnan, S.K., den Besten, W., and Deshaies, R.J. (2014). p97-dependent retrotranslocation and proteolytic processing govern formation of active Nrf1 upon proteasome inhibition. *eLife* 3, e01856.
- Radhakrishnan, S.K., Lee, C.S., Young, P., Beskow, A., Chan, J.Y., and Deshaies, R.J. (2010). Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Molecular cell* 38, 17-28.
- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450, 663-669.
- Ravid, T., Kreft, S.G., and Hochstrasser, M. (2006). Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *The EMBO journal* 25, 533-543.
- Redman, K.L., and Rechsteiner, M. (1989). Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature* 338, 438-440.
- Rivett, A.J. (1985). Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *The Journal of biological chemistry* 260, 300-305.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Roelofs, J., Park, S., Haas, W., Tian, G., McAllister, F.E., Huo, Y., Lee, B.H., Zhang, F., Shi, Y., Gygi, S.P., *et al.* (2009). Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly. *Nature* 459, 861-865.
- Rosenzweig, R., Osmulski, P.A., Gaczynska, M., and Glickman, M.H. (2008). The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nature structural & molecular biology* 15, 573-580.

- Rotin, D., and Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 398-409.
- Rushmore, T.H., Morton, M.R., and Pickett, C.B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *The Journal of biological chemistry* 266, 11632-11639.
- Rushworth, S.A., Zaitseva, L., Murray, M.Y., Shah, N.M., Bowles, K.M., and MacEwan, D.J. (2012). The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF-kappaB and underlies its chemo-resistance. *Blood* 120, 5188-5198.
- Samali, A., Fitzgerald, U., Deegan, S., and Gupta, S. (2010). Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *International journal of cell biology* 2010, 830307.
- Samantaray, S., Knaryan, V.H., Guyton, M.K., Matzelle, D.D., Ray, S.K., and Banik, N.L. (2007). The parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. *Neuroscience* 146, 741-755.
- Satoh, T., Saeki, Y., Hiromoto, T., Wang, Y.H., Uekusa, Y., Yagi, H., Yoshihara, H., Yagi-Utsumi, M., Mizushima, T., Tanaka, K., *et al.* (2014). Structural basis for proteasome formation controlled by an assembly chaperone nas2. *Structure* 22, 731-743.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T., and Gey, G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of experimental medicine* 97, 695-710.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frommel, C., Lowe, J., Huber, R., Kloetzel, P.M., and Schmidt, M. (1996). Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. *The EMBO journal* 15, 6887-6898.
- Schoenheimer, R., Ratner, S., and Rittenberg, D. (1939). The Process of Continuous Deamination and Reamination of Amino Acids in the Proteins of Normal Animals. *Science* 89, 272-273.
- Schröter, F. (2012) Das induzierbare Ubiquitin-Proteasom System in Neuronen unter pro-inflammatorischen Bedingungen. Dissertation, Charité – Universitätsmedizin Berlin
- Schultz, M.A., Hagan, S.S., Datta, A., Zhang, Y., Freeman, M.L., Sikka, S.C., Abdel-Mageed, A.B., and Mondal, D. (2014). Nrf1 and Nrf2 transcription factors regulate androgen receptor transactivation in prostate cancer cells. *PloS one* 9, e87204.
- Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., and Baumeister, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 268, 579-582.
- Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., *et al.* (2010). Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 142, 613-624.
- Sha, W., Martins, A.M., Laubenbacher, R., Mendes, P., and Shulaev, V. (2013). The genome-wide early temporal response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by cumene hydroperoxide. *PloS one* 8, e74939.
- Sha, Z., and Goldberg, A.L. (2014). Proteasome-Mediated Processing of Nrf1 Is Essential for Coordinate Induction of All Proteasome Subunits and p97. *Current biology : CB*.
- Shabek, N., and Ciechanover, A. (2010). Degradation of ubiquitin: the fate of the cellular reaper. *Cell Cycle* 9, 523-530.
- Shamoto-Nagai, M., Maruyama, W., Kato, Y., Isobe, K., Tanaka, M., Naoi, M., and Osawa, T. (2003). An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, inactivates proteasome by oxidative modification and induces aggregation of oxidized proteins in SH-SY5Y cells. *Journal of neuroscience research* 74, 589-597.
- Shang, F., Nowell, T.R., Jr., and Taylor, A. (2001). Removal of oxidatively damaged proteins from lens cells by the ubiquitin-proteasome pathway. *Experimental eye research* 73, 229-238.
- Shang, F., and Taylor, A. (2011). Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 51, 5-16.
- Shen, H.M., and Liu, Z.G. (2006). JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free radical biology & medicine* 40, 928-939.
- Shin, E.C., Seifert, U., Kato, T., Rice, C.M., Feinstone, S.M., Kloetzel, P.M., and Rehmann, B. (2006). Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *The Journal of clinical investigation* 116, 3006-3014.
- Shirozu, R., Yashiroda, H., and Murata, S. (2015). Identification of minimum Rpn4-responsive elements in genes related to proteasome functions. *FEBS letters* 589, 933-940.

- Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., and Davies, K.J. (2003). Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278, 311-318.
- Sidrauski, C., and Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90, 1031-1039.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology* 4, 180-183.
- Smith, D.M., Kafri, G., Cheng, Y., Ng, D., Walz, T., and Goldberg, A.L. (2005). ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. *Molecular cell* 20, 687-698.
- Sommer, T., and Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365, 176-179.
- Soriano, F.X., Baxter, P., Murray, L.M., Sporn, M.B., Gillingwater, T.H., and Hardingham, G.E. (2009). Transcriptional regulation of the AP-1 and Nrf2 target gene sulfiredoxin. *Molecules and cells* 27, 279-282.
- Stadtmueller, B.M., and Hill, C.P. (2011). Proteasome activators. *Molecular cell* 41, 8-19.
- Stadtmueller, B.M., Kish-Trier, E., Ferrell, K., Petersen, C.N., Robinson, H., Myszka, D.G., Eckert, D.M., Formosa, T., and Hill, C.P. (2012). Structure of a proteasome Pba1-Pba2 complex: implications for proteasome assembly, activation, and biological function. *The Journal of biological chemistry* 287, 37371-37382.
- Steffen, J. (2010) Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systemen in Säugetierzellen durch den Transkriptionsfaktor TCF11. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
- Steffen, J., Seeger, M., Koch, A., and Kruger, E. (2010). Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Molecular cell* 40, 147-158.
- Sun, Z., Chin, Y.E., and Zhang, D.D. (2009). Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Molecular and cellular biology* 29, 2658-2672.
- Sun, Z., Zhang, S., Chan, J.Y., and Zhang, D.D. (2007). Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Molecular and cellular biology* 27, 6334-6349.
- Sykiotis, G.P., and Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Science signaling* 3, re3.
- Tanahashi, N., Yokota, K., Ahn, J.Y., Chung, C.H., Fujiwara, T., Takahashi, E., DeMartino, G.N., Slaughter, C.A., Toyonaga, T., Yamamura, K., *et al.* (1997). Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma-interferon regulation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2, 195-211.
- Todeschini, A.L., Georges, A., and Veitia, R.A. (2014). Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. *Trends in genetics : TIG* 30, 211-219.
- Tong, K.I., Kato, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., and Yamamoto, M. (2006). Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Molecular and cellular biology* 26, 2887-2900.
- Tsuchiya, Y., Morita, T., Kim, M., Iemura, S., Natsume, T., Yamamoto, M., and Kobayashi, A. (2011). Dual regulation of the transcriptional activity of Nrf1 by beta-TrCP- and Hrd1-dependent degradation mechanisms. *Molecular and cellular biology* 31, 4500-4512.
- Tsuchiya, Y., Taniguchi, H., Ito, Y., Morita, T., Karim, M.R., Ohtake, N., Fukagai, K., Ito, T., Okamuro, S., Iemura, S., *et al.* (2013). The casein kinase 2-nrf1 axis controls the clearance of ubiquitinated proteins by regulating proteasome gene expression. *Molecular and cellular biology* 33, 3461-3472.
- Tsujita, T., Peirce, V., Baird, L., Matsuyama, Y., Takaku, M., Walsh, S.V., Griffin, J.L., Uruno, A., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2014). Transcription factor Nrf1 negatively regulates the cystine/glutamate transporter and lipid-metabolizing enzymes. *Molecular and cellular biology* 34, 3800-3816.
- Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., and Tsukihara, T. (2002). The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 10, 609-618.
- van der Mark, M., Brouwer, M., Kromhout, H., Nijssen, P., Huss, A., and Vermeulen, R. (2012). Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. *Environmental health perspectives* 120, 340-347.
- Venugopal, R., and Jaiswal, A.K. (1996). Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14960-14965.

- Venugopal, R., and Jaiswal, A.K. (1998). Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 17, 3145-3156.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615.
- Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., *et al.* (2003). Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nature genetics* 35, 238-245.
- Wang, W., and Chan, J.Y. (2006). Nrf1 is targeted to the endoplasmic reticulum membrane by an N-terminal transmembrane domain. Inhibition of nuclear translocation and transacting function. *The Journal of biological chemistry* 281, 19676-19687.
- Wang, W., Kwok, A.M., and Chan, J.Y. (2007). The p65 isoform of Nrf1 is a dominant negative inhibitor of ARE-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry* 282, 24670-24678.
- Wang, X., Xu, H., Ju, D., and Xie, Y. (2008). Disruption of Rpn4-induced proteasome expression in *Saccharomyces cerevisiae* reduces cell viability under stressed conditions. *Genetics* 180, 1945-1953.
- Warnatsch, A., Bergann, T., and Kruger, E. (2013). Oxidation matters: the ubiquitin proteasome system connects innate immune mechanisms with MHC class I antigen presentation. *Molecular immunology* 55, 106-109.
- Webster, J.M., Tiwari, S., Weissman, A.M., and Wojcikiewicz, R.J. (2003). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination is mediated by mammalian Ubc7, a component of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway, and is inhibited by chelation of intracellular Zn²⁺. *The Journal of biological chemistry* 278, 38238-38246.
- Weidinger, A., and Kozlov, A.V. (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 5, 472-484.
- Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A., and Vuust, J. (1985). The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *The EMBO journal* 4, 755-759.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., and Ploegh, H.L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, 432-438.
- Wilk, S., and Orłowski, M. (1983). Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *Journal of neurochemistry* 40, 842-849.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *Journal of molecular biology* 301, 1-9.
- Wojcik, C., and DeMartino, G.N. (2002). Analysis of *Drosophila* 26 S proteasome using RNA interference. *The Journal of biological chemistry* 277, 6188-6197.
- Wojcik, C., and Wilk, S. (1999). Changes in proteasome expression and activity during differentiation of neuronal precursor NTERA 2 clone D1 cells. *Neurochemistry international* 34, 131-136.
- Wu, K.C., Cui, J.Y., and Klaassen, C.D. (2011). Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 123, 590-600.
- Xie, Y., and Varshavsky, A. (2001). RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 3056-3061.
- Xing, W., Singgih, A., Kapoor, A., Alarcon, C.M., Baylink, D.J., and Mohan, S. (2007). Nuclear factor-E2-related factor-1 mediates ascorbic acid induction of osterix expression via interaction with antioxidant-responsive element in bone cells. *The Journal of biological chemistry* 282, 22052-22061.
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z., and Wang, T. (2012). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Critical reviews in toxicology* 42, 613-632.
- Xu, H., Fu, J., Ha, S.W., Ju, D., Zheng, J., Li, L., and Xie, Y. (2012). The CCAAT box-binding transcription factor NF-Y regulates basal expression of human proteasome genes. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 818-825.
- Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137, 133-145.

- Yao, T., Song, L., Xu, W., DeMartino, G.N., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Cohen, R.E. (2006). Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nature cell biology* 8, 994-1002.
- Yap, Y.W., Chen, M.J., Peng, Z.F., Manikandan, J., Ng, J.M., Llanos, R.M., La Fontaine, S., Beart, P.M., and Cheung, N.S. (2013). Gene expression profiling of rotenone-mediated cortical neuronal death: evidence for inhibition of ubiquitin-proteasome system and autophagy-lysosomal pathway, and dysfunction of mitochondrial and calcium signaling. *Neurochemistry international* 62, 653-663.
- Ye, Y., Meyer, H.H., and Rapoport, T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *The Journal of cell biology* 162, 71-84.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T.A. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-847.
- Yi, J.J., and Ehlers, M.D. (2007). Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev* 59, 14-39.
- Yin, D., Zhou, H., Kumagai, T., Liu, G., Ong, J.M., Black, K.L., and Koeffler, H.P. (2005). Proteasome inhibitor PS-341 causes cell growth arrest and apoptosis in human glioblastoma multiforme (GBM). *Oncogene* 24, 344-354.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- Yu, Z., Livnat-Levanon, N., Kleifeld, O., Mansour, W., Nakasone, M.A., Castaneda, C.A., Dixon, E.K., Fushman, D., Reis, N., Pick, E., *et al.* (2015). Base-CP proteasome can serve as a platform for stepwise lid formation. *Bioscience reports*.
- Zeevalk, G.D., and Bernard, L.P. (2005). Energy status, ubiquitin proteasomal function, and oxidative stress during chronic and acute complex I inhibition with rotenone in mesencephalic cultures. *Antioxidants & redox signaling* 7, 662-672.
- Zhang, Y., Crouch, D.H., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2006). Negative regulation of the Nrf1 transcription factor by its N-terminal domain is independent of Keap1: Nrf1, but not Nrf2, is targeted to the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal* 399, 373-385.
- Zhang, Y., and Hayes, J.D. (2010). Identification of topological determinants in the N-terminal domain of transcription factor Nrf1 that control its orientation in the endoplasmic reticulum membrane. *The Biochemical journal* 430, 497-510.
- Zhang, Y., and Hayes, J.D. (2013). The membrane-topogenic vectorial behaviour of Nrf1 controls its post-translational modification and transactivation activity. *Scientific reports* 3, 2006.
- Zhang, Y., Lucocq, J.M., and Hayes, J.D. (2009). The Nrf1 CNC/bZIP protein is a nuclear envelope-bound transcription factor that is activated by t-butyl hydroquinone but not by endoplasmic reticulum stressors. *The Biochemical journal* 418, 293-310.
- Zhang, Y., Lucocq, J.M., Yamamoto, M., and Hayes, J.D. (2007). The NHB1 (N-terminal homology box 1) sequence in transcription factor Nrf1 is required to anchor it to the endoplasmic reticulum and also to enable its asparagine-glycosylation. *The Biochemical journal* 408, 161-172.
- Zhang, Y., Nicholatos, J., Dreier, J.R., Ricoult, S.J., Widenmaier, S.B., Hotamisligil, G.S., Kwiatkowski, D.J., and Manning, B.D. (2014a). Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1. *Nature*.
- Zhang, Y., Qiu, L., Li, S., Xiang, Y., Chen, J., and Ren, Y. (2014b). The C-terminal domain of Nrf1 negatively regulates the full-length CNC-bZIP factor and its shorter isoform LCR-F1/Nrf1beta; both are also inhibited by the small dominant-negative Nrf1gamma/delta isoforms that down-regulate ARE-battery gene expression. *PLoS one* 9, e109159.
- Zhang, Y., Ren, Y., Li, S., and Hayes, J.D. (2014c). Transcription factor Nrf1 is topologically repartitioned across membranes to enable target gene transactivation through its acidic glucose-responsive domains. *PLoS one* 9, e93458.
- Zhao, R., Hou, Y., Xue, P., Woods, C.G., Fu, J., Feng, B., Guan, D., Sun, G., Chan, J.Y., Waalkes, M.P., *et al.* (2011). Long isoforms of NRF1 contribute to arsenic-induced antioxidant response in human keratinocytes. *Environmental health perspectives* 119, 56-62.
- Zheng, H., Fu, J., Xue, P., Zhao, R., Dong, J., Liu, D., Yamamoto, M., Tong, Q., Teng, W., Qu, W., *et al.* (2015). CNC-bZIP protein Nrf1-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Antioxidants & redox signaling* 22, 819-831.
- Zwickl, P., Grziwa, A., Puhler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F., and Baumeister, W. (1992). Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry* 31, 964-972.

6. Abkürzungsverzeichnis

AA	Ascorbinsäure
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE/EpRE	<i>antioxidant/electrophil response elements</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BiP/GRP78/HSPA5	<i>binding immunoglobulin protein/glucose-regulated protein 78/ heat shock 70kDa protein 5</i>
BTZ	Bortezomib
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CHIP	<i>C-terminus of Hsc70-interacting protein</i>
CHX	Cycloheximid
C'n'C	<i>Cap'n'Collar</i>
CPRG	Chlorphenolro- β -D-Galactopyranosid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCF	2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein
DCFH/ DCFH-DA	2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein/2',7' Dichlorofluorescein-Diacetat
diff./undiff.	Differenziert/undifferenziert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO (D)	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazon
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF2 α	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2alpha
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Epox (E)	Epoxomicin
ER	endoplasmatischen Retikulums
ERAD	ER-assoziiertes Degradationssystem
ERQC	ER-Qualitätskontrolle
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	Fötale Kälberserum
GADD34	<i>growth arrest and DNA damage-inducible 34</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	γ -Glutamylcystein-Synthetase
gDNA	genomische DNA

GE	Gelelektrophorese
Ggf.	gegebenenfalls
GRP94/HSP90B1	<i>glucose-regulated protein 94/ heat shock protein 90kDa beta 1</i>
GSK3 β	Glykogensynthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-transferase
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HECT	<i>homologous to the E6AP carboxyl terminus</i>
HERP	<i>homocysteine-responsive ER-resident protein</i>
HRD1/SYVN1	<i>HMG-coA reductase degradation 1 homolog/Synoviolin</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IFN	Interferon
IP	Immunopräzipitation
IRE1	<i>inositol-requiring protein-1</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Maus
Maf	<i>v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog</i>
mc	monoklonal
MG132	<i>carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NES	nukleäres Exportsignal
NPL4	<i>nuclear protein localization protein 4 homolog</i>
NQO1	NAD(P)H:Quinonoxidoreduktase
Nrf	<i>nuclear erythroid-derived 2-related factor</i>
NST	Asparagin/Serin/Threonin reichen Region
ORF	<i>open reading frame</i>
PAC	<i>proteasome assembly chaperone</i>
PACE	<i>proteasome-associated control element</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pc	polyklonal
PCR	Polymerasekettenreaktion
PERK	<i>PRK-like ER kinase</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP-1	Proteinphosphatase-1
Pro	Proform
PSMA	proteasomale alpha Untereinheit
PSMB	proteasomale beta Untereinheit

PSMC4	proteasomale 26S Untereinheit, ATPase 4/Rpt3
PSMD4	proteasomale 26S Untereinheit, nicht-ATPase 4/Rpn10
PSME2	proteasomale Aktivator Untereinheit 2, PA28 β
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Retinsäure
Rb	Kaninchen
Rbx1	<i>RING box protein 1</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS/RNS/RONS	reaktive Sauerstoffspezies/reaktive Stickstoffspezies/ reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies
Rot. (R)	Rotenon
RPMI	Roswell Park Memorial Institute; Zellkulturmedium
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFN	Sulforaphan
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SKP1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin
S1P/S2P	<i>Site-1 protease/ Site-2 protease</i>
S6	S6 ribosomale Untereinheit
S6K1	S6 Kinase 1
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Thapsigargin
TM	Transmembrandomäne
TU	Tunicamycin
Ub	Ubiquitin
UE	Untereinheit
UFD1	<i>ubiquitin fusion degradation protein 1</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VCP	<i>valosin containing protein</i>
XBP-1	<i>X-box binding protein 1</i>
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid Salz
(v/v)/(w/v)	<i>(volume/volume)/(weight/volume)</i>

7. Anhang

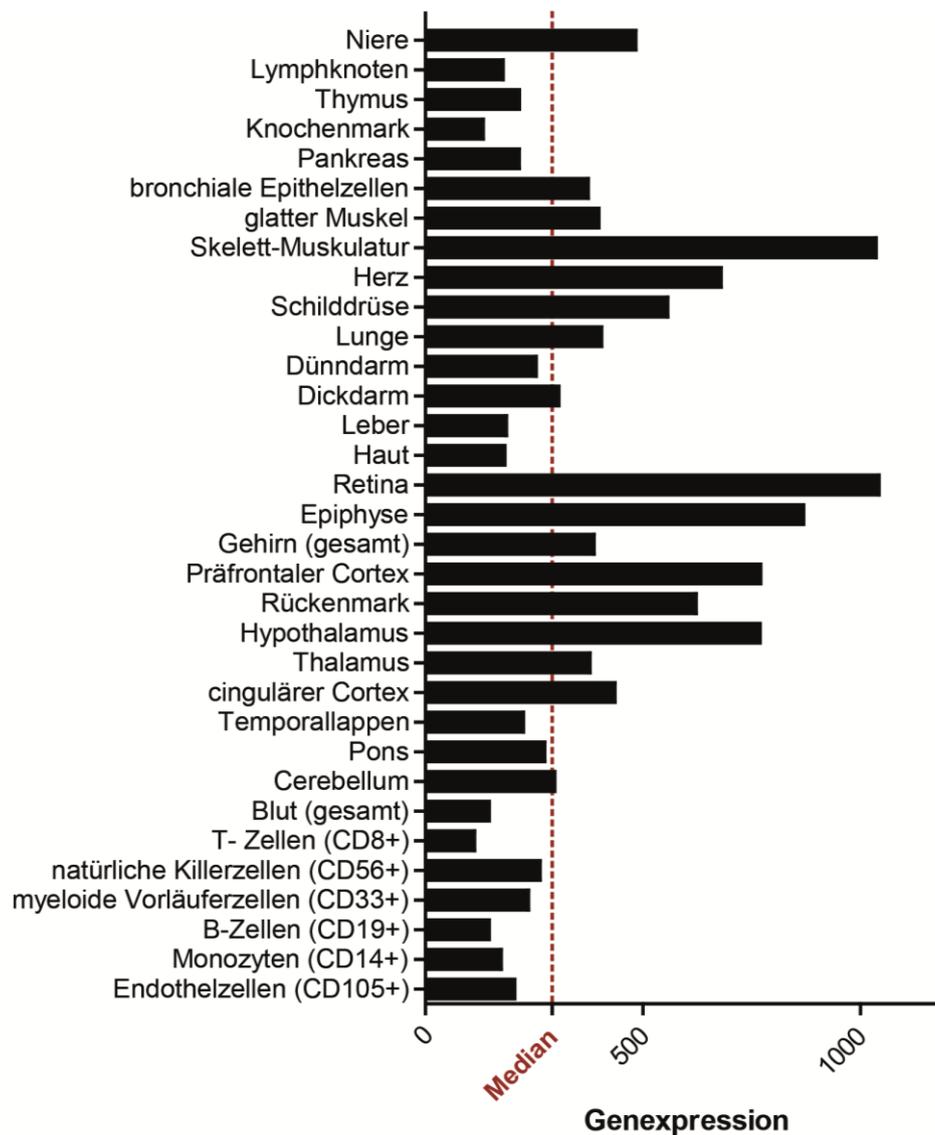


Abb. 6.1: Gewebe-spezifische NFE2L1 Genexpression (human). Die Expressionsdaten sind der BioGPS Datenbank entnommen (Datenset: GeneAtlas U133A; Probenet: 200759_x_at). Es wurde nur ein Ausschnitt der Expressionsdaten dargestellt. Der Median bezieht sich auf das vollständige Probenet.

Tab. 6.1: Potentielle AREs in den Promotoren der humanen Immuno-Untereinheiten. 1500 bp lange Promotorsequenzen der Untereinheiten wurden auf potentielle ARE-Sequenzen untersucht. Aufgelistet sind die Positionen der identifizierten, möglichen ARE-Konsensussequenzen (Jaiswal, 2004) stromaufwärts vom theoretischen Transkriptionsstart.

Genname/Untereinheit	Leitstrang (-bp)	Folgestrang (-bp)
<i>PSMB8/LMP7</i>	1386, 786, 298, 195	-
<i>PSMB9/LMP2</i>	374, 1403	117, 316
<i>PSMB10/MECL1</i>	65	-

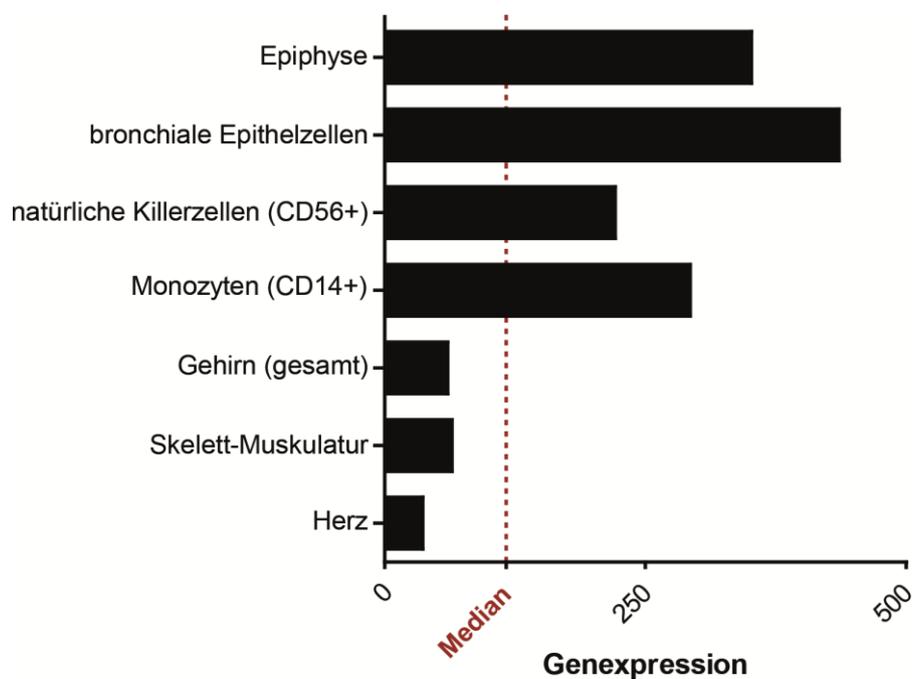


Abb. 6.2: Gewebe-spezifische NFE2L2 Genexpression (human). Die Expressionsdaten sind der BioGPS Datenbank entnommen (Datenset: GeneAtlas U133A; Probenet: 201146_at). Es wurde nur ein Ausschnitt der Expressionsdaten dargestellt. Der Median bezieht sich auf das vollständige Probenet.

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version nicht enthalten.

9. Veröffentlichungen

Eingereichter Artikel

Anja Brehm, Yin Liu, Afzal Sheikh, Bernadette Marrero, Ebun Omoyinmi, Qing Zhou, Gina Montealegre, Angélique Biancotto, Adam Reinhardt, Adriana Almeida de Jesus, Martin Pelletier, Wanxia L. Tsai, Elaine F. Remmers, Lela Kardava, Suvimol Hill, Hanna Kim, Helen J. Lachmann, Andre Megarbane, Jae Jin Chae, Jilian Brady, Rhina D. Castillo, Diane Brown, Angel Vera Casano, Gao Ling, Dawn Chapelle, Yan Huang, Deborah Stone, Yongqing Chen, Franziska Sotzny, Chyi-Chia Richard Lee, Daniel L. Kastner, Antonio Torrelo, Abraham Zlotogorski, Susan Moir, Massimo Gadina, Phil McCoy, Robert Wesley, Kristina Rother, Peter W. Hildebrand, Paul Brogan, Elke Krüger, Ivona Aksentijevich, Raphaela Goldbach-Mansky, *J Clin Invest.* (2015) **Additive Loss-of-Function Mutations in Proteasome-Subunit-Genes induce Type-I-interferon production in CANDLE/PRAAS**

Artikel in Vorbereitung

Franziska Sotzny, Kate Elizabeth Gilling, Annett Koch, Elke Krüger *in Bearbeitung*, **TCF11/Nrf1-mediated induction of proteasome expression prevents cytotoxicity by rotenone**

Poster

Franziska Sotzny, Annett Koch, Janos Steffen, Elke Krüger

Role of oxidative stress in TCF11/Nrf1-dependent regulation of the ubiquitin-proteasome system

Veranstaltung: Gemeinsames Symposium SPP1710 und GBM Studiengruppe Redoxbiologie vom 22.-23.09.2014 in Heidelberg

Franziska Sotzny, Annett Koch, Janos Steffen, Elke Krüger

Impact of oxidative stress on TCF11/Nrf1-dependent regulation of the ubiquitin-proteasome system

Veranstaltung: "International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology: Molecular Life Sciences 2013" vom 3.-6.10.2013 in Frankfurt am Main

Annett Koch, Janos Steffen, Franziska Sotzny, Zenawit Krüger, Elke Krüger

Transcriptional regulation of proteasomal subunits by TCF11/NRF1 via an ERAD dependent feedback loop

Veranstaltung: "EMBO Workshop on Intracellular Proteolysis and Cancer" vom 26.-28.10.2011 in Valencia (Spanien)

Annett Koch, Janos Steffen, Franziska Sotzny, Zenawit Krüger, Elke Krüger

TCF11 an ER-resident transcription factor regulates intracellular proteasome abundance

Veranstaltung: "7th Fabisch Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology, Regulated Intramembrane Proteolysis in Cancer Development and Neurodegenerative Diseases" vom 05.-07.10.2011 in Potsdam

10. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Elke Krüger, die es mir ermöglichte diese spannende Arbeit unter einer hervorragenden Betreuung anzufertigen. Ich danke ihr für die konstruktiven, motivierenden Diskussionen und wertvollen Erfahrungen, die ich während der wissenschaftlichen Arbeit sammeln konnte. Ebenso sei Herrn Prof. Dr. P.-M. Kloetzel dafür gedankt, dass er die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Weiterhin möchte ich den Gutachtern, Frau Prof. Dr. Z. Ignatova und Herrn Prof. Dr. A. Herrmann, und den weiteren Mitgliedern der Promotionskommission, Frau Prof. Dr. A. Ehrenhofer-Murray und Frau Prof. Dr. E. Klipp, für Ihre Bereitschaft diese Funktionen auszuüben und den damit verbundenen Zeitaufwand danken.

Ich danke meinen Kollegen, aus dem Krüger sowie dem Kloetzel Labor, für die freundliche, harmonische Arbeitsatmosphäre und ihre große Hilfsbereitschaft. Ein herzlicher Dank gilt Annett, die mir mit fachlichem und persönlichem Rat stets zur Seite stand. Liebe Annett, vielen Dank dafür, dass du immer ein offenes Ohr für meine Probleme hattest und für die vielen lustigen Stunden im Labor. Außerdem danke ich Anja, Zena, Kate und Theresa für ihre bereichernden Tipps und ihre Diskussionsbereitschaft. Ein großes Dankeschön gilt auch Dani. Sie hatte zu nahezu jedem Problem im Labor eine passende Lösung parat.

Neben der großartigen Unterstützung danke ich meinen Kollegen für die vielen schönen und spaßigen Momente im und außerhalb des Labors. Hier möchte ich insbesondere Feli, Caro, Andrea, Agathe, Alex und Richard hervorheben.

Nicht zuletzt möchte ich mich von Herzen bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Auch wenn ich sie in den letzten Monaten etwas vernachlässigt habe, haben sie mir stets den Rücken gestärkt. Mein Dank gilt den wunderbaren BT-Mädels und meinen zwei Maxis, die mit unterhaltsamen Freizeitgestaltungen für einen emotionalen Ausgleich sorgten. Ein besonders liebevoller Dank gilt Fabi, meinen Eltern und meinem Bruder, dafür dass sie in dieser Phase meines Lebens immer für mich da waren.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich habe die Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin vom 05. März 2015 zur Kenntnis genommen. Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende wissenschaftliche Arbeit von mir selbständig und ohne Hilfe Dritter angefertigt wurde. Alle benutzten Hilfsmittel sind vollständig angegeben und die Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden eingehalten.

Ich versichere weiterhin, dass die Dissertation bisher nicht als Prüfungsleistung vorgelegt wurde und dass ich mich nicht schon anderwärts für den Doktorgrad beworben oder ein Promotionsverfahren eröffnet habe.

Berlin, 21. August 2015

Franziska Sotzny