

DISSERTATION

Die Funktionen des COP9 Signalosoms und des assoziierten USP15 im Ubiquitin-Proteasomsystem

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Bettina Kathrin Johanna Hetfeld
geboren am 26.11.1975 in Hamburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin: Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I: Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
 2. Prof. Dr. Wolfgang Dubiel
 3. Prof. Dr. Michael Naumann

Daten der Promotion: 13. Februar 2006 (eingereicht)
 13. Juli 2006 (Disputation)

ZUSAMMENFASSUNG

Das COP9 Signalosom (CSN) ist ein hoch konservierter Proteinkomplex, der an der Regulation des Ubiquitin (Ub)-26S Proteasomsystems (UPS) beteiligt ist. Das UPS ist die wichtigste Proteolysemaschinerie in eukaryotischen Zellen, bei der Proteine über eine dreistufige Kaskade der Enzyme E1-E3 mit einer Ub-Kette markiert werden, die als Erkennungssignal für den Abbau durch das 26S Proteasom dient. Das CSN gilt als Paralog zum Lid, einem Subkomplex des 26S Proteasoms, und interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen, unter anderem mit E3-Ligasen und Kinasen.

In dieser Arbeit konnte die direkte Bindung des CSN an das 26S Proteasom gezeigt werden, was zu einem Einfluss auf die Peptidaseaktivität des 26S Proteasoms *in vitro* führt. In Flag-Pulldown-Experimenten aus B8 Mausfibroblasten, die stabil mit Flag-CSN2 transfiziert waren, wurde ein vollständiger Flag-CSN-Komplex nachgewiesen, der mit dem 26S Proteasom assoziiert vorliegt. Co-Immunpräzipitationen beider Komplexe *in vitro* wiesen auf eine konzentrationsabhängige Verdrängung des Lid-Subkomplexes durch das CSN hin. Diese Interaktion führte zur Reduktion der proteolytischen Aktivität des 26S Proteasoms.

Darüber hinaus wurde eine assoziierte deubiquitinierende Aktivität am CSN entdeckt und als USP15 identifiziert. Die Charakterisierung von USP15 zeigte, dass es durch die am CSN assoziierte Kinase CK2 phosphoryliert und stabilisiert wird. Erstmals konnte durch Inhibitorstudien mit ortho-Phenanthrolin eine Metallabhängigkeit der Aktivität von USP15 nachgewiesen werden, die zur Identifizierung eines bisher unbekanntes Zn-Fingers führte. Mutationsanalysen des Zn-Fingers zeigen, dass dieser für die Bindung und Spaltung von Ub-Ketten, nicht aber von linearen Ub-Konstrukten, notwendig ist. In Zellexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass USP15 die E3 Ligase Rbx1 stabilisiert, was vermutlich auf eine Umkehr der Autoubiquitinierung zurückzuführen ist. Das CSN scheint somit sowohl das 26S Proteasom als auch die E3-Ligasen direkt zu beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen eine Vertiefung der Erkenntnisse über das CSN als Regulator des UPS dar.

SUMMARY

The COP9 signalosome (CSN) is a conserved protein complex that is involved in the regulation of the ubiquitin (Ub)/26S proteasome system (UPS). The UPS is the most important degradation machinery in eukaryotic cells. By the concerted action of three enzymes, E1-E3, proteins are labelled with a Ub-chain that serves as a recognition signal for the degradation by the 26S proteasome. The CSN is homologous to the lid, a subcomplex of the 26S proteasome, and interacts with numerous proteins, including E3 Ub ligases and kinases.

In this study a direct interaction of the CSN with the 26S proteasome could be shown which has consequences for the peptidase activity of the 26S proteasome *in vitro*. In Flag-pull-down experiments from mouse B8 fibroblasts, that permanently expressed Flag-CSN2, an intact Flag-CSN complex was detected that is associated with the 26S proteasome. Co-immunoprecipitation of both complexes *in vitro* indicated a concentration-dependent replacement of the lid subcomplex by the CSN. This interaction led to a decrease of the proteolytic activity of the 26S proteasome.

Moreover, a deubiquitinating activity associated with the CSN was discovered and identified as USP15. The USP15 was phosphorylated by the CSN-associated kinase CK2 that stabilised the enzyme. For the first time inhibitor studies with ortho-phenanthroline demonstrated a metal-dependency for the activity of USP15 that could be attributed to a formerly unidentified Zn-finger. Mutational analysis of the Zn-finger showed that it is necessary for the binding and cleavage of poly-Ub-chains but not for linear Ub-constructs. Cell culture experiments demonstrated a stabilisation of the E3 ligase Rbx1 by USP15 most likely by reversing its autoubiquitination. Therefore the CSN seems to directly influence the 26S proteasome as well as E3 ligases in their functions.

These results expand the present knowledge on the CSN as a regulator of the UPS.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS UBIQUITIN-26S PROTEASOMSYSTEM	1
1.1.1	Das 26S Proteasom.....	1
1.1.2	Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine.....	3
1.1.3	E3 Ub-Ligasen.....	6
1.1.4	Deubiquitinierungsenzyme	8
1.1.4.1	Klassifizierung.....	8
1.1.4.2	Die Rolle der DUBs im UPS	9
1.2	DAS COP9 SIGNALOSOM (CSN).....	11
1.2.1	Entdeckung.....	11
1.2.2	Architektur des Komplexes	12
1.2.3	Interaktionspartner des CSN.....	15
1.2.4	Funktionen.....	17
1.2.4.1	Kinaseaktivität.....	17
1.2.4.2	Deneddylierungsaktivität.....	17
1.2.5	Das CSN als Komponente des Ub-26S Proteasomsystems	18
2	ZIELSETZUNG	20
3	MATERIALIEN UND METHODEN.....	21
3.1	MATERIALIEN.....	21
3.1.1	Verwendete Primer	21
3.1.2	Vektoren	22
3.1.3	Verwendete Antikörper	22
3.1.4	Geräte	22
3.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.6	Chemikalien.....	23
3.1.7	Puffer und Lösungen	24
3.1.8	Nährmedien	25
3.1.9	Enzyme und Kits	25
3.1.10	<i>E. coli</i> -Stämme	25
3.1.11	Eukaryotische Zelllinien.....	26
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
3.2.1	Klonierung von humanen USP15-Konstrukten	26
3.2.2	Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	27
3.2.3	Kryokonservierung	27
3.2.4	Plasmidisolierung	27
3.2.4.1	Die schnelle DNA-Isolierung.....	27

3.2.4.2	Mini-Präp.....	28
3.2.4.3	Maxi-Präp.....	28
3.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	28
3.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
3.2.7	Site-directed Mutagenese.....	29
3.2.8	Agarosegelelektrophorese.....	29
3.2.9	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	30
3.2.10	Restriktionsverdau von DNA.....	30
3.2.11	DNA-Präzipitation mit Ethanol.....	30
3.2.12	Ligation.....	30
3.2.13	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	31
3.2.13.1	Bakterien für Elektroporation.....	31
3.2.13.2	Bakterien für Transformation durch Hitzeschock.....	31
3.2.14	Transformation von Bakterien durch Elektroporation.....	31
3.2.15	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock.....	31
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	32
3.3.1	Präparation rekombinanter Proteine.....	32
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	32
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
3.3.4	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE).....	33
3.3.5	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen.....	33
3.3.6	Westernblot und Immundetektion.....	33
3.3.7	Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen.....	34
3.3.8	Far-Westernblot (Filterbindungs-Assay).....	34
3.3.9	Präparation des COP9 Signalosoms.....	34
3.3.9.1	Lyse der Erythrozyten.....	34
3.3.9.2	DEAE-Ionenaustauschchromatographie.....	35
3.3.9.3	Ammoniumsulfatfällung.....	35
3.3.9.4	Dichtegradientenzentrifugation I.....	35
3.3.9.5	FPLC: ResourceQ-Säule.....	36
3.3.9.6	FPLC: MonoQ-Säule.....	36
3.3.9.7	Dichtegradientenzentrifugation II.....	36
3.3.10	Präparation von 26S und 20S Proteasom.....	37
3.3.11	Peptidaseaktivitätstest.....	37
3.3.12	Bindungsstudien mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	38
3.3.13	TCA-Fällung.....	38
3.3.14	Kinaseassay (<i>in vitro</i>).....	38
3.3.15	Immunpräzipitation (IP) nach Glyceringradient.....	39
3.3.16	Ubiquitinierungsassay.....	39
3.3.17	Bindungsstudien mittels magnetischer Ni-NTA Agarosepartikel.....	39
3.3.18	Nachweis von USP15-Konjugaten <i>in vitro</i>	40

3.3.19	Deubiquitinierungsassay.....	40
3.3.20	Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	40
3.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	41
3.4.1	Kultivierung und Passage von adhärenenten Zellen.....	41
3.4.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung.....	41
3.4.3	Transiente Transfektion.....	41
3.4.4	Cycloheximid-Behandlung.....	42
3.4.5	Zelllyse.....	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	INTERAKTION ZWISCHEN DEM CSN UND DEM 26S PROTEASOM	43
4.1.1	Co-Immunpräzipitation von CSN und 26S Proteasom aus B8-Zellen.....	43
4.1.2	Nachweis vom 26S Proteasom nach Flag-Pulldown des CSN.....	45
4.1.3	Aufreinigung von CSN und 26S Proteasom.....	47
4.1.4	Verdrängung des Lid vom 26S Proteasom durch Zugabe von CSN.....	48
4.1.5	Einfluss des CSN auf die Peptidaseaktivität des 26S Proteasoms.....	49
4.1.6	Einfluss des CSN auf den Abbau ubiquitiniertes Substrate durch das 26S Proteasom.....	50
4.2	DEUBIQUITINIERUNGSAKTIVITÄT DES CSN	54
4.2.1	Bindung von Ub ₄ an CSN und Lid.....	54
4.2.2	Deubiquitinierung von Ub ₄	55
4.2.3	Deubiquitinierung von Ub ₅ -Muc1.....	57
4.3	CHARAKTERISIERUNG VON USP15	59
4.3.1	Coelution von USP15 und CSN bei der Präparation.....	60
4.3.2	Interaktion zwischen CSN und USP15.....	61
4.3.3	Phosphorylierung von USP15.....	63
4.3.4	Ubiquitinierungsassay mit USP15.....	65
4.3.5	Sequenzanalyse von USP15.....	66
4.3.6	Deubiquitinierung von linearem Ub-GFP.....	67
4.3.7	Abbau von polyubiquitinierten Substraten durch USP15.....	69
4.3.8	Bindung von Ub ₄ an USP15.....	70
4.3.9	Effekt von USP15 auf Rbx1.....	70
5	DISKUSSION	73
5.1	DAS CSN ALS „ALTERNATIVER LID“ DES 26S PROTEASOMS.....	73
5.2	DAS CSN - EIN EFFEKTOR DES 26S PROTEASOMS.....	76
5.3	DAS CSN BESITZT DEUBIQUITINIERUNGSAKTIVITÄT.....	78
5.4	USP15 ALS NEUER INTERAKTIONSPARTNER DES CSN.....	80
5.5	IDENTIFIZIERUNG EINES FÜR DIE SPALTUNG VON UB-KETTEN ESSENTIELLEN ZINK-FINGERS IN USP15.....	84
5.6	DIE ROLLE DES CSN IM UBIQUITIN-26S PROTEASOMSYSTEM.....	86
5.7	AUSBLICK.....	90
6	LITERATURVERZEICHNIS	91

7	ANHANG.....	103
7.1	GENERIERTE PLASMIDE	103
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	104
7.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	106
7.4	TABELLENVERZEICHNIS	107
7.5	PUBLIKATIONSLISTE	108

1 EINLEITUNG

1.1 DAS UBIQUITIN-26S PROTEASOMSYSTEM

Das wichtigste proteolytische System in Eukaryoten ist das Ubiquitin (Ub)-26S Proteasomsystem (UPS). In diesem Abbauweg werden sowohl zytosolische, nukleäre als auch membranständige Proteine mit Poly-Ub-Ketten markiert und danach in einem komplexen, zeitlich kontrollierten und streng regulierten Prozess vom 26S Proteasom degradiert. Die Ub-abhängige Proteolyse beeinflusst in der Zelle eine Vielzahl von Prozessen wie das Fortschreiten des Zellzyklus, die Signaltransduktion, den Membrantransport, die Qualitätskontrolle von Proteinen im Endoplasmatischen Reticulum (ER), die Regulation der Transkription, die Apoptose, die Stressantwort und die Wachstumskontrolle. Beim Abbau falsch gefalteter Proteine, genannt DRiPs (defective ribosomal products), die etwa 30% der neusynthetisierten ausmachen, entstehen Peptide, die bei entsprechender Größe und Sequenz über MHC Klasse I präsentiert werden (Schubert et al., 2000). Dieser MHC Klasse I-Weg ist wesentlicher Bestandteil der Immunantwort.

Das UPS bedarf einer spezifischen und strengen Kontrolle. Bei Proteolysedefekten treten pathologische Prozesse wie Entzündung, Autoimmunität, neurodegenerative Erkrankungen sowie Tumorgenese auf (zusammengefasst von (Glickman and Ciechanover, 2002)).

1.1.1 Das 26S Proteasom

Das 26S Proteasom besteht aus dem zentralen 20S Proteasom, welches von zwei 19S Regulatoren flankiert wird (Abb. 1) (Ferrell et al., 2000). Das eukaryotische 20S Proteasom ist ein Hohlzylinder aus vier heptameren Ringen mit der Anordnung $\alpha_7\text{-}\beta_7\text{-}\beta_7\text{-}\alpha_7$ und einem Molekulargewicht von etwa 700 kDa (Groll et al., 1997). Die äußeren Ringe werden aus den homologen Untereinheiten $\alpha_1\text{-}\alpha_7$ gebildet, die den Zugang zu den katalytischen Zentren kontrollieren und die Interaktion mit Regulationsfaktoren und -komplexen vermitteln. Die zwei inneren Ringe bestehen aus den Untereinheiten $\beta_1\text{-}\beta_7$, wobei die Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 katalytisch aktiv sind und unterschiedliche Spaltpräferenzen besitzen. Das aktive Zentrum bildet jeweils das N-terminale Threonin der Untereinheit. Man unterscheidet zwischen der PGPH (peptidylglutamyl peptide hydrolase)- oder Caspase-ähnlichen, Trypsin-ähnlichen und Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität (Wilk and Orłowski, 1983).

Normalerweise ist der Zugang zum aktiven Zentrum durch die N-Termini der α -Untereinheiten verschlossen und das 20S Proteasom in einem inaktiven Stadium (Groll et al., 2000). Durch die Bindung des 19S Regulators kommt es vermutlich zu einer ATP-abhängigen Konformationsänderung der α -Ringe, die zur Öffnung der aktiven Kammer führt (Whitby et al., 2000).

Der 19S Regulator (auch PA700) besteht aus zwei Subkomplexen, dem Base- und Lid-Komplex. Der Base-Subkomplex bindet direkt an die α -Ringe des 20S Proteasoms und wird aus sechs ATPasen der AAA-Familie (ATPases associated with a variety of different activities) und drei nicht-ATPase Untereinheiten aufgebaut. Er ist für die Aktivierung des 20S Proteasoms und die Entfaltung und Translokation der Substrate wichtig. Der Lid-Subkomplex besteht aus acht Untereinheiten, sechs mit PCI- und zwei mit MPN-Domäne (siehe 1.2.2), und enthält eine intrinsische Deubiquitinierungsaktivität (siehe 1.1.4.1).

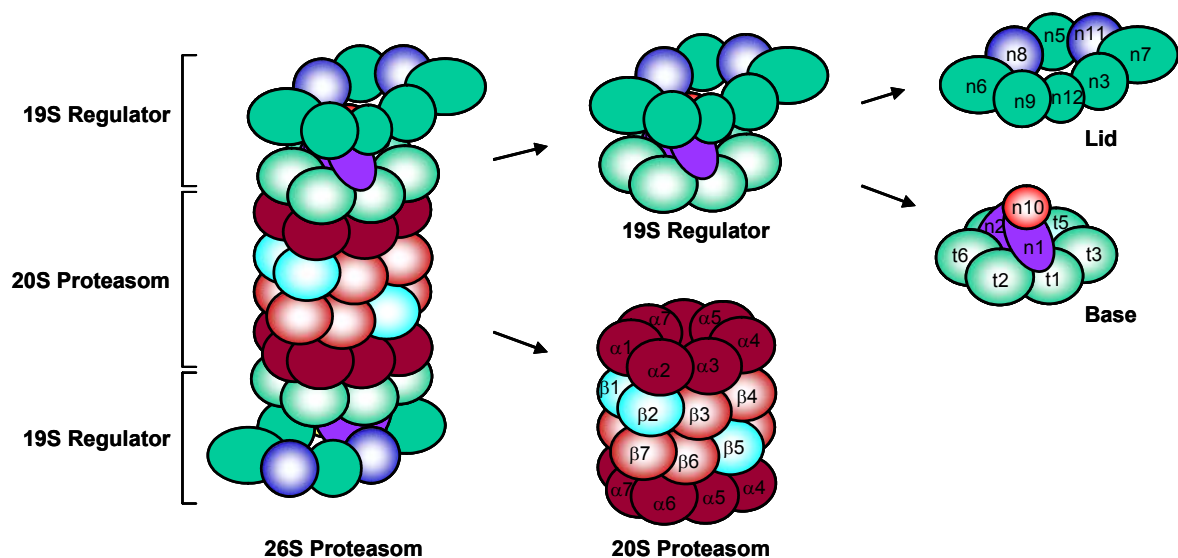


Abb. 1: Aufbau des 26S Proteasoms

Das zentrale 20S Proteasom wird von zwei 19S Regulatoren bestehend aus Base- und Lid-Subkomplex flankiert. n = Rpn; t = Rpt; hellblau = katalytisch aktive β -Untereinheiten; hellgrün = ATPasen; dunkelgrün = Lid-Untereinheiten mit PCI-Domäne; dunkelblau = Lid-Untereinheiten mit MPN-Domäne

Das 26S Proteasom ist für den Abbau von polyubiquitinierten Proteinen verantwortlich. Die Ub-Ketten binden direkt entweder an die ATPase-Untereinheit Rpt5 (Lam et al., 2002) oder an Rpn10 (Elsasser et al., 2002). Außerdem können ubiquitinierte Substrate von Proteinen mit UBL/UBA (carboxy terminal ubiquitin-like/ubiquitin-associated)-Domäne zum 26S Proteasom transportiert werden. Die Transportproteine Rad23 und Dsk2 aus *Saccharomyces cerevisiae* binden an die Base-Untereinheiten Rpn1 und Rpn2 (Elsasser et al., 2002; Saeki et

al., 2002). Das Substrat wird dann deubiquitiniert, ATP-abhängig entfaltet und ins 20S Proteasom eingeschleust, wo die proteolytische Spaltung erfolgt.

Neben dem 19S Regulator sind noch weitere Proteinkomplexe bekannt, die das 20S flankieren können, jedoch keine polyubiquitinierten Proteine erkennen oder ATP-abhängig wirken (zusammengefasst von (Rechsteiner and Hill, 2005)). Der 11S Regulator (auch PA28 oder REG) besteht entweder aus dem INF γ -induzierbaren Heteroheptamer der Untereinheiten $\alpha_3\beta_4$ (Zhang et al., 1999) oder aus dem im Kern lokalisierten Homoheptamer γ_7 (Tanahashi et al., 1997). PA28 γ spielt eine Rolle im Zellzyklus und der Apoptose. Kürzlich wurde mit dem PA200-Protein (Blm3 oder Blm10 in *S. cerevisiae*) ein weiterer Regulator im Kern gefunden, der eine Funktion bei der DNA-Reparatur zu haben scheint (Ustrell et al., 2002).

Inzwischen sind verschiedene Klassen von Inhibitoren des 26S Proteasoms bekannt. Der Hemmstoff MG132 (z-Leu-Leu-Leucinal) inhibiert hauptsächlich die Chymotrysin-ähnliche Aktivität durch eine reversible Bindung der Aldehydgruppe an das katalytisch aktive Threonin der β -Untereinheit.

1.1.2 Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine

Das Ub ist ein hochkonserviertes, 76 Aminosäuren (AS) großes Polypeptid, das post-translational an eine Vielzahl von Proteinen geknüpft wird. Die Bindung erfolgt dabei zwischen dem C-terminalen Glycin des Ub und der ϵ -Aminogruppe eines Lysin oder in wenigen Fällen dem N-Terminus des Zielproteins.

Diese Reaktion erfolgt durch eine dreistufige Enzymkaskade. Ub wird durch das Ub-Aktivierungsenzym E1 ATP-abhängig über die Bildung einer Thioesterbindung aktiviert und auf ein Ub-konjugierendes Enzym E2 durch Bildung einer weiteren Thioesterbindung übertragen (Abb. 2). Das E2 bindet an eine E3 Ub-Ligase, die für die spezifische Erkennung des Substrates verantwortlich ist. Das Ub wird nun an ein internes Lysin des Zielproteins gebunden. Durch mehrmalige Wiederholung des Zyklus kommt es zur Bildung von Poly-Ub-Ketten, bei denen der C-Terminus entweder an K6, K29, K48 oder K63 des letzten Ub geknüpft wird. In höheren Eukaryoten gibt es nur ein E1, dagegen schon zahlreiche E2 und weit über 100 verschiedene E3-Ligasen, um die Spezifität der Ub-Markierung zu gewährleisten.

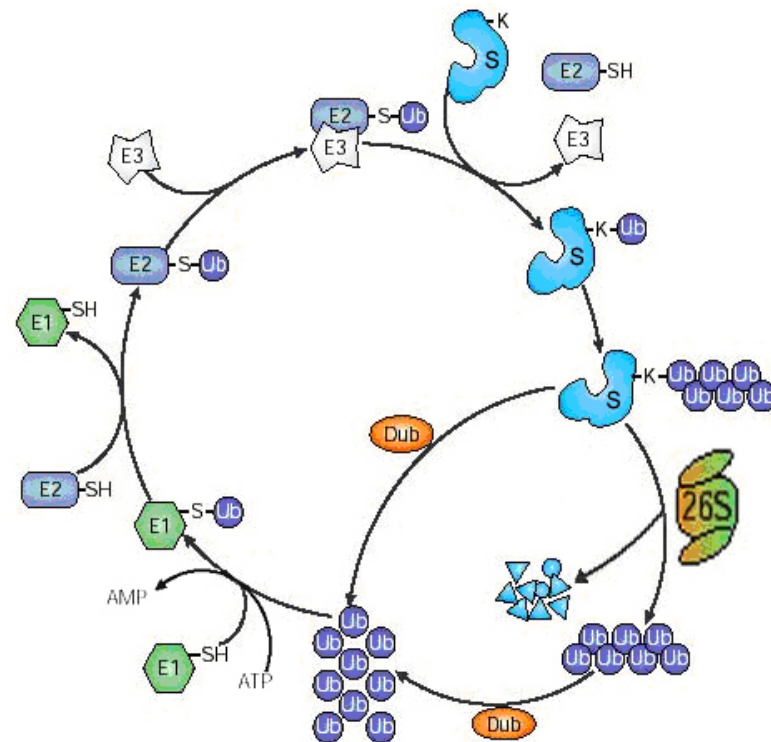


Abb. 2: Ubiquitin-26S Proteasomsystem

Ubiquitinierung von Protein-Substraten (S) nach Aktivierung des Ub durch E1, Übertragung auf E2 und gleichzeitiger Bindung von E2 und S am E3. Die Bildung einer Ub-Kette nach mehreren Zyklen führt zur Erkennung durch das 26S Proteasom, Abbau des Proteins und Aufspaltung der Ub-Kette durch Deubiquitinierungsenzyme (Dub) (modifiziert nach (Sullivan et al., 2003)).

Substrate mit vier oder mehr Ub-Einheiten, die über K29 oder K48 miteinander verbunden sind, werden vom 26S Proteasom erkannt und abgebaut (Pickart and Fushman, 2004; Thrower et al., 2000). Das Ub steht der Zelle nach Spaltung der Ketten durch Deubiquitinierungsenzyme (DUBs) wieder zur Verfügung (siehe 1.1.4).

Zahlreiche zelluläre Prozesse wie die Zellzykluskontrolle, die Stressantwort, die DNA-Reparatur und die Immunantwort werden über den selektiven Ub-abhängigen Proteinabbau gesteuert. Die Bildung von über K63 verknüpften Ub-Ketten spielt bei der Endozytose, Ribosomenfunktion und der post-replikativen DNA-Reparatur eine Rolle (zusammengefasst von (Schwartz and Hochstrasser, 2003)).

Gebildet wird Ub in der Zelle entweder als lineare Poly-Ub-Kette oder als Ub-Ribose-Fusionsprotein, die durch DUBs am C-Terminus gespalten werden, um das charakteristische GG-Motiv zu erhalten.

Neben Ub sind inzwischen etwa ein Dutzend weitere, Ub-ähnliche Proteine, die so genannten UBL-Proteine (ubiquitin-like modifiers), bekannt, die ebenfalls als Vorläuferproteine

entstehen und über eine Enzymkaskade kovalent mit ihrem C-Terminus an Proteine gebunden werden können. Zu den bekanntesten gehören Nedd8 (neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated 8) und SUMO (small Ub-related modifier).

Nedd8/Rub1 (related-to-ubiquitin 1) weist in seiner Sequenz die größte Ähnlichkeit zu Ub auf (58%). Es wird nach Aktivierung durch ein E1 und E2 von der E3-Ligase Rbx1 auf das Substrat übertragen. Die Neddylierung ist für die Zellteilung in *Schizosaccharomyces pombe* und für die frühe Entwicklung in *Arabidopsis thaliana* und Mäusen essentiell (Dharmasiri et al., 2003; Osaka et al., 2000; Tateishi et al., 2001).

Bis vor kurzem wurde ausschließlich von einer Bindung von Nedd8 an Culline, Bestandteilen von E3-Ligasen, ausgegangen (siehe 1.1.3). Im Jahre 2004 konnte erstmalig eine Verknüpfung an das von Hippel-Lindau Protein (pVHL) (Stickle et al., 2004) sowie an die E3-Ligase Mdm2 und den Tumorsuppressor p53 gezeigt werden (Xirodimas et al., 2004). Es ist denkbar, dass noch zahlreiche weitere Proteine mit Nedd8 modifiziert werden können. Bislang ist unklar, ob es zur Bildung von Nedd8-Ketten oder zur Multi-Mononeddylierung *in vivo* kommt. Das Nedd8-bindende Protein Nub1 besitzt am N-Terminus eine Ub-ähnliche Domäne, die an die Base-Untereinheit Rpn10 bindet und somit möglicherweise neddylierte Proteine zum 26S Proteasom bringt (Kamitani et al., 2001). Die Abspaltung von Nedd8 erfolgt durch Deneddylasen, wie DEN1 und das CSN (siehe 1.2.4.2).

SUMO entspricht in seiner Sequenz zu 18% Ub und kommt im humanen System in drei Isoformen vor (SUMO1/Smt3c/Sentrin-1, SUMO2 und SUMO3). Für SUMO2 und SUMO3 konnte *in vitro* die Bildung von Ketten an K11 gezeigt werden (Tatham et al., 2001), obwohl die Bedeutung *in vivo* unklar bleibt, da in *S. cerevisiae* ein Verlust der Kettenbildung durch Mutation keinen Phänotyp aufweist (Bylebyl et al., 2003). SUMO1 bildet hingegen keine Ketten. SUMOylierung spielt eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Transkription, dem zellulären Transport sowie der Genomintegrität.

Da Nedd8 und SUMO ebenfalls an ein Lysin des Zielproteins binden, können sie als Antagonisten zur Ubiquitinierung durch Blockierung der Bindungsstelle wirken. Die Modifizierung mit unterschiedlichen UBLs an einem Lysin stellt damit einen weiteren Mechanismus dar, der den Wechsel zwischen verschiedenen Funktionen eines Proteins ermöglicht.

1.1.3 E3 Ub-Ligasen

Die E3 Ub-Ligasen lassen sich aufgrund von Sequenzanalysen in drei Hauptfamilien einteilen: die HECT-, RING-Finger- und U-Box-Familie (zusammengefasst von (Hatakeyama and Nakayama, 2003)). Kürzlich wurde mit A20 ein weiteres Ub-übertragendes Protein mit mehreren Zinkfingern identifiziert (Wertz et al., 2004).

Der bekannteste Vertreter der HECT-Familie ist E6-AP, welches nach Infektion mit dem Papillomavirus Ub auf den Tumorsuppressor p53 überträgt. E6-AP war die erste identifizierte Ub-Ligase (Huibregtse et al., 1993). Inzwischen sind zehn Proteine in verschiedenen Spezies mit einer C-terminalen Domäne bekannt, die homolog zum C-Terminus von E6-AP ist (HECT = homologous to E6-AP C-terminus) (Huibregtse et al., 1995). Mitglieder der HECT-Familie besitzen ein konserviertes Cystein, welches als Zwischenprodukt einen Thioester mit Ub bildet, bevor Ub auf das ebenfalls gebundene Substrat übertragen wird (Scheffner et al., 1993). Wahrscheinlich werden zunächst Ub-Ketten am konservierten Cystein gebildet, die dann im Ganzen an das Zielprotein gebunden werden (Pickart and Eddins, 2004).

Im Gegensatz dazu besitzen die RING (really interesting new gene)-Ligasen keine katalytische Aktivität, sondern vermitteln mit ihrer RING-Domäne die Bindung des Substrates und des Ub-gekoppelten E2, welches dann das Zielprotein ubiquitiniert. Die RING-Domäne besteht aus acht Aminosäuren, die zwei Zinkionen koordinieren.

Die RING-Ligasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die monomeren E3-Ligasen und die Cullin-haltigen Multiproteinkomplexe. Bei der ersten Gruppe sind die Domäne zur Substraterkennung und die RING-Domäne in einem Protein vereint. Ein Vertreter ist das Mdm2, welche den Tumorsuppressor p53 zum Abbau markiert.

Zur zweiten Gruppe gehören neben den Cullin-haltigen RING-E3-Ligasen (CRL) auch der Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C). Die CRLs bestehen jeweils aus dem Gerüstbaustein Cullin, dem RING-Protein, das an den C-Terminus von Cullin bindet, und einem Rezeptor für die Substraterkennung. Dieser bindet entweder direkt oder über einen weiteren Adaptor an den N-Terminus der Cullin-Komponente. In humanen Zellen gibt es sieben Culline, Cul1, Cul2, Cul3, Cul4A, Cul4B, Cul5 und Cul7 (Dias et al., 2002), sowie das Cullin-ähnliche Protein APC2 des APC/C. Trotz der Vielzahl an RING-Proteinen in humanen Zellen sind nur drei Homologe in Cullin-haltigen Komplexen bekannt: Rbx1, Rbx2 und APC11. Diese scheinen *in vivo* unterschiedliche Präferenzen für die Culline zu haben und zur Substratspezifität beizutragen (Donaldson et al., 2004; Ohta et al., 1999).

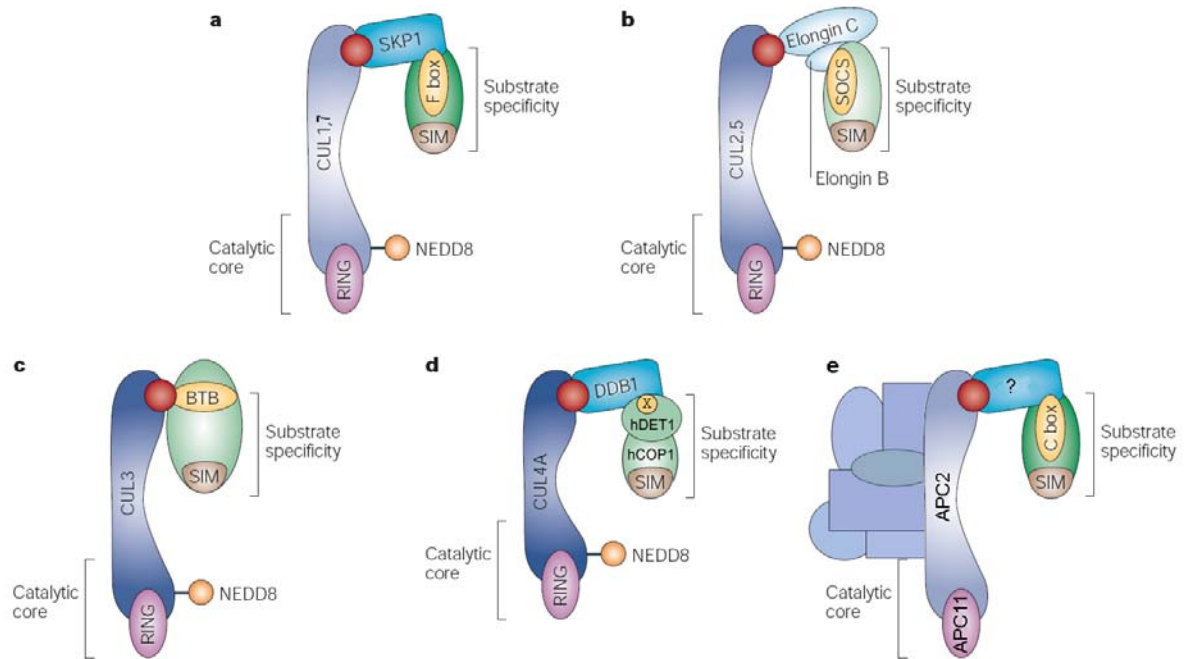


Abb. 3: Die verschiedenen Cullin-haltigen RING-Ligasen und der APC/C-Komplex

a) SCF-Komplex bestehend aus dem Substrat-bindenden F-Box-Protein, dem Adapter Skp1, welcher ebenso wie das RING-Protein Rbx1 an Cul1 gekoppelt ist. Inzwischen wurde auch eine Bindung von Rbx1, Skp1 und F-Box-Proteinen an Cul7 gezeigt. b) Cul2 oder Cul5 bilden das Gerüst für das RING-Protein und den Adapter ElonginB/C, der die Substrat-spezifischen Rezeptoren mit SOCS-Box koppelt. c) Der Cul3-Komplex bindet Substrate über Proteine mit BTB-Domäne. d) Cul4-Komplexe besitzen als Adaptor DDB1 und scheinen Substrate über ein Dimer aus DET1/COP1 zu rekrutieren, wobei das Bindungsmotiv noch unbekannt ist. e) APC/C-Komplex mit cullin-ähnlicher Untereinheit APC2, RING-Untereinheit APC11 und C-Box-Motiv bei der Substraterkennung. SIM = Substrat-Interaktionsmotiv (modifiziert nach (Petroski and Deshaies, 2005))

Auffällig ist, dass Rbx1 als einziges Protein statt des Cystein ein Aspartat an Position 8 der RING-Domäne aufweist, die für die Interaktion mit allen humanen Cullinen wichtig ist. Eine Mutation zu Cystein verhindert die Bindung an Cul3 und Cul4B (Megumi et al., 2005).

In Abb. 3 sind die bis heute gefundenen CRLs dargestellt. Am bekanntesten ist der SCF-Komplex, der nach seinen Komponenten Skp1-Cul1-F-Box-Protein benannt ist (Abb. 3a). Für die weiteren Komplexe hat sich in der Literatur noch keine einheitliche Namensgebung durchgesetzt. Eine Ausnahme bildet der APC/C, ein E3-Komplex aus vielen Komponenten, der den Übergang von der M zur G1-Phase durch Ubiquitinierung von Cyclinen und anderen mitotischen Effektoren kontrolliert (Abb. 3e).

Alle Culline werden an einem konservierten Lysin im C-Terminus kovalent mit Nedd8 verknüpft (Hori et al., 1999; Pan et al., 2004). Die Modifikation begünstigt die Anlagerung des E2 und steigert damit die Effektivität der Substrat-Ubiquitinierung (Kawakami et al.,

2001). Dynamische Zyklen aus Neddylierung/Deneddylierung scheinen die Assemblierung des Komplexes zu regulieren (Wu et al., 2000). Entfernt wird Nedd8 durch das COP9 Signalosom (1.2.4.2) oder das DUB DEN1/NEDP1 (Mendoza et al., 2003; Wu et al., 2003). Sowohl für Rbx1 (Ohta et al., 1999) als auch für verschiedene F-Box-Proteine (Zhou and Howley, 1998) und die Culline wurde gezeigt, dass sie nach Autoubiquitinierung durch das UPS abgebaut werden.

Die dritte, relativ kleine Gruppe bilden die U-Box (Ufd2 homology)-E3s (Hatakeyama and Nakayama, 2003). Als erstes Mitglied wurde Ufd2 (Ub fusion degradation 2) identifiziert (Koegl et al., 1999), welches über kein eigenes Substrat verfügt und stattdessen die Übertragung von Poly-Ub-Ketten katalysiert. Es wird deshalb auch als E4 bezeichnet. Die U-Box nimmt durch elektrostatische Interaktionen eine der RING-Domäne ähnliche Konformation an, an die E2s binden (Aravind and Koonin, 2000). Das bekannteste Mitglied der U-Box-E3s ist CHIP (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein), welches falsch gefaltete Proteine nach Assoziation an die Chaperone Hsc70 oder Hsp90 erkennt und diese für den Abbau markiert.

1.1.4 Deubiquitinierungsenzyme

1.1.4.1 Klassifizierung

Die Deubiquitinierungsenzyme (DUBs) katalysieren die Spaltung von Ub und UBLs. Eine Deubiquitinierungsaktivität wurde erstmals bei der Abspaltung von Ub vom Histon H2A beschrieben (Andersen et al., 1981). Inzwischen wurde eine Vielzahl von deubiquitinierenden Proteinen identifiziert, die heute in die folgenden vier Klassen eingeordnet werden: Die UCH (Ub C-terminal hydrolase), die UBP (Ub-specific processing protease) und kürzlich entdeckt die Otubain- und JAMM-Familie. Die beiden erstgenannten gehören zu den Cysteinproteasen, die sich durch Thiolreagenzien, wie N-ethylmaleimid (NEM) und Ub-Aldehyd, hemmen lassen. In Hefe gibt es nur ein UCH und 16 UBPs. Dagegen wurden im humanen Genom ca. 100 potentielle DUBs identifiziert, von denen über 80% zur Klasse der UBPs gehören.

Die UCHs sind fast ausnahmslos kleine Proteine (20-30 kDa) mit einer 230 AS langen katalytischen Domäne, die ein konserviertes Cystein, Histidin und Aspartat enthält. *In vitro* können die UCHs sowohl Peptide als auch kleine Moleküle vom C-Terminus des Ub entfernen, aber keine Ub-Ketten oder Ub-Protein-Konjugate spalten. Die einzige Ausnahme

bildet UCH37, das Ub vom distalen Ende von Ub-Ketten abzuspalten vermag.

Die UBPs variieren in der Größe von 50 bis 300 kDa. Sie weisen ein katalytisches Cystein und ein Histidin innerhalb von zwei konservierten Domänen auf, wobei diese weit voneinander getrennt vorliegen können. Neben der Prozessierung von Ub-Vorläufern entfernen UBPs Ub von polyubiquitinierten Proteinen und von freien Poly-Ub-Ketten. Für die humanen Enzyme wurde eine systematische Nomenklatur mit der Abkürzung USP (Ub-specific protease) vorgeschlagen (HUGO Nomenclature Committee). In Hefe werden die Proteine als Ubp bezeichnet. Bis heute sind etwa 50 humane DUBs charakterisiert worden (Quesada et al., 2004).

Die 2003 gefundene Familie der Otubain (OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein) gehört zu den Cysteinproteasen und besitzt ein konserviertes Cystein, Histidin und Aspartat, jedoch keine Sequenzhomologie zu den UCHs oder UBPs (Balakirev et al., 2003).

Das JAMM (Jab1-MPN domain metalloenzyme)-Motiv (Verma et al., 2002) oder auch MPN⁺-Motiv (Maytal-Kivity et al., 2002) findet sich bei einigen eu- und allen prokaryotischen Proteinen mit MPN-Domäne und bildet das aktive Zentrum von Enzymen oder die Ligandenbindungsstelle von metallbindenden Proteinen. Die drei bisher bekannten Vertreter der DUBs sind die Lid-Untereinheit Rpn11, CSN5 (siehe 1.2.4.2) und AMSH (McCullough et al., 2004). Diese sind statt mit klassischen DUB-Inhibitoren mit Metallchelatoren, wie ortho-Phenanthrolin (OPT), hemmbar (Verma et al., 2002).

Es konnte bei einigen DUBs gezeigt werden, dass sie auch SUMO oder Nedd8 spalten oder unspezifisch für mehrere UBLs sind.

Da die Ubiquitinierung von Proteinen einen ähnlichen Stellenwert wie die Phosphorylierung in der Zelle einnimmt, kommt hiermit den DUBs, vergleichbar mit Phosphatasen, eine große Bedeutung als Zellregulatoren zu (zusammengefasst von (Amerik and Hochstrasser, 2004; Guterman and Glickman, 2004)).

1.1.4.2 Die Rolle der DUBs im UPS

Bereits 1993 wurde in der Gruppe von Hershko eine intrinsische, ATP-abhängige DUB-Aktivität am 26S Proteasom identifiziert, die durch den Metallchelator OPT gehemmt wurde (Eytan et al., 1993). Die DUB-Aktivität des 26S Proteasoms konnte dem 19S Regulator zugeordnet werden, wobei einige Ergebnisse für eine ATP-Abhängigkeit sprachen (Eytan et al., 1993; Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002) und andere nicht (Holzl et al., 2000; Lam

et al., 1997). Inzwischen wurden neben der intrinsischen Aktivität der Untereinheit Rpn11/POH1 (Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002) zwei assoziierte DUBs in humanen Zellen charakterisiert.

Zum einen wurde USP14/Ubp6 identifiziert, welches erst durch Assoziation an das 26S Proteasom aktiviert wird und Ub-Ketten abspaltet (Borodovsky et al., 2001; Leggett et al., 2002). In *S. cerevisiae* wurde die Bindung des Enzyms an Rpn1 gezeigt (Leggett et al., 2002).

Zum anderen konnte UCH37 in substöchiometrischen Mengen an das 26S Proteasom assoziiert gefunden werden. In *Drosophila melanogaster* wurde mittels Elektronenmikroskopie eine Lokalisation zwischen Base und Lid (Holzl et al., 2000) und in Hefe-2-Hybrid-Experimenten und Co-Immunpräzipitationen eine Assoziation an Rpn12 gezeigt (Li et al., 2001). UCH37 spaltet ausschließlich endständiges Ub von Ub-Ketten ab.

In *S. pombe* liegt ein UCH37-Homolog, Uch2p, vor. Stattdessen wurde in *S. cerevisiae* Doa4 am 26S Proteasom identifiziert. Die freigesetzten Ub-Ketten werden hauptsächlich von USP5/Isopeptidase T/Ubp14 vom proximalen Ende her gespalten (Amerik et al., 1997; Hadari et al., 1992).

Somit sind DUBs von drei der bisher bekannten Klassen am 26S Proteasom gefunden worden, wobei die Cysteinproteasen nicht essentiell zu sein scheinen (Amerik et al., 2000; Li et al., 2000). Eine proteolytisch inaktive Mutante der essentiellen Untereinheit Rpn11 ist lebensfähig, weist jedoch ein verlangsamtes Wachstum in *S. cerevisiae* auf (Guterman and Glickman, 2004; Maytal-Kivity et al., 2002). Damit sind die Proteasom-assoziierten DUBs Spezies-spezifisch, scheinen jedoch überlappende Funktionen auszuüben.

Die Deubiquitinierung ist die Voraussetzung für den Abbau von Substraten durch das 26S Proteasom. So könnten die DUBs den limitierenden Schritt bei der Proteolyse darstellen, das langsame Abspalten einer Ub-Kette somit Zeit für die Entfaltung und den Abbau der Substrate einräumen. Monoubiquitinierte Substrate können nicht an das 26S Proteasom binden und werden hingegen schnell deubiquitiniert und freigesetzt. Die Poly-Ub-Kette stellt somit einen weiteren Kontrollmechanismus auf dem Weg der Proteolyse dar (Guterman and Glickman, 2004).

1.2 DAS COP9 SIGNALOSOM (CSN)

1.2.1 Entdeckung

In *A. thaliana* wurden bei der Analyse von Mutanten drei Gruppen mit einem veränderten Licht-Dunkel-Verhalten identifiziert. Diese weisen eine lichtabhängige Entwicklung auch bei Dunkelheit (constitutive photomorphogenic), einen kurzen Spross (deetiolated) und akkumuliertes Anthocyanin in den Keimblättern (fusca) auf. Insgesamt werden sie heute als *cop/det/fus*-Mutanten bezeichnet (Kwok et al., 1996), da die lethalen Mutanten der *cop/det*-Gruppe (Wei and Deng, 1992) mit den *fus*-Mutanten identisch sind (Misera et al., 1994). Es wurden zehn essentielle und pleiotrope Gene identifiziert, die für die Repression der Photomorphogenese in *A. thaliana* verantwortlich sind. In Abb. 4 ist der Phänotyp der *cop9-1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (wt) zu sehen.

Es konnte 1994 gezeigt werden, dass die identifizierten Proteine COP8, COP9 und COP11 Teile eines ca. 560 kDa großen Komplexes bilden, der die Photomorphogenese steuert und aufgrund der Untereinheit den Namen COP9-Komplex erhielt (Wei et al., 1994).

Zwei Jahre später gelang die Isolierung des Komplexes aus Blumenkohl, der aus insgesamt zwölf Untereinheiten bestand und ausschließlich im Kern lokalisiert war (Chamovitz et al., 1996).

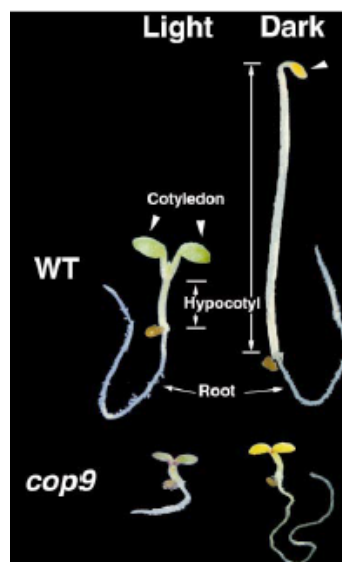


Abb. 4: Phänotyp der *cop9-1*-Mutante in *Arabidopsis thaliana*

Die Mutante weist beim Wachstum im Dunkeln statt des üblichen langen Sprosses (Hypokotyl) und der gelben, geschlossenen Keimblättern (Kotyledonen) denselben Phänotyp wie im Licht entwickelte Keimlinge inklusive Chloroplastenbildung und konstitutiver Expression von lichtinduzierten Genen auf (Wei and Deng, 1999).

Das humane Ortholog wurde 1998 während einer Präparation von 26S Proteasom aus Erythrozyten isoliert (Seeger et al., 1998). Es enthält acht Untereinheiten und weist eine Ähnlichkeit zum Lid-Subkomplex des 26S Proteasoms auf. Die zuvor bekannten Proteine Jab1 (Claret et al., 1996) und Trip15 (Lee et al., 1995) wurden als Komponenten des Komplexes identifiziert und deshalb der Name „Jab1-containing signalosome“ gewählt. Im selben Jahr konnte der Komplex ebenfalls aus dem Gehirn der Maus und aus Schweinemilz aufgereinigt werden (Wei and Deng, 1998). Inzwischen gilt das Vorkommen des Komplexes in allen Eukaryoten als gesichert.

Seit der ersten Zomes-Konferenz 1999 wird die einheitliche Bezeichnung COP9 Signalosom, kurz CSN, in der Literatur verwendet (Deng et al., 2000).

1.2.2 Architektur des Komplexes

Das CSN besteht aus acht Untereinheiten, nach abnehmendem Molekulargewicht CSN1 - CSN8 benannt (Deng et al., 2000). Die Untereinheiten CSN5 (AJH1 und AJH2) und CSN6 wurden in *A. thaliana* in jeweils zwei Isoformen gefunden (Kwok et al., 1998; Peng et al., 2001). Das erklärt, warum sie bei der ursprünglichen Analyse nicht unter den cop/det/fus-Mutanten waren (siehe Tabelle 1). Beide Untereinheiten weisen N-terminal eine MPN (Mpr1-Pad1-N-terminal)-Domäne auf. Die übrigen Untereinheiten des Komplexes enthalten eine PCI (Proteasome, COP9 signalosome, initiation factor 3)-Domäne im C-terminalen Bereich (Hofmann and Bucher, 1998). Im humanen und murinen System kommt CSN7 in zwei Isoformen vor (CSN7a und b) (Wei and Deng, 1998), in *A. thaliana* werden zwei Spleißvarianten mit noch unbekannter Funktion gebildet (CSN7i (225 AS) und CSN7ii (260 AS)) (Fu et al., 2001).

Die Zusammensetzung der Untereinheiten ist von *A. thaliana* bis zum *H. sapiens* hoch konserviert. CSN2 und CSN5 sind über 60% identisch zwischen Pflanzen und Tieren und damit die am höchsten konservierten Untereinheiten des Komplexes (Tabelle 1).

In *S. pombe* wurde ebenfalls ein CSN-Komplex, jedoch ohne die Untereinheiten CSN6 und 8, entdeckt (Mundt et al., 1999). Ein CSN-ähnlicher Komplex mit einem Protein mit MPN- und fünf Proteinen mit PCI-Domäne konnte in *S. cerevisiae* identifiziert werden (Maytal-Kivity et al., 2002; Wee et al., 2002).

Tabelle 1: Alte und neue Bezeichnungen der CSN-Untereinheiten in verschiedenen Spezies und Vergleich zum Lid
 Die neue Nomenklatur ist seit dem Jahre 2000 verbindlich (Deng et al., 2000). In *S. cerevisiae* weichen die Sequenzen der vier PCI-Proteine stark ab, so dass eine neue Nummerierung gewählt wurde. Die Zuordnung in der Tabelle basiert auf dem Vorschlag von Kay Hofmann während der Zomes 3-Konferenz (Berlin 2004). *A.t.* = *Arabidopsis thaliana*; *D.m.* = *Drosophila melanogaster*; *H.s.* = *Homo sapiens*; *S.c.* = *Saccharomyces cerevisiae*; AS = Aminosäuren

Neue Bezeichnung	Domäne	Alte Bezeichnungen		<i>S.c.</i>	Identische AS (%) zw. <i>A.t.</i> und <i>H.s.</i>	Paraloge Lid-UE	Identische AS (%) zw. CSN und Lid
		<i>A.t.</i>	<i>Mammalia und D.m.</i>				
CSN1	PCI	COP11, FUS6	Sgn1, GPS1	CSN11/PCI8	44,7%	Rpn7	19%
CSN2	PCI	FUS12	Trip15, Alien, Sgn2	CSN10/Rri2	61,1%	Rpn6	26%
CSN3	PCI	FUS11	Sgn3	CSN12	42,0%	Rpn3	20%
CSN4	PCI	COP8, FUS4	Sgn4	-	49,5%	Rpn5	19%
CSN5	MPN	AJH1, AJH2	Sgn5, JAB1	CSN5, Rri1	62,0%	Rpn11	29%
CSN6	MPN		Sgn6, hVIP	-	39,8%	Rpn8	24%
CSN7	PCI	FUS5, CSN7i, CSN7ii	Sgn7a, Sgn7b	CSN9	34,4%	Rpn9	18 bzw. 17%
CSN8	PCI	COP9, FUS7	Sgn8, hCOP9	-	32,3%	Rpn12	16%

Allerdings haben abgesehen von dem CSN5-Ortholog Rri1 die weiteren fünf Untereinheiten nur eine geringe Ähnlichkeit zu den Untereinheiten in höheren Eukaryoten. In Tabelle 1 sind die alten und neuen Bezeichnungen der CSN-Untereinheiten zusammengefasst. Die Zuordnung der Untereinheiten bei *S. cerevisiae* ist ein Vorschlag von Kay Hofmann (Fa. Memorec) basierend auf computergestützten Sequenzvergleichen der PCI-Domänen.

Mit Hefe-2-Hybrid-Experimenten, Far-Westernblots und Co-Immunpräzipitationen wurden die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen CSN-Untereinheiten aufgeklärt (Freilich et al., 1999; Fu et al., 2001; Kapelari et al., 2000; Karniol et al., 1999; Kwok et al., 1998; Serino et al., 2003; Serino et al., 1999). Ein erster Hinweis auf die Architektur des CSN und seine Ähnlichkeit zum Lid-Komplex des 26S Proteasoms konnte durch die Elektronenmikroskopie beider aus humanen Erythrozyten aufgereinigten Komplexe gewonnen werden (Kapelari et al., 2000) (Abb. 5). Deutlich sind die asymmetrische Anordnung der Untereinheiten zueinander sowie eine zentrale Furche in beiden Komplexen zu erkennen.

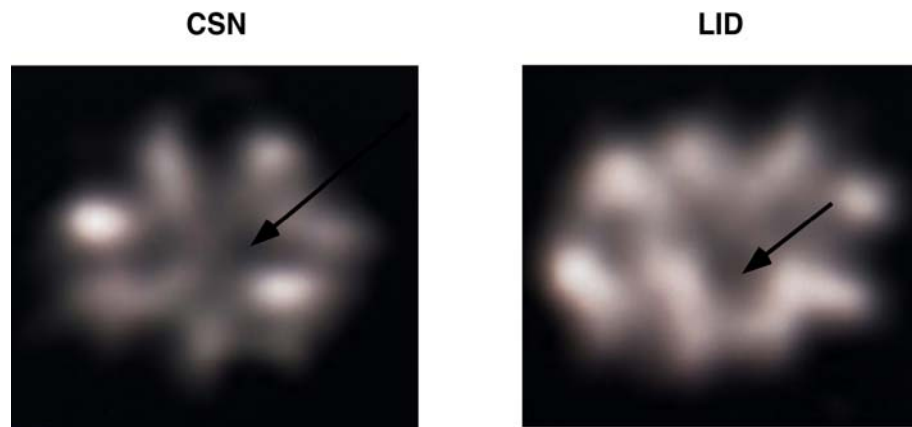


Abb. 5: Elektronenmikrographen vom CSN und Lid-Komplex

Die ungleichmäßige Anordnung der jeweils acht Untereinheiten und die zentrale Furche (durch Pfeil gekennzeichnet) sind deutlich zu sehen (Kapelari et al., 2000).

Anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Interaktionsstudien wurde ein erstes Model des Komplexes entworfen (Abb. 6). Bisher ist es nicht gelungen, Kristallstrukturen der Komplexe zu erhalten, so dass die genaue Anordnung der Untereinheiten im CSN und Lid unklar bleibt.

In *A. thaliana* (Kwok et al., 1998), *D. melanogaster* (Oron et al., 2002), *S. pombe* (Mundt et al., 2002) und *Mammalia* (Tomoda et al., 2002) wurde für einige Untereinheiten neben der Komplex-gebundenen eine CSN-unabhängige Form gefunden. Es gibt Hinweise darauf, dass ein kleiner CSN-Komplex bestehend aus den Untereinheiten CSN4-8 eine Rolle beim Transport zwischen Kern und Zytosol und der Regulation des Zellzyklus spielt (Fukumoto et al., 2005; Tomoda et al., 2002). Die genauen physiologischen Funktionen von CSN-Subkomplexen oder einzelner Untereinheiten muss noch festgestellt werden.

Die MPN-Domäne der Untereinheiten CSN5 und CSN6 sowie die PCI-Domäne der übrigen Untereinheiten werden ebenfalls in zwei weiteren Proteinkomplexen gefunden: dem Lid-Subkomplex des 26S Proteasoms und dem eukaryotischen Translations-Initiations-Komplex 3 (eIF3) (Glickman et al., 1998). Dabei weisen das CSN und der Lid-Subkomplex eine Stöchiometrie der MPN- zu den PCI-Untereinheiten von „2+6“ und nach neuesten Untersuchungen der eIF3-Komplex „2+5“ auf, wobei beim eIF3-Komplex noch fünf weitere Untereinheiten ohne eines der Motive enthalten sind (Scheel and Hofmann, 2005).

Die Ähnlichkeit der Sequenzen zwischen CSN und Lid reichen über die Bereiche der MPN und PCI-Domänen hinaus. Jede Untereinheit besitzt genau eine paraloge Untereinheit im anderen Komplex, was einen gemeinsamen evolutionären Vorläufer vermuten lässt.

Die PCI- oder PINT (Proteasome subunits, Int-6, Nip-1, and Trip15)-Domäne (Aravind and Ponting, 1998) besteht aus zahlreichen α -Helices und scheint für die Interaktion der CSN-Untereinheiten miteinander notwendig zu sein (Tsuge et al., 2001). Sie könnte somit als eine Art Gerüst für die Assemblierung des Komplexes und assoziierter Proteine dienen. Neuere Daten weisen jedoch darauf hin, dass noch weitere Bereiche in den Proteinen für die Wechselwirkung verantwortlich sein müssen, da die PCI-Domäne alleine für den Komplexaufbau nicht ausreichend ist (Huang et al., 2005).

Die MPN-Domäne wird auch in anderen, von PCI-Komplexen unabhängigen Proteinen sowie in Prokaryoten gefunden. Innerhalb der MPN-Domäne einiger Proteine konnte 2002 ein so genanntes MPN⁺ oder JAMM-Motiv lokalisiert werden. Das Motiv wurde nur in CSN5 und Rpn11, nicht jedoch in CSN6 und Rpn8 oder den eIF3-Untereinheiten identifiziert. Beide Untereinheiten zählen somit zu den DUBs (siehe auch 1.1.4).

1.2.3 Interaktionspartner des CSN

Neben den Interaktionen der CSN-Untereinheiten miteinander sind auch zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Proteinen beschrieben. In Abb. 6 sind die bisher bekannten interagierenden Proteine neben der jeweiligen CSN-Untereinheit dargestellt. Auffällig ist die häufige Bindung von Proteinen an CSN5. Dabei gilt es zu beachten, dass bei Hefe-2-Hybrid-Experimenten eine Bindung von CSN5 an die GAL4 DNA-bindende Domäne gezeigt wurde, so dass es sich bei einigen Interaktionen um unspezifische Bindungen handeln könnte (Nordgard et al., 2001).

Obwohl bei vielen Proteinen die physiologische Relevanz einer Interaktion unklar bleibt, scheint das CSN eine Rolle beim Zellzyklus (p27^{kip1}, Vpr), bei der Signaltransduktion (PR, SRC-1) sowie im UPS (Rbx1, Culline; siehe 1.2.5) zu spielen (zusammengefasst von (Becht-Otschir et al., 2005)).

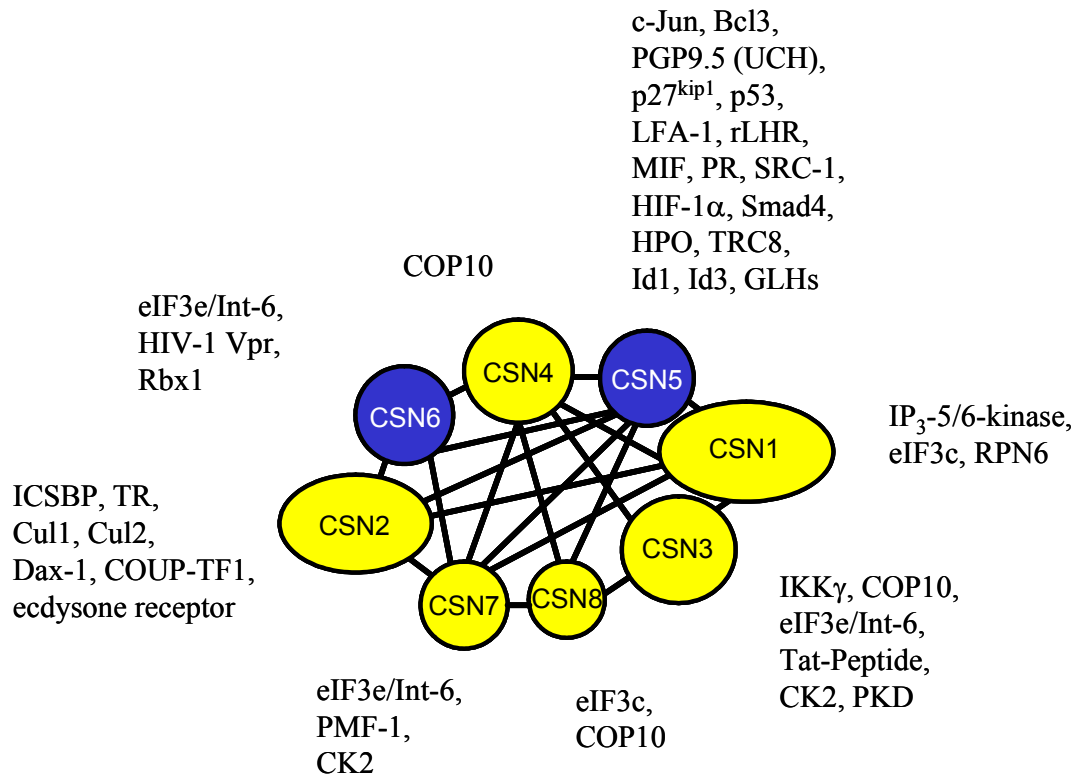


Abb. 6: Modell des CSN mit den bisher bekannten interagierenden Proteinen

Interaktionen der Untereinheiten miteinander sind durch die Querverbindungen dargestellt. Assoziierte Proteine stehen an der jeweiligen Untereinheit, mit der sie interagieren. gelb = PCI-Domäne; blau = MPN-Domäne

Es konnten direkte Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten des CSN, 26S Proteasoms und des eIF3-Komplex gezeigt werden. Die Untereinheit eIF3e/INT6 mit PCI-Domäne interagiert mit CSN7 und bei Hefe-2-Hybrid-Experimenten mit Rpt4, CSN3, CSN6 sowie mit CSN7 (Hoareau Alves et al., 2002). eIF3c co-immunpräzipitiert CSN1 und CSN8 (Yahalom et al., 2001). Die Interaktion von eIF3e/INT6 mit Rpn5 hat einen Einfluss auf die Aktivität und Lokalisation des 26S Proteasoms und beeinflusst so die Zellteilung (Yen et al., 2003).

Das CSN wird zusammen mit dem 26S Proteasom aus humanen Erythrozyten aufgereinigt (Seeger et al., 1998). Bei Hefe-2-Hybrid-Experimenten wurde in *A. thaliana* eine Wechselwirkung von Rpn6 mit der C-terminalen Domäne von atCSN1 (Kwok et al., 1999) und in *D. melanogaster* eine Wechselwirkung mit CSN2/Alien gefunden (Lier and Paululat, 2002).

Auf diese Ergebnisse stützt sich die Hypothese eines „alternativen Lid“, nach der das CSN anstelle des Lid-Subkomplexes an 20S-Base-Komplexe binden könnte (Li and Deng, 2003). Dem widerspricht die Bindung von CSN-Untereinheiten an die Lid-Untereinheit Rpn6. Denkbar ist auch eine Assoziation des CSN an das gesamte 26S Proteasom. Da das Proteasom

in Zellen sehr weit verbreitet ist, müssen auch unspezifische Bindungen als Erklärung für bisher publizierte Interaktionen in Betracht gezogen werden.

1.2.4 Funktionen

Zu Beginn meiner Promotion waren zwei Aktivitäten des CSN bekannt: eine Kinase- und eine Deneddylierungsaktivität.

1.2.4.1 Kinaseaktivität

Bisher wurde eine Assoziation von drei Kinasen, der Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase (IP₃-5/6-Kinase), der Caseinkinase 2 (CK2) und der Proteinkinase D (PKD/PKC μ), am CSN beschrieben (Sun et al., 2002; Uhle et al., 2003). Die IP₃-5/6-Kinase bindet direkt an CSN1. Die wahrscheinliche Bindungsstelle für die CK2 und PKD ist CSN3, wobei eine zusätzliche Wechselwirkung der CK2 mit CSN7 besteht (Abb. 6).

Eine CSN-vermittelte Phosphorylierung im N-terminalen Bereich von c-Jun führt zur Stabilisierung des Proteins und steigert somit die AP1-Transaktivierungsaktivität (Seeger et al., 1998). Dagegen führt die CSN-abhängige Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 zum Abbau durch das 26S Proteasom (Bech-Otschir et al., 2001). Eine Hemmung der Kinaseaktivität tritt durch die antiinflammatorischen und -karzinogenen Wirkstoffe Curcumin (Henke et al., 1999) und Emodin (Uhle et al., 2003) auf.

1.2.4.2 Deneddylierungsaktivität

Erstmals konnte 2001 in *S. pombe* die Deneddylierung von Cullinen mit dem CSN-Komplex in Zusammenhang gebracht werden. Die *csn*-Mutanten weisen fast ausschließlich Culline in der neddylierten Form auf, und es konnte eine Bindung von Cul1 und Rbx1 an CSN2, 6 und den N-Terminus von CSN1 gezeigt werden (Lyapina et al., 2001). Inzwischen ist diese Deneddylierungsaktivität dem JAMM- oder MPN⁺-Motiv innerhalb der MPN-Domäne von CSN5 zugeordnet worden (Cope et al., 2002). Das katalytische Zentrum bilden dabei zwei Histidine, ein Aspartat sowie ein weiter entfernt liegendes Glutamat, welche ein Zinkion koordinieren (Abb. 7).

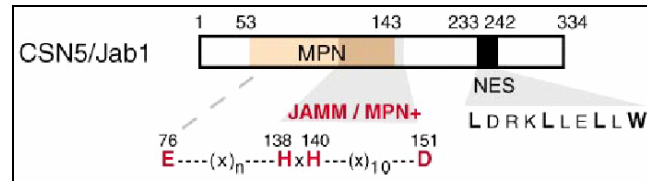


Abb. 7: Das JAMM/MPN⁺-Motiv innerhalb der MPN-Domäne von CSN5

Die vier das katalytische Zentrum bildenden Aminosäuren (E - H - H - D) sind rot hervorgehoben (Wei and Deng, 2003).

Die enzymatische Aktivität der CSN5-Untereinheit konnte bis jetzt nur in der komplexgebundenen, nicht aber in der frei vorliegenden Form gezeigt werden (Cope et al., 2002).

Die Kristallstruktur eines prokaryotischen Proteins mit JAMM-Motiv aus *Archaeoglobobolus fulgidus* (AF2198) wurde 2003 gelöst (Tran et al., 2003). Die Struktur ähnelt dabei weniger einer Metalloprotease, wie bisher vermutet, als vielmehr einer Deaminase, der eine Helix-Struktur fehlt (Abb. 8).

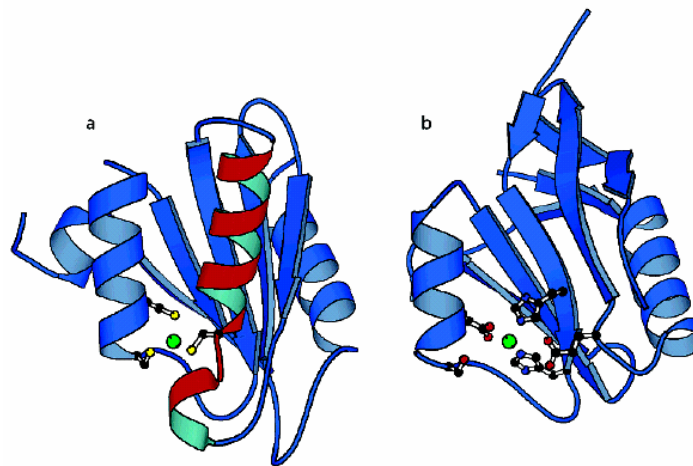


Abb. 8: Strukturvergleich eines Proteins mit JAMM-Motiv mit einer Deaminase

(a) Struktur einer Untereinheit der tetrameren Cytidineaminase (PDB ID code 1jtk) und (b) des prokaryotischen Proteins AF2198 mit JAMM-Motiv aus *Archaeoglobobolus fulgidus*. Die zusätzliche Helix der Deaminase ist rot, das Zinkion grün hervorgehoben (Tran et al., 2003).

1.2.5 Das CSN als Komponente des Ub-26S Proteasomsystems

Die intrinsischen und assoziierten Aktivitäten des CSN tragen in vielerlei Hinsicht zur Regulation des UPS bei. Durch die Phosphorylierung von c-Jun und die Bindung von Id3 am CSN wird der Abbau dieser Transkriptionsregulatoren durch das UPS verhindert (Berse et al.,

2004; Naumann et al., 1999). Die direkte Bindung des CSN an Culline mit anschließender Deneddylierung durch CSN5 *in vitro* führt zu einer Verminderung der Ligaseaktivität (Lyapina et al., 2001). *In vivo* konnte jedoch eine Steigerung der Ligaseaktivität abhängig vom CSN beobachtet werden (Cope et al., 2002). Diese Diskrepanz konnte noch nicht vollständig erklärt werden.

Wolf et al. postulieren ein Modell, bei dem das CSN als eine Art Plattform zur Reassemblierung von spezifischen E3-Komplexen dient (Wolf et al., 2003). Durch die Abspaltung von Nedd8 vom Cullin durch das CSN kommt es zur Dissoziation des F-Box-Proteins. Die Bindung von E2s an die Ub-Ligase wird ebenfalls verhindert. Im nächsten Schritt könnte dann die erneute Neddylierung zur Anlagerung eines neuen F-Box-Proteins mit spezifischem Substrat erfolgen.

Beim SCF-Komplex ist noch ein weiteres Protein, CAND1 (Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1), in den dynamischen Prozess der Reassemblierung involviert (Cope and Deshaies, 2003). CAND1 bindet an deneddyliertes Cul1 und inhibiert die Ub-Ligaseaktivität, da es den Bindungsplatz für Skp1 (Zheng et al., 2002) oder den des CSN (Min et al., 2005) blockiert. Die Neddylierung führt zur Dissoziation von CAND1 und ein neues F-Box-Protein wird über Skp1 gebunden. Zur Beantwortung der Frage, welche Funktionen CAND1 und das CSN genau in diesem Prozess der E3-Ligase-Assemblierung wahrnehmen, bedarf es jedoch noch weiterer Forschung.

Trotz der Ähnlichkeiten zwischen dem CSN und dem Lid-Subkomplex sind bis heute keine Interaktionen zwischen E3 Ligasen und dem Lid bekannt. Die wenigen bekannten Ub-Ligasen binden direkt an die Base-Untereinheiten des 26S Proteasoms (Corn et al., 2003; Xie and Varshavsky, 2002).

2 ZIELSETZUNG

Das COP9 Signalosom ist ein konservierter Multiproteinkomplex, der in höheren Eukaryoten essentiell ist. Seine genaue Funktion und Bedeutung konnte in der Zelle bis heute nicht aufgeklärt werden. Die Hinweise auf eine Beteiligung am UPS und der Signaltransduktion scheinen jedoch eindeutig. In dieser Arbeit sollten weitere Schritte zur Charakterisierung des Komplexes unternommen und Erklärungen zu seiner Funktion gefunden werden.

Zu Beginn meiner Promotion waren noch keine systematischen Bindungsstudien durchgeführt worden, die eine physische Interaktion des CSN mit dem 26S Proteasom zeigen. Deshalb sollte zunächst die Hypothese des CSN als „alternativer Lid“, d.h. Bindung des CSN an den Base-Subkomplex anstelle des Lid, untersucht werden. Hier sollten verschiedene Methoden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* angewendet werden, die eine Präparation der Proteinkomplexe unter optimierten Bedingungen aus geeignetem Ausgangsmaterial einschlossen. Ebenfalls sollte die Möglichkeit einer Interaktion des CSN mit dem gesamten 26S Proteasom getestet werden. Weiterhin galt es, eine funktionelle Bedeutung für diese mögliche Interaktion zu finden und einen Einfluss einerseits auf die Peptidase- und andererseits auf die Proteaseaktivität des 26S Proteasoms zu überprüfen.

In einem zweiten Schritt sollte nach weiteren assoziierten Proteinen neben den bekannten Kinasen am CSN gesucht werden, die möglicherweise auch neue Aktivitäten am CSN bereitstellen. Als Hinweis dienten vorliegende Ergebnisse aus Elektronenmikroskopiestudien des CSN mit goldmarkiertem Tetra-Ub (Ub₄), die eine Assoziation mit einem DUB nahe legten.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 Verwendete Primer

Alle Primer wurden bei der Firma Biotex bestellt.

Oligonukleotid-bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
THR2	AAG CTT TTA GTT AGT GTG CAT ACA GTT TTC A	<i>Hind</i> III-Schnittstelle vor nt 2859-2835 der CDS von USP15
THR4	CTA GTC GAC TTA GTT AGT GTG CAT ACA GT	<i>Sal</i> I-Schnittstelle vor nt 2946-2926 der CDS von USP15
THR5	CAA ATC AAC CTT AGT TGC TCC TGA GTG TGC TAA G	nt 1281-1249 der CDS von USP15 mit Punktmutation Cys 422 zu Ala
THR6	TTG CTG ATG TTC TTT AGC ATT CGG ACA ATA CCA	nt 2364-2332 der CDS von USP15 mit Punktmutation Cys 783 zu Ala
THR7	CTT AGC ACA CTC AGG AGC AAC TAA GGT TGA TTT G	nt 1272-1239 der CDS von USP15 mit Punktmutation Cys 419 zu Ala
THS2	GAG CTC TTA TGG CGG AAG GCG GAG CGG CGG A	<i>Sac</i> I-Schnittstelle vor nt 1-23 der CDS von USP15
THS4	GCA AAG CTT ATG GCG GAA GGC GGA GCG GC	<i>Hind</i> III-Schnittstelle vor nt 1-20 der CDS von USP15
THS5	TTA GTT TGT CCT GAG GCT GCT AAG ATT TCA GTA	nt 1249-1281 der CDS von USP15 mit Punktmutation Cys 422 zu Ala
THS6	TGG TAT TGT CCG AAT GCT AAA GAA CAT CAG CAA	nt 2332-2364 der CDS von USP15 mit Punktmutation Cys 783 zu Ala
THS7	TGG TAT TGT CCG AAT GCT AAA GAA CAT CAG CAA	nt 1239-1272 der CDS von USP15 mit Punktmutation Cys 419 zu Ala
UbpR2	GTA TAA CTC GAG TGT CTG AAT T	nt 1799-1778 der CDS von USP15 mit interner <i>Xho</i> I-Schnittstelle
UbpS3	AAT TCA GAC ACT CGA GTT ATA C	nt 1778-1799 der CDS von USP15 mit interner <i>Xho</i> I-Schnittstelle
USP15-S932A F	GGC ATC CCA TTA GAA GCT GAT GAA GAT AGC AAT	nt 2779-2811 der CDS von USP15 mit Punktmutation Ser 932 zu Ala
USP15-S932A R	ATT GCT ATC TTC ATC AGC TTC TAA TGG GAT GCC	nt 2811-2779 der CDS von USP15 mit Punktmutation Ser 932 zu Ala

(CDS = codierende DNA-Sequenz; nt = Nukleotid)

3.1.2 Vektoren

pCR2.1	TA Cloning Vektor (Invitrogen)
pQE3x	Vektor zur Generierung von N-terminalen His-Tag Proteinen (Qiagen)
pcDNA3-Flag	Vektor für eukaryotische Expression, N-terminaler Flag-Tag (von M. Naumann, Universität Magdeburg)
pCMV-Tag3A	Vektor für eukaryotische Expression, N-terminaler myc-Tag (Stratagene)
pSG5-Rbx1-zz	Vektor für eukaryotische Expression mit Rbx1 cDNA und C-terminalem zz-Tag (von M. Seeger, Inst. f. Biochemie, Charité)

3.1.3 Verwendete Antikörper

Anti- α 6 (C2)	Maus, monoklonal, WB 1:2000, IP 5-10 μ l, von C. Hendil (Dänemark)
Anti-CSN1	Kaninchen, polyklonal, WB 1:5000, Biomol, Affiniti
Anti-CSN2	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000
Anti-CSN3	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000
Anti-CSN5	Maus, monoklonal, WB 1:5000, von B. Christy
Anti-CSN6	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000
Anti-CSN7a	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, IP 10-15 μ l
Anti-E7	Maus, monoklonal, WB 1:300, Santa Cruz Biotechnology
Anti-Flag	Maus, monoklonal, WB 1:1000, Sigma
Anti-GFP	Maus, monoklonal, WB 1:2000, Covance Research Products Inc.
Anti-GST	Kaninchen, polyklonal, WB 1:1000, Santa Cruz Biotechnology
Anti-His ₆	Maus, monoklonal (RGS-His ₆), WB 1:2000, Qiagen
Anti-Mdm2 (OP46)	Maus, monoklonal, WB 1:1000, Merck Biosciences, Calbiochem
Anti-Muc1 ₉₅₀₋₉₅₈	Maus, monoklonal (14G2), WB 1:200, von Dr. A. Zvirbliene (Litauen)
Anti-c-Myc	Maus, monoklonal, WB 1:200, Oncogene
Anti-Rbx1	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, Zymed Laboratories Inc.
Anti-Rpn2 (S1)	Maus, monoklonal, WB 1:2000, von C. Hendil (Kopenhagen, Dänemark)
Anti-Rpn7 (S10a)	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000
Anti-Rpn8 (S12, P8)	Schaf, polyklonal, WB 1:1000
Anti-Rpt2 (S4)	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, von C. Gordon (Edinburgh, UK)
Anti-Rpt3 (S6b)	Kaninchen, polyklonal, WB 1:1000, Biomol, Affiniti
Anti-Rpt5 (S6a)	Kaninchen, polyklonal, WB 1:1000, von M. Rechsteiner (Salt Lake City, USA)
Anti-20S	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000, Biomol, Affiniti
Anti-Ubiquitin	Kaninchen, polyklonal, WB 1:500, Dako
Anti-USP15	Kaninchen, polyklonal, WB 1:2000-5000
Anti-mouse-POD	Schaf, WB 1:2000-3000, Seramun
Anti-rabbit-POD	Schaf, WB 1:2000-3000, Seramun

WB = Westernblot; IP = Immunpräzipitation

3.1.4 Geräte

Agarosegelkammer	horizontale Agarosegelkammer (Renner GmbH)
Bilddokumentationssystem	UV-Systeme (Intas)
Brutschrank	Modell B 5090 E (Kendro Laboratory Products) Modell function line (Kendro Laboratory Products)
Elektroporationsgerät	EasyjecT Optima (Flowgen Bioscience Limited)
Feinwaagen	BP221S und BP610 (Sartorius)
FPLC System + Säulen	(Amersham Biosciences) Säulen: ResourceQ und MonoQ (5/50 GL)
Gefrierschränke	-20°C Comfort (Liebmann) -80°C (Liebmann)
Geltrockner	Phero-temp 40 (Biotec-Fischer)
Heizblock	Thermomixer comfort (Eppendorf)

Kühlzentrifugen	Biofuge 15R (Kendro Laboratory Products) Modell J2-21 (Beckman Coulter)
Magnetrührer	MR 3001K (Heidolph Instruments)
Mikroskop	Wilovert 30 (Helmut Hund GmbH)
Fluoreszenz-	FluoStar Reader + Easy-Software Version 7.01 (Tecan)
Mikrotiterplattenscanner	Fluoroscanner II (Labsystems)
Nativgelsystem	Phast System (Amersham Biosciences)
PCR-Thermocycler	Tpersonal (Biometra)
pH-Meter	pH 330 (WTW)
Photometer	Ultrospec 1000 (Amersham Biosciences)
Pipetten	1 ml, 200 µl, 20 µl (Gilson International)
Schüttler	Unimax 2010 (Heidolph Instruments)
SDS-PAGE System	Mini-Protean 3Cell (Bio-Rad Laboratories)
Spannungsquelle	Power-Supply, Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories)
Tischzentrifugen	Biofuge fresco (Kendro Laboratory Products) Megafuge 1.0 R (Kendro Laboratory Products)
Ultraschallgerät	Sonoplus GM70 (BANDELIN electronic)
Ultrazentrifugen + Rotoren	L7-55 und L-70 (Beckman Coulter) Rotoren: SW28 und SW40
Vakuumtrockner	Speed Vac (Savant)
Vortexer	Reax control (Heidolph Instruments)
Wasserbad	Modell C10 (Thermo Electron Cooperation)
Westernblotsystem	Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories)
Zellkulturinkubator	HERAcell (Kendro Laboratory Products)
Zentrifugen + Rotoren	J2-HS und Avanti J-25 (Beckman Coulter) Rotoren: JA10, JA14, JA20, JA25.50

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Dialysemembran	MWCO 6 - 8000 (Spectrum Europe)
Filterpapier	GB002 Gel-blotting-Papier (Schleicher & Schuell)
Filterzentrifugeneinheit	Amicon Ultra 10000 MWCO (Millipore)
Gradientengel 4-15%	PhastGel (Amersham Biosciences)
Küvetten	Quarzküvetten Suprasil (Hellma) Elektroporation 25 x 2 mm (PEQLAB Biotechnologie) Acrylküvette (Sarstedt)
Nitrocellulosemembran	Trans-Blot Transfer Medium (Bio-Rad Laboratories)
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1 ml (Sarstedt)
Reaktionsgefäße	0,5 ml Safe-Lock tubes (Eppendorf) 1,5 ml, 2 ml, 15 ml und 50 ml, steril (Greiner Bio-One GmbH)
Röntgenfilme	X-Omat UV Film und Biomax MR (Kodak)
Plastikpipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml, steril (Sarstedt)
Zellkulturflaschen	25 cm ² (50 ml); 75 cm ² (250 ml), 182 cm ² (650 ml) (Greiner Bio-One GmbH)
Ultrazentrifugen-Röhrchen	25 x 89 mm Polyclear Röhrchen für SW28 (Beranek) 14 x 95 mm Polyclear Röhrchen für SW40 (Beranek)

3.1.6 Chemikalien

Aktivkohle	(Roth)
Ampicillin	(Sigma-Aldrich)
Aprotinin	(Sigma-Aldrich)
APS	(Roth)
ATP	(Roche Diagnostics)
Curcumin	(Roth)
DEAE Cellulose	(Sigma-Aldrich)
DNA-Marker: 1 kb DNA-Ladder	(Invitrogen, Life Technologies)
Emodin	(Merck Biosciences, Calbiochem)
Ethidiumbromid	(Roche Diagnostics)

Fetales Kälberserum (FCS)	(Biochrom)
[γ - ³² P]ATP	(Amersham Biosciences)
Imidazol	(Sigma-Aldrich)
Kanamycin	(Sigma-Aldrich)
Kreatinphosphokinase	(Sigma-Aldrich)
Kreatinphosphat	(Sigma-Aldrich)
MG132	(Biomol)
Ni-NTA-Agarose + Ni-NTA Magnetagarosebeads	(Qiagen)
Lipofectamin 2000	(Invitrogen)
Penicillin (50 U/ml)	(Invitrogen, Gibco)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, 50 mM in Isopropanol)	(Roth)
Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 30 (37,5 : 1))	(Roth)
ProteinA-Sepharose CL-4B	(Amersham Biosciences)
Protein-Marker (High-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker)	(Amersham Biosciences)
Resveratrol	(Merck KGaA, Calbiochem)
SDS	(Serva)
SDS-Ladepuffer Roti-Load 1 (4x-Konzentrat)	(Roth)
Streptomycin (50 µg/ml)	(Invitrogen, Gibco)
Suc-LLVY-AMC (N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methyl-cumarin, Endkonz. 4 mM in DMSO)	(Bachem)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	(Roth)
Trypanblau	(Roche Diagnostics)
X-Gal	(Stratagene)

Alle weiteren gängigen Laborchemikalien wurden von der Firma AppliChem bezogen.

3.1.7 Puffer und Lösungen

10 x AB-Puffer	300 mM Tris, 100 mM KCl, 5 mM DTT pH 7,8
6 x AuftragspufferA	60% Glycerin, 0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylen-Cyanol in 1 x TAE
5 x AuftragspufferB	50% Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,4% Xylen-Orange G in 1 x TAE
Bindungspuffer 20	20 mM Tris, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0.005% Tween20 pH 8,0
Bindungspuffer 40	20 mM Tris, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH 8,0
Blockmilch	5% [w/v] Magermilchpulver in PBS
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol pH 8,3
Coomassie-Färbelösung	2% [w/v] Coomassie Brilliant Blau R-250, 45% Methanol, 10% Essigsäure
Entfärbelösung	10% Essigsäure, 30% Methanol
Mono-Lysispuffer	50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA ergänzt mit 2 mM ATP, 5 mM MgCl ₂ , 10 µg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF
Lysispuffer	40 mM Tris, pH 7,2, 0,2% NP40, 2 mM β -Mercaptoethanol
PBS	8 g NaCl, 1,35 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ , in 800 ml dH ₂ O lösen, auf pH 7,4 einstellen mit HCl, ad 1 l
PBST	PBS + 0,1% Tween
Ponceau-Färbelösung	0,2% Ponceau S in 5% Trichloressigsäure
Puffer A5	20 mM Tris, pH 7,2, 50 mM KCl, 5% Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol
Puffer A10	20 mM Tris, pH 7,2, 50 mM KCl, 10% Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol
Puffer A40	20 mM Tris, pH 7,2, 50 mM KCl, 40% Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol
Puffer B400	20 mM Tris, pH 7,2, 400 mM KCl, 10% Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol
Puffer B1000	20 mM Tris, pH 7,2, 1 M KCl, 10% Glycerin, 1 mM β -Mercaptoethanol
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS in dH ₂ O
Strippingpuffer	62,5 mM Tris, pH 6,7, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS
10 x TAE	0,4 M Tris, 20 mM EDTA mit Essigsäure pH 8,5 einstellen
TFB1	10 mM CaCl ₂ , 15% Glycerin, 30 mM KAc, pH 5,8, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂
TFB2	10 mM MOPS, pH 7,0, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15% Glycerin

Triple-Lysispuffer 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,02% Natriumazid, ergänzt mit 10 µg/ml Aprotinin und 1 mM PMSF

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Aqua dest. angesetzt.

3.1.8 Nährmedien

LB-Medium 1% [w/v] Bacto-Trypton (BD, Difco), 0,5% [w/v] Hefeextrakt (Merck), 1% NaCl, pH 7,5
 LB-Agar LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar (BD, Difco)
 SOB-Medium 2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 6,8 - 7,0
 SOC-Medium SOB-Medium mit 10 mM MgCl₂ und 20 mM Glucose

Als Antibiotika wurden Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml und Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 µg/ml verwendet.

3.1.9 Enzyme und Kits

CK2 (rekombinant, 1 U/mg)	(Merck KGaA, Calbiochem, Biomol)
dNTP Set (à 50 mM)	(Invitex)
<i>Dpn</i> I (20000 U/ml)	(New England Biolabs)
ECL tm western blotting detection reagent	(Amersham Biosciences)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	(Qiagen)
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	(Amersham Biosciences)
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	(Invitex)
λ-Proteinphosphatase	(New England Biolabs)
NEB1, NEB2, NEB3 und NEB4 mit BSA	(New England Biolabs)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase mit 10 x <i>Pfu</i> -Polymerase-Puffer	(Promega)
Restriktionsenzyme	(New England Biolabs)
PKD (rekombinant, 450 U/mg)	(Merck KGaA, Calbiochem, Biomol)
T4 DNA Ligase	(New England Biolabs)
TA Cloning Kit	(Invitrogen, Gibco)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (1 U/µl) mit 10 x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer	(Roche Diagnostics)

3.1.10 *E. coli*-Stämme

DH5α	F ⁻ 80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA96</i>
INVαF' (Invitrogen)	F' <i>relA1 φ80lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 λ ⁻ <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ , <i>m_k</i> ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA96</i>
M15 [pRep4] (Qiagen)	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺
SG13009 [pRep4] (Qiagen)	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺

3.1.11 Eukaryotische Zelllinien

HeLa	adhärente, humane Cervixkarzinomzelllinie
B8	murine Fibroblastenzelllinie aus BALB/c C4 Zellen, stabil transfiziert mit MCMV IE1-Gen, Expression von pp89 (Groettrup et al., 1997)

Die eukaryontischen Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für HeLa-Zellen wurde als Medium RPMI 1640 (Biochrom), für B8-Zellen Basal ISCOVE Medium (Biochrom) mit jeweils 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin verwendet.

Für die transiente Transfektion wurde als Zellkulturmedium Opti-MEM (Invitrogen, Gibco) eingesetzt.

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 Klonierung von humanen USP15-Konstrukten

Die Klonierung erfolgte in zwei Teilen (N- und C-termUSP15) mittels PCR (3.2.6) aus einer HeLa cDNA-Bank unter Verwendung der internen *XhoI*-Schnittstelle. Es wurden für die erste PCR die Primer THS2 und UbpR3 (3.1.1), für die zweite PCR die Primer UbpS3 und THR2 verwendet. Gemäß den Angaben des TA Cloning Kit folgte die Ligation in pCR2.1 und die Transformation in INV α F' *E. coli*.

Anschließend wurden beide Vektoren mit *XhoI* verdaut. Dabei wurde der Vektor pCR2.1-N-termUSP15 geöffnet und dephosphoryliert und das C-termUSP15-Fragment aus pCR2.1-C-termUSP15 ausgeschnitten. Die Ligation lieferte pCR2.1-USP15.

Die anschließende Sequenzierung ergab die Sequenz der Spleißvariante 2 des USP15 (SWISS-PROT: Q9Y4E8-2) mit zwei Mutationen, T246C und T1248C, die keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben.

Unter Verwendung von *SacI* und *HindIII* wurde dann USP15 in pQE32 zur Generierung eines Proteins mit N-terminalem His-Tag umklontiert.

Das Fragment USP15 (1-488) wurde durch Restriktionsverdau des Vektors pCR2.1-N-termUSP15 mit *SacI* und *PstI* und Umklonierung in den Vektor pQE32 gewonnen. Zur Generierung des Fragmentes USP15 (724-952) wurde der Vektor pCR2.1-C-termUSP15 mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten und das Fragment in den Vektor pQE31 umklontiert.

Für die Expression in eukaryotischen Zellen wurde eine PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase mit den Primern THS4 und THR4 und pQE32-USP15 als Matrize durchgeführt. Das Fragment wurde über *SalI* und *HindIII* in den Vektor pCMV-Tag3B kloniert.

Für den Austausch von einzelnen Aminosäuren in der USP15-Sequenz wurden eine PCR mit der *Pfu*-DNA-Polymerase mit den Primerpaaren THS5/THR5, THS6/THR6 sowie THS7/THR7 jeweils mit den Vektoren pQE32-USP15 und pCMV-Tag3B-USP15 als Matrizen durchgeführt. Nach Aufreinigung der PCR-Ansätze (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit) wurde ein *DpnI*-Verdau für 1 h bei 37°C durchgeführt und die linearisierten Plasmide direkt in die *E. coli*-Stämme M15 bzw. DH5 α transformiert (3.2.14, 3.2.15).

3.2.2 Anzucht von *E. coli*-Stämmen

Die *E. coli*-Kulturen wurden bei 37°C mit 180 rpm in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum geschüttelt. Bis zu 15 ml Medium wurden mit einer Einzelkolonie oder Glycerinkultur beimpft und über Nacht inkubiert. Die Bakterienvermehrung wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) kontrolliert.

3.2.3 Kryokonservierung

Es wurde 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur 2 min mit 13000 rpm bei RT abzentrifugiert und das Pellet in 50 μ l LB-Medium mit 40% Glycerin und entsprechendem Antibiotikum resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Plasmidisolierung

3.2.4.1 Die schnelle DNA-Isolierung

Zu 0,5 ml einer Übernachtskultur wurden 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt, 1 min kräftig geschüttelt und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge). Aus der oberen Phase wurden 400 μ l zur Fällung in 280 μ l Isopropanol (RT) überführt. Nach kurzem Schütteln erfolgte eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm. Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuumtrockner oder an der Luft getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 25 μ l H₂O.

3.2.4.2 Mini-Präp

Die Plasmidisolierung wurde aus 2 ml Übernachtskultur gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (Invitex). Die DNA wurde mit 50 µl dH₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (3.2.5) oder durch Abschätzung auf dem Agarosegel.

3.2.4.3 Maxi-Präp

Zur Gewinnung großer DNA-Mengen wurde zunächst eine Vorkultur von 2 ml angesetzt und mit dieser 150 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Maxi-Präparation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (Qiagen). Die getrocknete DNA wurde in 2 ml PBS gelöst und in Aliquots bei -80°C gelagert.

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Es erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA basierend auf dem Lambert Beerschen Gesetz durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Vereinfacht gelten bei einer Absorption von eins folgende Konzentrationen für Nukleinsäuren: dsDNA 50 µg/ml, ssDNA 37 µg/ml, RNA 40 µg/ml.

3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für einen 50 µl-Ansatz mit der *Taq*-DNA-Polymerase wurden folgende Reagenzien verwendet:

Volumen	Reagenz	Endkonzentration
5 µl	10 x <i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Puffer mit Magnesium	1 x
1 µl	HeLa cDNA-Bank	
1,5 µl	Primer 1 (10 µM)	0,3 µM
1,5 µl	Primer 2 (10 µM)	0,3 µM
5 µl	dNTP-Mix (je 2 mM)	200 µM
3 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	3 U
ad 50 µl	ddH ₂ O	

Die PCR wurde in einem PCR-Thermocycler mit Deckelheizung und folgenden Zyklen durchgeführt:

Vorzyklus:	120 s	94°C	(Denaturierung)
Hauptzyklus (30x):	30 s	94°C	(Denaturierung)
	30 s	T _a	(Primer-Anlagerung)
	x s	72°C	(Verlängerung)
Endzyklus:	720 s	72°C	(Vervollständigung von inkompletten PCR-Produkten)

Die Zeit für die Verlängerung ergab sich aus der Länge des Inserts (1 min/1000 bp). Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (0) durchgeführt.

3.2.7 Site-directed Mutagenese

Zur Mutation einer vorhandenen Sequenz wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt und die Zyklenzahl auf zwölf verringert. Die Konzentrationen im Ansatz wurden wie folgt variiert:

Volumen	Reagenz	Endkonzentration
5 µl	10 x <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase-Puffer	1 x
x µl	DNA-Matrize	50-1000 ng
2,5 µl	Primer 1 (10 µM)	0,5 µM
2,5 µl	Primer 2 (10 µM)	0,5 µM
10 µl	dNTP-Mix (je 2 mM)	400 µM
2 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	10 U
ad 50 µl	ddH ₂ O	

Es erfolgte eine Inkubation nach folgendem Schema, wobei für die Verlängerung des zu mutierenden Vektors 2 min pro 1000 bp angesetzt wurden:

Vorzyklus:	120 s	94°C	(Denaturierung)
Hauptzyklus (12x):	30 s	94°C	(Denaturierung)
	60 s	55°C	(Primer-Anlagerung)
	x s	68°C	(Verlängerung)
Endzyklus:	720 s	68°C	(Vervollständigung von inkompletten PCR-Produkten)

3.2.8 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe wurden 0,7 bis 1,2%ige Agarosegele mit 0,75 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit Auftragspuffer A oder B (Endkonz. 1 x) versetzt, als DNA-Längenstandard diente ein DNA-Marker (Invitrogen). Das Fragment mit 1636 bp entspricht 10% der Gesamtkonzentration. Als Laufpuffer diente 1 x TAE, die Elektrophorese wurde bei 10 V/cm durchgeführt.

3.2.9 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden diese nach der Auftrennung im Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Gelaufreinigungskit (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Elution erfolgte in ddH₂O, die Konzentration des gewonnenen DNA-Fragments wurde mittels Elektrophorese überprüft.

3.2.10 Restriktionsverdau von DNA

Für den Verdau wurden pro µg DNA 1-10 U Restriktionsenzym in möglichst kleinem Volumen in Restriktionspuffer und ddH₂O bei der angegebenen Temperatur (meist 37°C) für mindestens 1 h, bei quantitativem Verdau in 50 µl für 4 h eingesetzt. Dabei durfte die Enzymmenge nicht mehr als 10% des Gesamtvolumens betragen. Bei einem Doppelverdau wurden je nach Herstellerangaben entweder beide Enzyme gleichzeitig eingesetzt oder eine DNA-Präzipitation mit Ethanol nach dem ersten Verdau durchgeführt. Für den ersten Verdau wurde in diesem Fall ein Mindestvolumen von 200 µl eingesetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Elektrophorese überprüft.

3.2.11 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 des Volumens an Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5-fachem Volumen 96%igem kaltem Ethanol versetzt und für 30 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13000 x g und die präzipitierte DNA wurde zweimal mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

3.2.12 Ligation

Es wurden ca. 10 – 100 ng linearisierter Vektor mit 10 x Ligationspuffer, geschnittenem Insert und 0,5 µl (5 U/µl) T4-DNA-Ligase mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 14°C oder für 3 – 4 h bei RT inkubiert. Die Insert/Vektor-Verhältnisse 1:1, 3:1 und 5:1 wurden verwendet.

Für das TA Cloning wurde der PCR-Ansatz direkt mit dem linearisierten Vektor pCR2.1 entsprechend den Angaben des Herstellers inkubiert.

3.2.13 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

3.2.13.1 Bakterien für Elektroporation

Zu 250 ml LB-Medium mit Kanamycin wurden 3 ml einer Übernacht-Kultur der *E. coli*-Stämme M15 oder SG13009 pipettiert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gestellt und danach bei 3800 rpm (Tischzentrifuge) 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml kaltem, sterilem ddH₂O resuspendiert und 20 min bei 3800 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 125 ml kaltem ddH₂O aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 5 ml kalter 10%iger Glycerin-Lösung aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 3800 rpm 20 min abzentrifugiert und in 1,5 ml 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert (zu 55 µl) und bei -80°C gelagert oder direkt verwendet.

3.2.13.2 Bakterien für Transformation durch Hitzeschock

Es wurde 1 ml einer Übernacht-Kultur des *E. coli*-Stammes DH5α oder BL21 in 100 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert, die Zellen 30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 3800 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml kaltem TFB1 resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert und das Pellet in 4 ml kaltem TFB2 gelöst. Es wurden 100 oder 400 µl Aliquots bei -80°C gelagert oder die Bakterien direkt zur Transformation eingesetzt.

3.2.14 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Pro Ansatz wurden 50 µl elektrokompente Bakterien auf Eis angetaut und mit der DNA (2 – 5 µl aufgereinigter Ligations- oder Mutations-PCR-Ansatz oder 5 – 10 ng Plasmid-DNA) vermischt. Nach Inkubation für 2 min auf Eis wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation mit 335 Ω, 15 µF und 2,5 kV/cm durchgeführt. Die Bakterien wurden sofort in 1 ml SOC-Medium überführt, 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf selektiven LB-Platten ausgestrichen.

3.2.15 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Pro Transformationsansatz wurden je 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 - 5 µl Ligationsansatz vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der

Hitzeschock für 1 min bei 42°C. Die Zellen wurden 2 min auf Eis abgekühlt, mit 1 ml SOC versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf selektiven LB-Platten ausgestrichen.

3.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.3.1 Präparation rekombinanter Proteine

Zur Generierung rekombinanter Proteine wurde das pQE3x-System von Qiagen verwendet, welches Proteine mit R-G-S-H₆-Tag am N-Terminus generiert. Es wurden sowohl native als auch Aufreinigungen unter denaturierenden Bedingungen mit Ni-NTA-Agarose gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend entweder mit Puffer A10 umgepuffert oder schrittweise gegen PBS dialysiert und auf das gewünschte Volumen eingengt. Mittels SDS-PAGE (3.3.3) wurde die Reinheit und Konzentration überprüft.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinbestimmung erfolgte durch UV-Absorptionsmessung mit folgender Formel nach (Warburg, 1941):

$$\text{mg Protein pro ml} = 1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260} ,$$

wobei A_{280} und A_{260} die Absorptionswerte bei 280 bzw. 260 nm sind und mit einer 1 cm-UV-Küvette gemessen wurde.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(variiert nach (Laemmli, 1970))

Bei der SDS-PAGE wurden Proteine mit dem Biorad-System gemäß ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Gelen (Endkonz. 7,5% bis 18% Polyacrylamid) aufgetrennt. Für zwei 0,75 mm Gele wurden folgende Lösungen angesetzt:

Trenngel (x%, 10 ml): 2,5 ml Trenngelpuffer, x ml 30% Polyacrylamid, 100 µl SDS (10%), 50 µl APS (10%), 5 µl TEMED, ad. H₂O

Sammelgel (5%, 3 ml): 750 µl Sammelgelpuffer, 500 µl 30% Polyacrylamid, 30 µl SDS (10%), 15 µl APS (10%), 3 µl TEMED, ad. H₂O

Proteinlösungen wurden zunächst mit SDS-Ladepuffer (Endkonz. 1 x) versetzt, zur Denaturierung 5 min aufgekocht und anschließend auf das Gel geladen. Als Standard wurde ein Protein-Marker verwendet. Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von 160 V für etwa 1 h.

3.3.4 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinkomplexen wurden 4 - 15%ige Gradientengele im PhastGel System nach folgendem Programm getrennt, wobei die Proben im zweiten Schritt auf das Gel aufgebracht werden:

10 Vh mit	400 V,	10 mA,	2,5 W, 10°C;
2 Vh mit	400 V,	1 mA,	2,5 W, 10°C;
150 Vh mit	400 V,	10 mA,	2,5 W, 10°C;
250 Vh mit	10 V,	0,1 mA,	1 W, 10°C.

Anschließend erfolgte die Coomassie-Färbung (3.3.5) oder der Westernblot (3.3.6).

3.3.5 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 20 - 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und die überschüssige Farbe aus dem Gel durch mehrmaliges Waschen mit Entfärberlösung entfernt. Die Gele wurden auf Filterpapier bei 80°C für 90 min getrocknet.

3.3.6 Westernblot und Immundetektion

Die aufgetrennten Proteine wurden im elektrischen Feld aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Gel und Membran wurden zwischen je zwei Lagen Filterpapier in das Westernblotsystem eingespannt und der Westernblot mit Blotpuffer bei konstanter Stromstärke von 250 – 300 mA für 1,5 - 2 h bei RT oder 100 mA über Nacht bei 4°C durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt (3.3.7) und anschließend für 1 h bei RT mit Blockmilch inkubiert. Die Inkubation mit Primärantikörper (in 5% Milch-PBST bzw. PBST) erfolgte über Nacht im Kühlraum oder für 1 – 2 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran mit Sekundärantikörper (Peroxidase-gekoppelt) für 1 h bei RT inkubiert. Überschüssige Antikörperlösung wurde erneut durch Waschen mit PBST (3 × 10 min) entfernt. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Technik nach Herstellerangaben mit X-Omat UV Filmen.

3.3.7 Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen

Proteine (>100 ng) auf Nitrocellulosemembranen wurden mit Ponceau-Färbelösung für 3 min rot angefärbt und anschließend der Hintergrund durch mehrmaliges Spülen mit H₂O entfärbt.

3.3.8 Far-Westernblot (Filterbindungs-Assay)

Die rekombinanten Proteine (je 1 µg) oder der gereinigte CSN-Komplex wurden nach der SDS-PAGE auf Nitrocellulose überführt. Die Membran wurde mit Ponceau S gefärbt und anschließend mit Blockmilch für 1 h bei RT inkubiert. Die immobilisierten Proteine wurden mit möglichen Interaktionspartnern (1 – 2 µg/ml in PBS) für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper gegen den Interaktionspartner für 1 – 2 h und anschließend mit sekundärem Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Die Proteine wurden mittels ECL-Technik (s.o.) detektiert. Zur Erkennung unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden die interagierenden Proteine anschließend durch eine Inkubation der Membran mit Stripping-Puffer bei 55°C für 30 min entfernt. Danach wurde die Membran erneut blockiert und mit den gleichen primären und sekundären Antikörpern getestet.

3.3.9 Präparation des COP9 Signalosoms

Die Aufreinigung des Komplexes stellt eine Modifizierung nach Seeger et al. dar (Seeger et al., 1998).

3.3.9.1 Lyse der Erythrozyten

Die gesamte Aufreinigung mit allen Puffern und Instrumenten wurde bei 4°C durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten zwei bis drei ausdatierte Erythrozytenkonzentrate, die zunächst dreimal mit demselben Volumen PBS gewaschen wurden. Es erfolgte jeweils eine Zentrifugation bei 4000 x g für 10 min und 4°C (Rotor JA10), wobei die weiße Fettschicht in der Interphase zwischen PBS und Blutzellen möglichst vollständig entfernt wurde. Für die Lyse durch osmotischen Schock wurden zwei unterschiedliche Puffer je nach gewünschtem Endprodukt gewählt. Zur alleinigen Aufreinigung des CSN wurde das doppelte Volumen Lysispuffer zugegeben, bei gleichzeitiger Aufreinigung von Komponenten des 26S Proteasoms wurde eine 1:3-Verdünnung mit ddH₂O vorgenommen und die Lösung mindestens 1 h bei 4°C gerührt. Nach anschließender Zentrifugation bei 16000 x g für 1 h bei

4°C (Rotor JA14) wurde der Überstand vorsichtig in einen neuen Zentrifugenbecher überführt und erneut für 30 min zentrifugiert.

3.3.9.2 DEAE-Ionenaustauschchromatographie

Während des Waschens der Erythrozyten wurden 65 g DEAE Cellulose dreimal in Puffer A10 äquilibriert. Das gewonnene Lysat (ca. 1,5 l) wurde mit der DEAE Cellulose vereint und über Nacht bei 200 rpm und 4°C gedreht. Am zweiten Tag wurde der Überstand nach Sedimentation der DEAE-Suspension entfernt und diese zweimal mit Puffer A10 gewaschen. Als erster Aufreinigungsschritt erfolgte die DEAE-Ionenaustauschchromatographie durch dichtes Packen der ca. 200 ml DEAE-Suspension in eine Säule (SR25/45, Amersham Biosciences) und anschließendes Waschen mit drei Volumina Puffer A10 bei einer Flussrate von 2 ml/min. Die gebundenen Proteine wurden über Nacht mit einem linearen Gradienten von 50 - 400 mM KCl (je 240 ml Puffer A10 und B400) bei einer Flussrate von 1 ml/min in 6 – 7 ml-Fractionen eluiert. Die ca. 65 Fractionen wurden mittels Westernblot und Immundetektion sowie Peptidaseaktivitätstest (3.3.11) auf Untereinheiten des CSN, 26S, 20S und Lid untersucht. Das CSN eluiert zwischen 180 und 230 mM KCl, was zehn Fractionen mit einem Volumen von 60 – 70 ml entspricht, 20S und 26S eluieren bei etwas niedrigeren Salzkonzentrationen.

3.3.9.3 Ammoniumsulfatfällung

Zur Präzipitation des CSN wurde zu den vereinten Fractionen langsam unter Rühren Ammoniumsulfat ((NH₄)₂SO₄) bis zu einer Endkonzentration von 45% gegeben. Es folgte die Zentrifugation bei 13000 x g für 15 min bei 4°C (JA20). Das Proteinpellet wurde in 1 – 3 ml Puffer A5 resuspendiert, in eine Dialysemembran überführt und gegen 2 l Puffer A5 über Nacht dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration jedes Komplexes photometrisch bestimmt.

3.3.9.4 Dichtegradientenzentrifugation I

Die Proteine wurden anschließend durch eine Dichtegradientenzentrifugation (10 - 40% Glycerin) aufgetrennt. Lineare Gradienten mit Puffer A10 und A40 (à 17,5 ml) wurden gegossen und mind. 1 h vorgekühlt. Maximal 1,5 ml mit 40 - 50 mg Protein wurde auf jeden Gradienten aufgetragen und bei 27000 rpm (96500 x g) für 22 h bei 4°C zentrifugiert (Rotor: SW28). Die Gradienten wurden von unten nach oben in 20 Fractionen zu je 1,8 ml mit einer

Geschwindigkeit von 1 ml/min geerntet. Aliquots von je 10 µl wurden im Westernblot überprüft. Das CSN sedimentiert in die Fraktionen 10 - 14.

3.3.9.5 FPLC: ResourceQ-Säule

Die CSN-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und über den Superloop mit 0,8 ml/min auf die ResourceQ Anionenaustauschersäule geladen. Mit den Puffern A10 und B1000 wurden die Proteine in einem linearen Gradient von 145 bis 430 mM KCl (entspricht 10 – 40% Puffer B1000) mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min in 1 ml-Fraktionen eluiert. Das CSN wurde durch Westernblot detektiert und die Reinheit in der Coomassie-Färbung überprüft. Der Komplex eluiert in zwei Hauptpeaks zwischen 280 und 350 mM KCl.

3.3.9.6 FPLC: MonoQ-Säule

Vor der Verwendung einer weiteren Anionenaustauschersäule (MonoQ) wurden die relevanten Fraktionen in einer Filterzentrifugeneinheit auf Puffer A10 umgepuffert und anschließend über den Superloop mit 1 ml/min auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte nach demselben Elutionsschema wie bei der ResourceQ-Säule, wobei das feinere Säulenmaterial eine weitere Abtrennung störender Verunreinigungen liefert. Das CSN eluiert bei einer Salzkonzentration von 300 - 350 mM KCl wie im Westernblot und durch Coomassie-Färbung getestet wurde. Meist wurden 2 - 3 Fraktionen reines CSN nach diesem Schritt erhalten. Der Komplex ist in der hohen Salzkonzentration für zwei Monate auf Eis stabil.

3.3.9.7 Dichtegradientenzentrifugation II

Wurde für weitere Experimente eine niedrigere Salzkonzentration, höhere CSN-Konzentration oder eine längere Lagerung benötigt, wurden die CSN-enthaltenden Fraktionen auf ein Volumen von 0,5 - 1 ml in der Filterzentrifugeneinheit konzentriert und auf einen 10 – 40% Glyceringradienten geladen. Für die linearen Gradienten wurden je 6 ml Puffer A10 und Puffer A40 verwendet und diese mind. 1 h bei 4°C gekühlt. Die Zentrifugation erfolgte für 22 h bei 27000 rpm (90000 x g) und 4°C (Rotor: SW40). Mittels Coomassie-Färbung wurde die Reinheit des CSN-Komplexes überprüft. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

3.3.10 Präparation von 26S und 20S Proteasom

Zur Gewinnung von 20S oder 26S Proteasom wurde die Präparation des CSN in folgenden Punkten variiert: Für die Zellyse wurde ddH₂O verwendet, die DEAE-Säule jedoch wie beschrieben eluiert. Die aufgrund der Westernblots und des Peptidaseaktivitätstests identifizierten 20S und 26S Proteasom-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und das 26S Proteasom bis 45% mit (NH₄)₂SO₄ gefällt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand zur Gewinnung des 20S weiter bis zu einer Endkonzentration von 75% (NH₄)₂SO₄ gefällt. Beide Pellets wurden in Puffer A5 resuspendiert und dialysiert. Anschließend folgte die erste Dichtegradientenzentrifugation wie beschrieben. Hier findet sich das 26S Proteasom in den Fraktionen 8 - 10 und 20S in den Fraktionen 9 - 11, was durch den Peptidaseaktivitätstest sowie Westernblotting überprüft wurde. Für die weitere Aufreinigung wurde gleich die MonoQ-Säule angeschlossen und in einem linearen Gradienten von 22 - 40% Puffer B1000 in 42 1 ml-Fraktionen eluiert. Durch Peptidaseaktivitätstest und Coomassiefärbung wurden die aktiven Fraktionen identifiziert, eingengt und sofort die Dichtegradientenzentrifugation II (10 - 40% Glycerin) wie beschrieben durchgeführt. Die Aktivität und Reinheit der Fraktionen wurden erneut überprüft und die Hälfte der relevanten Fraktionen auf Eis und die andere in Aliquots bei -80°C gelagert.

3.3.11 Peptidaseaktivitätstest

Zur Aktivitätsbestimmung von 20S und 26S Proteasom während der Präparation wurde jeweils 1 µl der Fraktionen in An- oder Abwesenheit von 2 mM ATP und 5 mM MgCl₂ mit 0,1 mM Suc-LLVY-AMC in 1 x AB-Puffer und einem Endvolumen von 100 µl in eine schwarze Mikrotiterplatte pipettiert und bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Emission bei 460 nm (Extinktion bei 390 nm) am Fluoreszenz-Mikrotiterplattenscanner (FluoStar Reader) aufgezeichnet und die Enzymaktivität pro Minute berechnet.

Zur Bestimmung des Einflusses von CSN auf die Aktivität des 26S Proteasoms wurde der Test wie folgt variiert. Es wurden zunächst Dreifachansätze variierender molarer Verhältnisse von CSN und 26S Proteasom ohne oder mit ATP und MgCl₂ in 1 x AB-Puffer bei 37°C für 15 min vorinkubiert und die Reaktion nach Überführung der Einzelansätze in eine Mikrotiterplatte durch Zugabe des fluorogenen Substrates gestartet. Die Messung erfolgte alle 5 min für 2 h bei konstanten 37°C (Fluorocan II). Es wurde die Enzymaktivität pro Minute

im Zeitintervall zwischen 45 - 90 min errechnet.

3.3.12 Bindungsstudien mittels Dichtegradientenzentrifugation

Jeweils 15 µg der rekombinanten USP15-Fragmente wurden mit 7,5 µg aufgereinigtem CSN in 1 x AB-Puffer gemischt, 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf einen Glyceringradienten (5 – 30%) aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte für 22 h bei 4°C mit 27000 rpm gemäß Dichtegradientenzentrifugation II. Der Gradient wurde in 20 Fraktionen á 600 µl geerntet und jeweils 300 µl pro Fraktion sofort mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Das Pellet wurde in 30 µl 1x SDS-Ladepuffer resuspendiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine nach Westernblot mit Antikörpern gegen RGS-His₆, USP15 und CSN3 detektiert.

Für den Nachweis der Interaktion zwischen CSN und 26S Proteasom wurden ca. 5x10⁷ Flag-CSN2-B8 Mausfibroblasten mit 500 µl Mono-Lysispuffer aufgeschlossen und ca. 450 µl Zellysat sofort auf einen 10 - 40%igen Glyceringradienten aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte für 18 h bei 4°C und 36000 rpm (164000 x g; Rotor: SW40).

3.3.13 TCA-Fällung

Die Proben wurden mit 5 µg BSA als Trägerprotein und 10% (Endkonzentration) Trichloressigsäure (TCA) 30 min auf Eis inkubiert und danach für 20 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die gefällten Proteine wurden mit 0,5 ml 5% TCA einmal und danach zweimal mit je 1 ml Aceton gewaschen. Das Trocknen der Pellets erfolgte an der Luft. Die Proteine wurden in 1 x SDS-Ladepuffer aufgenommen.

3.3.14 Kinaseassay (*in vitro*)

Für die *in vitro*-Phosphorylierung wurden die rekombinanten USP15-Fragmente (je 1 µg) entweder mit gereinigtem CSN-Komplex (1 µg) oder mit den rekombinanten Kinasen CK2 (α₂β₂) (25 U) und PKD (7 ng/µl) in 1 x AB-Puffer und 0,2 MBq [γ-³²P]-ATP für 1 h bei 37°C in einem Endvolumen von 20 µl inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6,7 µl 4x SDS-Ladepuffer gestoppt und die Proben 3 min gekocht. Nach Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, entfärbt und getrocknet. Die Phosphorylierungen wurden mittels Autoradiographie der Gele unter Verwendung von Biomax MR-Filmen detektiert.

3.3.15 Immunpräzipitation (IP) nach Glyceringradient

Durch TCA-Fällung und Westernblot wurden die relevanten Fraktionen des Glyceringradienten identifiziert. Zweimal je 150 µl von drei Fraktionen wurden vereinigt und für jede IP 220 µl eingesetzt. Die Pools werden im Doppelansatz entweder mit 15 µl Anti-CSN7 oder 5 µl Anti-Flag-Antikörper sowie PBS bis zum Endvolumen von 500 µl versetzt und für 3 h bei 4°C auf einer Drehscheibe inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation nach Zugabe von je 50 µl Protein A-Sepharose bei 4°C über Nacht fortgesetzt. Die gebundenen Proteine wurden dreimal mit Puffer A10 gewaschen und in 1 x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Nach Auftrennung in der SDS-PAGE und Westernblot erfolgte der Nachweis mit Antikörpern gegen CSN5, Rpn2 und Rpt2.

3.3.16 Ubiquitinierungsassay

Es wurden zunächst HeLa-Zelllysate (je $2,5 \times 10^5$ Zellen/Ansatz) mit Mono-Lysispuffer als Quelle für das Ubiquitinsystem frisch hergestellt. Pro Ansatz wurden 0,2 – 0,5 µg rekombinantes USP15, Mdm2 oder beide in Mono-Lysispuffer HeLa-Zelllysate bei 37°C inkubiert. Es wurden jeweils Ansätze mit oder ohne Curcumin in einer Endkonzentration von 50 µM, MG132 in einer Konzentration von 20 µM oder beiden eingesetzt. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 6 h wurden 10 µl-Aliquots entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und sofort aufgeköcht. Der Nachweis erfolgte nach SDS-PAGE und Westernblot mit Anti-USP15- oder Anti-Mdm2-Antikörpern.

3.3.17 Bindungsstudien mittels magnetischer Ni-NTA Agarosepartikel

Zum Nachweis der Bindung von Ub₄ an USP15 wurden 20 µl Ni-NTA Magnetagarosebeads mit 2 µg His-USP15 mit oder ohne 5 mM NEM oder 2 µg His-USP15C783A für 30 min bei RT in Bindungspuffer inkubiert. Die Partikel wurden magnetisiert, mit demselben Puffer gewaschen, 10 µg Ub₄ in 500 µl Bindungspuffer zugegeben und die Ansätze für 15 min bei RT rotiert. Nach Magnetisierung der Partikel wurden diese zweimal gewaschen und mit 1 x SDS-Ladepuffer versetzt. Die gebundenen Proteine wurden in der SDS-PAGE getrennt und nach Westernblotting mit Antikörpern gegen USP15 und Ub nachgewiesen.

3.3.18 Nachweis von USP15-Konjugaten *in vitro*

Für den anschließenden Nachweis von Konjugaten wurde der Ubiquitinierungsassay wie folgt variiert. Es wurden 1,5 µg His-USP15 mit oder ohne 50 µM Curcumin und 18 µg Ub in 250 µl Mono-Lysispuffer ohne DTT mit 50 µM MG132 und Lysat von 1×10^6 HeLa Zellen für 0 oder 4 h bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde ein ATP-regenerierendes System mit 10 mM Kreatinphosphat und 3 U Kreatinkinase hinzugefügt. Aliquots von 10 µl wurden für den Nachweis im Westernblot entnommen. Die verbleibende Probe wurde mit 250 µl Bindungspuffer 40 und 15 µl Ni-NTA Magnetagarosebeads versetzt. Nach Rotation für 30 min bei RT wurden die Partikel zweimal mit Bindungspuffer 20 gewaschen und die gebundenen Proteine in der SDS-PAGE getrennt. Der Nachweis erfolgte nach Westernblotting mit Anti-USP15- und Anti-Ub-Antikörpern.

3.3.19 Deubiquitinierungsassay

Rekombinantes His-USP15 (1 µg), His-USP15C783A (1 µg), aufgereinigtes CSN (3 µg) oder 26S Proteasom (30 nM) wurden 15 min in 1 x AB-Puffer bei 37°C mit oder ohne Inhibitoren vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von je 0,5 – 1 µM Substrat (Ub-GFP, Ub₄, Ub₅-(Muc1₉₅₀₋₉₅₈)₄ oder Ub₅-E7) gestartet und bei 37°C inkubiert. Die Endkonzentration der Inhibitoren betrug bei Curcumin 50 µM, NEM 5 mM und OPT 5 mM. Nach 0, 1, 2 und 4 h wurden Aliquots entnommen und die Produkte nach SDS-PAGE und Westernblotting mit Antikörpern nachgewiesen.

Als Kontrolle wurde 1 µg CSN in 1 x AB-Puffer mit denselben Inhibitorkonzentrationen für 2 h bei 37°C inkubiert, je 4 µl im nativen Gel aufgetrennt und das CSN nach Westernblotting mit Antikörpern nachgewiesen.

3.3.20 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Elektronenmikroskopie wurde von Dr. Barbara Kapelari am MPI für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Die Präparation von goldmarkiertem Ub₄ wurde nach Slot und Geuze (Slot and Geuze, 1985) mit kleinen Modifikationen (Bech-Otschir et al., 2001; Holzl et al., 2000) durchgeführt. Für die Bindungsstudien wurde ein 2 µl-Tropfen des aufgereinigten CSN-Komplexes oder 4 µl Lid-Subkomplex (0,15 µg/µl) mit 0,6 µl des goldmarkierten Ub₄ und 4 µl Reaktionspuffer für 30 s bei RT inkubiert und anschließend für die elektronenmikroskopische Analyse aufbereitet. Es wurde ein CM12-Transmissionen-

Elektronenmikroskop benutzt (Philips), mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV. Die Bilder wurden digital aufgezeichnet (Photometrix slow scan CCD, 1024 × 1024 pixel). Die Gesamtvergrößerung betrug 85500 x mit einer Defokussierung von 2 µm.

3.4 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.4.1 Kultivierung und Passage von adhärennten Zellen

Die humane Zelllinie HeLa wurden in RPMI 1640-Medium, die murine Zelllinie B8 in Basal ISCOVE Medium mit jeweils 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 U Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Eine 1/100-Passage der Zellen erfolgte etwa alle 7 Tage.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung

Von den zu untersuchenden adhärennten Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen durch Zugabe von Trypsin-EDTA (Invitrogen, Gibco) abgelöst. Die Zellen wurden in ein Falcon überführt, die Zellkulturschale mit demselben Volumen PBS nachgespült und dieses auch ins Falcon gegeben. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C wurde der Überstand entfernt, die Zellen in einem geeigneten Volumen Medium resuspendiert und ein Aliquot 1:2 mit 0,4% Trypanblau in PBS verdünnt. Trypanblau diffundiert durch defekte Zellmembranen, so dass tote Zellen eindeutig von vitalen unterschieden werden können. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer. Die Konzentration ergibt sich wie folgt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert der Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4/\text{ml}$$

Der Faktor von 10⁴ ergibt sich dabei aus dem Volumen der Zählkammer (0,1 µl).

3.4.3 Transiente Transfektion

Für die möglichst gleichmäßige transiente Transfektion von Zelllinien wurde das kommerziell erhältliche Lipofektamin 2000 verwendet. Dabei kommt es zur Komplexbildung von zuvor mittels eines Enhancers kondensierten DNA mit einem nichtliposomalen Lipid. Der Vorteil der Methode beruht auf der meist hohen Effizienz.

Bei der Transfektion von HeLa wurden je 0,5 - 1 x 10⁶ Zellen in RPMI 1640-Medium 16 h vor der Transfektion pro Vertiefung einer 6-well Platte vorgelegt.

Für einen Transfektionsansatz wurden insgesamt 2,5 - 10 µg Plasmid-DNA (2,5 µg pSG5-Rbx1-zz + 7,5 µg pCMV-Tag3B-USP15) und 5 - 20 µl Lipofektamin mit je 1 ml OPTI-MEM aufgefüllt, vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zusammengeführt, gemischt und 30 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium von den zu transfizierenden Zellen abpipettiert, die Zellen 2 x mit je 2 ml PBS gewaschen und der Transfektionsansatz langsam auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden für 4 – 5 h bei 37°C inkubiert und die Transfektion durch Zugabe von 1 ml RPMI 1640-Medium abgestoppt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurde das Medium vollständig entfernt und 2 ml RPMI 1640-Medium pro well auf die Zellen gegeben. Die Lyse der Zellen erfolgte 24 oder 48 h nach der Transfektion.

3.4.4 Cycloheximid-Behandlung

Zur Untersuchung der Stabilität von Proteinen wurden HeLa Zellen zwei Tage nach der Transfektion für 0, 3 oder 6 h mit Cycloheximid gelöst in RPMI 1640-Medium in einer Endkonzentration von 10 µg/ml behandelt, um so die weitere Translation zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Triple-Lysispuffer lysiert.

3.4.5 Zelllyse

Vor der Zelllyse wurde das Medium von den adhärent wachsenden Zellen entfernt, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und die Zellkulturschale auf Eis gestellt. Der eiskalte (Mono- oder Triple-) Lysispuffer wurde direkt auf die Zellen gegeben und die Zellen anschließend in der Kulturschale lysiert. Es erfolgte ein fünfmaliges Aufsaugen durch eine 21-gauge Nadel und eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 13000 x g. Der Überstand wurde sofort mit 4 x Ladepuffer versetzt und aufgekocht. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Westernblotting mit Antikörpern.

Zur Verwendung der Lysats als Quelle für das UPS wurden die Zellen mit Mono-Lysispuffer aufgeschlossen, zentrifugiert und vom Überstand pro Ansatz das Lysat von $2,5 \times 10^5$ Zellen eingesetzt.

4 ERGEBNISSE

4.1 INTERAKTION ZWISCHEN DEM CSN UND DEM 26S PROTEASOM

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine mögliche direkte Interaktion zwischen dem CSN und dem 26S Proteasom untersucht. Aus Sequenzanalysen ist bekannt, dass zwischen den Untereinheiten des CSN und des Lid-Subkomplexes des 26S Proteasoms eine starke Ähnlichkeit besteht (Seeger et al., 1998; Wei et al., 1998). Jede der acht CSN-Untereinheiten weist eine entsprechende paraloge Untereinheit im Lid-Komplex auf, deren Sequenzen zwischen 16% und 29% identisch sind (siehe Tabelle 1). Zudem konnte eine große strukturelle Ähnlichkeit in Elektronenmikrographen gezeigt werden (Kapelari et al., 2000). Diese Kenntnisse bildeten die Grundlage für die Vermutung, dass das CSN unter bestimmten Voraussetzungen als ein „alternativer Lid“ agieren könnte. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurde zunächst versucht, eine Interaktion beider Komplexe mittels Immunpräzipitation nachzuweisen.

4.1.1 Co-Immunpräzipitation von CSN und 26S Proteasom aus B8-Zellen

Für den Nachweis einer Interaktion zwischen CSN und 26S Proteasom wurden zunächst Zellysate aus humanen HeLa-Zellen eingesetzt. Trotz zahlreicher Variationen in der Inkubationszeit, den Waschbedingungen und den verwendeten Antikörpern gelang direkt aus den Lysaten keine Co-Immunpräzipitation beider Komplexe (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion schien somit nur in sehr geringem Umfang in der Zelle stattzufinden.

Aus diesem Grund sollte eine Anreicherung der interagierenden Komplexe durch Erhöhung der CSN-Konzentration und Auftrennung des Zellysates im Glyceringradienten vor der Immunpräzipitation durchgeführt werden. Dazu wurden im Folgenden die in unserer Arbeitsgruppe etablierten B8 Mausfibroblasten verwendet, die stabil mit humanem CSN2 transfiziert sind, welches am N-Terminus das Flag-Peptid exprimiert (Flag-CSN2). In humanen Zellen führte die permanente Expression von Flag-CSN2 zum Zelltod und konnte somit nicht realisiert werden (Experimente von Xiaohua Huang). Der Wechsel ins murine System war möglich, da humanes und murines CSN2 in der Aminosäuresequenz identisch sind.

Die ektopische Expression von Flag-CSN2 führt zu einem nahezu vollständigen Einbau der Untereinheit in den CSN-Komplex und gleichzeitig zu einer Steigerung der Gesamtmenge des CSN um etwa 100% (Huang et al., 2005).

Diese an CSN angereicherten Zellen wurden schonend lysiert, auf einen Glyceringradienten (10 – 40%) aufgetragen und eine Ultrazentrifugation zur Separation der Proteine entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit durchgeführt. Die Gradienten wurden in 20 Fraktionen geerntet und mittels Westernblot mit unterschiedlichen Antikörpern diejenigen identifiziert, in denen sich sowohl CSN als auch 26S Proteasom nachweisen ließen.

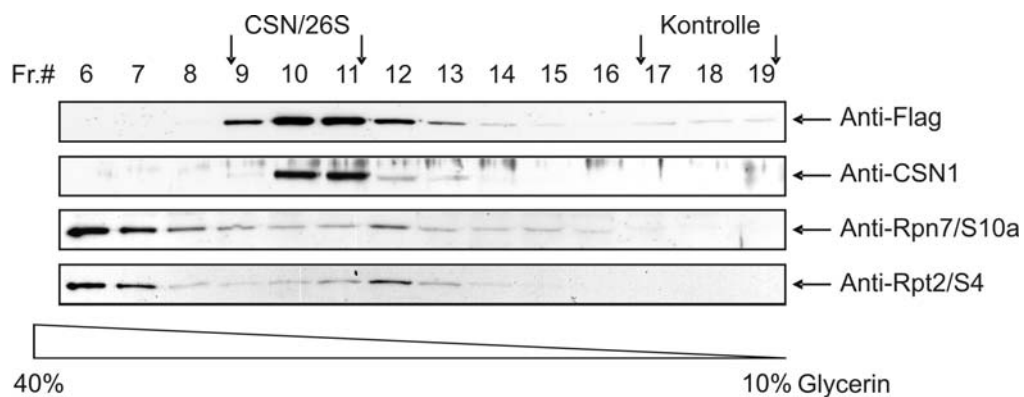


Abb. 9: Nachweis von CSN und 26S im Glyceringradient von Flag-CSN2-B8 Zelllysate

Nachweis des CSN nach Westernblotting der Fraktionen 6 – 19 des Glyceringradienten (10 – 40%) mit Anti-Flag- und Anti-CSN1-Antikörper. Das 26S Proteasom wurde mit Anti-Rpn7- und Anti-Rpt2-Antikörper detektiert. Die Pfeile markieren die für die Immunpräzipitation vereinten Fraktionen des CSN/26S (9 – 11) und der Kontrolle (17 – 19).

Das CSN ist in Abb. 9 mit dem Anti-CSN1-Antikörper hauptsächlich in den Fraktionen 10 und 11 zu detektieren. Der Antikörper gegen das Flag-Peptid wies CSN2 in denselben Fraktionen nach. Das bestätigte den Einbau der Flag-CSN2-Untereinheit in den CSN-Komplex. Das 26S Proteasom wurde vor allem in den Fraktionen 6 – 7 gefunden, doch ließen sich auch in den Fraktionen mit niedrigerer Glycerinkonzentration noch Base und Lid nachweisen.

Für die Immunpräzipitation wurden nun die Fraktionen 9-11 (nachfolgend: CSN) vereinigt, weil dort eine Co-Sedimentation beider Komplexe vorlag. Als Negativkontrolle wurden die Fraktionen 17-19 (nachfolgend: K) zusammengefügt. Die Präzipitation des CSN-Komplexes erfolgte sowohl mit dem Anti-CSN7- als auch mit dem Anti-Flag-Antikörper.

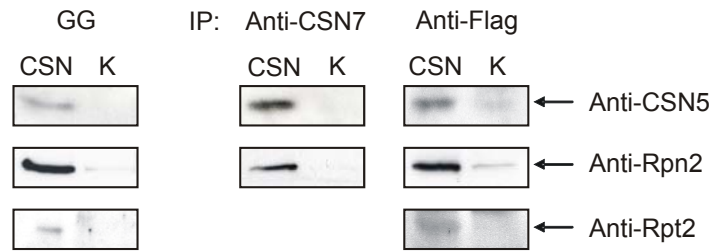


Abb. 10: Nachweis von Base-Untereinheiten nach Immunpräzipitation des CSN-Komplexes

Westernblots der Glyceringradientenfraktionen CSN (9-11) und K (17-19) direkt und nach Immunpräzipitation (IP) mit Anti-CSN7- und Anti-Flag-Antikörper. Der Nachweis erfolgte mit Anti-CSN5-, Anti-Rpn2-, und Anti-Rpt2-Antikörper.

Als Nachweis für die Präzipitation des CSN-Komplexes diente der Anti-CSN5-Antikörper. In Abb. 10 ist deutlich CSN5 in den CSN-, jedoch nicht in den K-Fractionen bei beiden Immunpräzipitationen zu erkennen. Gleichzeitig konnte jeweils die Base-Untereinheit Rpn2 und nach Präzipitation mit Anti-Flag-Antikörper sehr schwach Rpt2 nachgewiesen werden. Es war kein Nachweis von Lid-Untereinheiten unter diesen Versuchsbedingungen möglich. Die Co-Immunpräzipitation ließ keine Rückschlüsse darüber zu, ob eine Assoziation von CSN und 26S Proteasom auf einer direkten oder indirekten Wechselwirkung beruht.

4.1.2 Nachweis vom 26S Proteasom nach Flag-Pulldown des CSN

Zur weiteren Untersuchung einer Wechselwirkung zwischen beiden Komplexen wurde ein sogenannter „Flag-Pulldown“ durchgeführt. Dazu wurden Lysate der Flag-CSN2 exprimierenden B8 Fibroblasten sowie der unbehandelten B8 Zellen als Kontrolle hergestellt und diese mit Anti-Flag-Antikörpern behafteten Agarosepartikeln inkubiert. Die Elution erfolgte nach ausreichendem Waschen durch Competition mit dem Flag-Peptid (Huang et al., 2005). In Abb. 11A ist eine Coomassie-Färbung des Eluates von Flag-CSN2-B8 Zelllysat nach Aufkonzentrierung zu sehen. Die gekennzeichneten Banden der CSN-Untereinheiten sowie Flag-CSN2 wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert. Der Nachweis eines vollständigen CSN-Komplexes gelang in der nativen SDS-PAGE. Sowohl mit dem Anti-Flag- also auch mit dem Anti-CSN3-Antikörper konnte der Komplex nachgewiesen werden (Abb. 11B). Der Anti-Flag-Antikörper zeigte zudem schwache Banden im Bereich vom 20S Proteasom und 26S Proteasom, deren Positionen im nativen Gel mit entsprechenden Antikörpern identifiziert wurden (Daten nicht gezeigt).

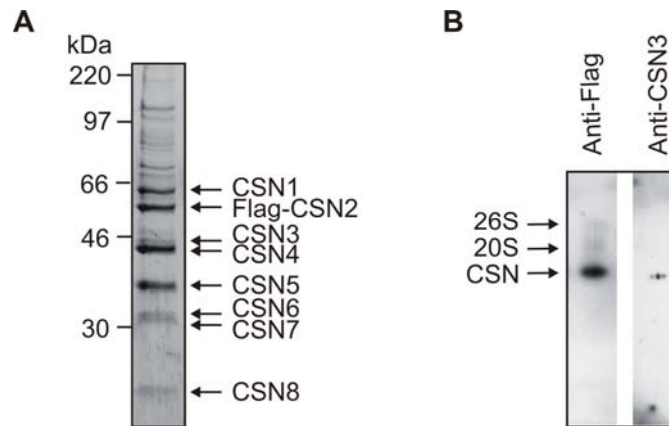


Abb. 11: Nachweis des vollständigen CSN-Komplexes nach Flag-Pulldown

A) Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE des Flag-Pulldown aus Flag-CSN2-B8 Zellen. Die einzelnen CSN-Untereinheiten wurden durch Massenspektrometrie bestätigt. B) Der Flag-CSN2-Pulldown wurde im nativen Gel aufgetrennt und nach Westernblotting mit Antikörpern gegen das Flag-Peptid oder CSN3 getestet. Die Positionen des 20S und des 26S Proteasoms wurden mit spezifischen Antikörpern ermittelt und sind hier ebenfalls gekennzeichnet (durchgeführt von X. Huang) (Huang et al., 2005).

Der schwache Nachweis der Flag-CSN2-Untereinheit im höher molekularen Bereich als dem CSN deutete auf die Anwesenheit weiterer Interaktionspartner im Flag-Pulldown hin. Im Folgenden wurden deshalb die Eluate der B8 Zellysate als Kontrolle sowie der Flag-CSN2-B8 Zellysate im Westernblot auf die Untereinheiten des 26S Proteasoms hin untersucht.

In Abb. 12 ist zu sehen, dass neben den CSN-Untereinheiten ebenfalls die Base-Untereinheiten Rpn2, Rpt2, Rpt3 und Rpt5 sowie das 20S Proteasom nachgewiesen werden konnten. Der Nachweis von Lid-Untereinheiten gelang nur in einigen Experimenten mit den Antikörpern gegen Rpn7 und Rpn8. Die Untereinheit Rpn11 konnte nicht nachgewiesen werden (Huang et al., 2005). Somit konnte mit dem Flag-Pulldown neben dem CSN-Komplex eindeutig 20S-Base identifiziert werden, eine Bindung des Lid-Subkomplexes an den Komplex schien unter diesen Versuchsbedingungen nur in geringerem Maße vorzuliegen. Die Ergebnisse der Westernblots stimmen mit den beobachteten höher molekularen Banden im nativen Gel überein.

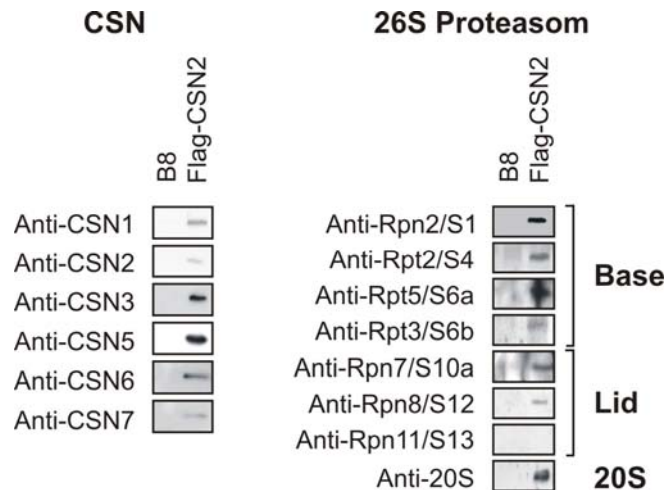


Abb. 12: Nachweis des 26S Proteasoms nach Flag-Pulldown des CSN

Flag-Pulldown mit Lysaten aus B8 Zellen als Kontrolle sowie Flag-CSN2-B8 Zellen. Nach Westernblotting wurden Antikörper gegen CSN-Untereinheiten (links) und Untereinheiten des Base, Lid und 20S Proteasoms (rechts) getestet (durchgeführt von X. Huang) (Huang et al., 2005).

4.1.3 Aufreinigung von CSN und 26S Proteasom

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen CSN und 26S Proteasom wurden die Komplexe *in vitro* gewonnen und anschließend untersucht.

Als Ausgangsmaterial wurden humane Erythrozytenkonzentrate eingesetzt. Der mehrstufige Prozess der Aufreinigung über Salz- und Dichtegradienten wurde ausgehend vom Protokoll aus Seeger et al. (Seeger et al., 1998) optimiert (Hetfeld et al., 2005). Es konnte sowohl CSN als auch 26S Proteasom gewonnen werden. In Abb. 13 sind Coomassie-Färbungen der aufgereinigten Komplexe zu sehen. Die Fraktionen wurden außerdem im nativen Gel überprüft (Daten nicht gezeigt).

Beim 26S Proteasom wurde jeweils die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität mittels des fluorogenen Substrates Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-AMC) ermittelt. Nachfolgend wurden nur Präparationen verwendet, bei denen die ATP-abhängige Aktivität mindestens viermal so hoch war wie die ohne ATP.

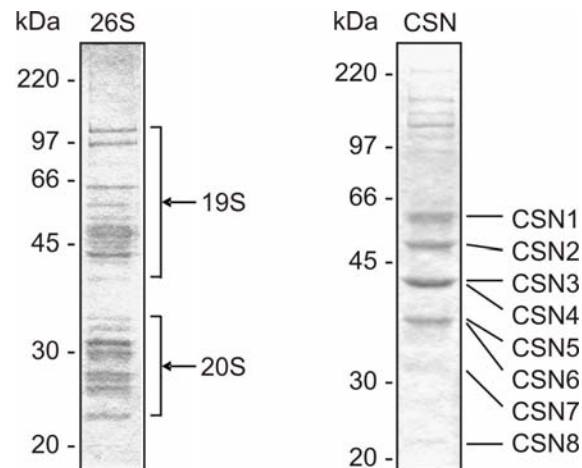


Abb. 13: 26S Proteasom und CSN aus Erythrozytenkonzentraten

Coomassie-Färbungen beider Komplexe. Die Subkomplexe 19S und 20S des 26S Proteasoms sowie die Untereinheiten des CSN-Komplexes sind angezeigt.

Als zusätzliches Qualitätskriterium diente beim CSN die Kinaseaktivität der aufgereinigten Komplexe. Die am CSN assoziierten Kinasen phosphorylieren sowohl Substrate, wie z.B. c-Jun, als auch die Untereinheiten CSN2 und CSN7 (Seeger et al., 1998; Uhle et al., 2003). Von jeder Präparation wurde ein Kinaseassay mit rekombinantem c-Jun und dem Komplex alleine durchgeführt, um die Anwesenheit der Kinasen zu überprüfen (Hetfeld et al., 2005).

4.1.4 Verdrängung des Lid vom 26S Proteasom durch Zugabe von CSN

Mit den aufgereinigten Komplexen wurden nun Immunpräzipitationen durchgeführt, um die Interaktion zwischen CSN und 26S Proteasom *in vitro* zu zeigen. Dazu wurden die Komplexe im molaren Verhältnis 1:1 in Anwesenheit von ATP für 30 min bei 37°C inkubiert und zunächst der CSN-Komplex mit dem Anti-CSN7-Antikörper präzipitiert. Als Kontrolle diente ein Präimmunserum, das nachweislich keine Präzipitation des Komplexes erzielt (Daten nicht gezeigt). Im anschließenden Westernblot konnte mittels Antikörper die Base-Untereinheit Rpn2 nachgewiesen werden (Abb. 14A). Bei der Präzipitation des 26S Proteasoms mit Hilfe des Anti- $\alpha 6$ -Antikörpers konnten im Gegenzug keine Untereinheiten des CSN, dafür aber das 20S Proteasom, eine Base- und schwach eine Lid-Untereinheit im Westernblot beim Verhältnis der Komplexe von 1:1 nachgewiesen werden.

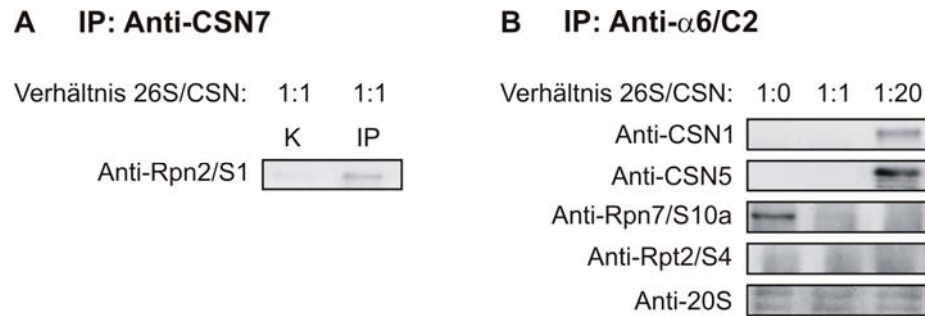


Abb. 14: Verdrängung des Lid vom 26S Proteasom durch das CSN *in vitro*

A) Co-Immunpräzipitation vom CSN und 26S Proteasom *in vitro* mit dem Anti-CSN7-Antikörper (IP) oder einem Präimmunsereum als Kontrolle (K). Die aufgereinigten Komplexe wurden in einem molaren Verhältnis von 1:1 in Gegenwart von ATP inkubiert. Das Präzipitat wurde nach Westernblotting mit dem Anti-Rpn2-Antikörper getestet. B) Co-Immunpräzipitation vom CSN und 26S Proteasom mit dem Anti-α6-Antikörper. Die Komplexe wurden in verschiedenen molaren Verhältnissen für 30 min in Gegenwart von ATP inkubiert. Die Präzipitate wurden nach Westernblotting mit Antikörpern gegen CSN1, CSN5, Rpn7, Rpt2 und 20S Proteasom analysiert (durchgeführt von X. Huang) (Huang et al., 2005).

Zur Verdeutlichung des Einflusses vom CSN auf das 26S Proteasom erfolgte im Anschluss eine Variation des Versuches. Es wurden die unterschiedlichen molaren Verhältnisse 26S Proteasom zu CSN von 1:0, 1:1 und 1:20 in Gegenwart von ATP inkubiert und anschließend eine Immunpräzipitation mit dem Anti-α6-Antikörper durchgeführt. In Abb. 14B ist zu erkennen, dass die zunehmende Anwesenheit des CSN keinen Einfluss auf die Präzipitation des 26S Proteasoms, gezeigt durch Antikörper gegen 20S und die Base-Untereinheit Rpt2, hat. Dagegen kommt es zu einer starken Abnahme der Lid-Konzentration bei gleichzeitiger Zunahme des CSN, hier durch Antikörper gegen CSN1 und CSN5 gezeigt. Die Ergebnisse deuten auf eine Verdrängung des Lid durch das CSN hin.

4.1.5 Einfluss des CSN auf die Peptidaseaktivität des 26S Proteasoms

Die Hinweise für eine mögliche Bindung des CSN anstelle des Lid-Subkomplexes an das 26S Proteasom wurden durch die vorangegangenen Experimente verstärkt. Eine solche Interaktion könnte Konsequenzen auf die Aktivität des 26S Proteasoms haben. Dies sollte zunächst mit dem fluorogenen Substrat Suc-LLVY-AMC getestet werden, welches jedoch nur die chymotrypsin-ähnliche Aktivität widerspiegelt.

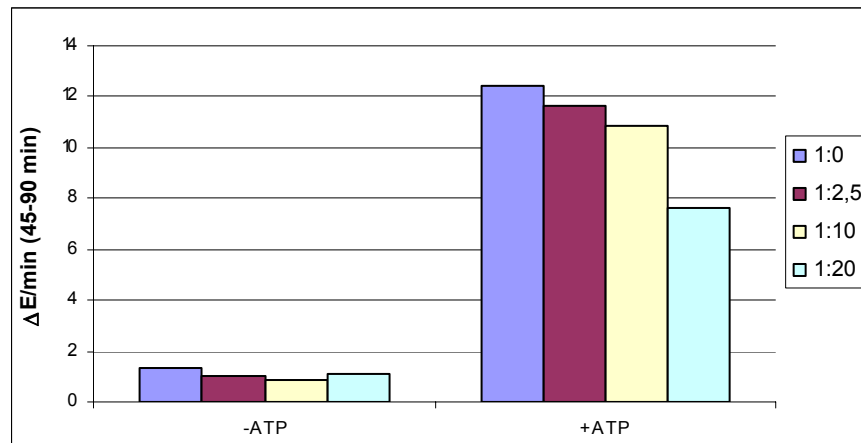


Abb. 15: Einfluss des CSN auf die chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 26S Proteasoms

Das 26S Proteasom wurde mit variierenden molaren Verhältnissen an CSN in An- oder Abwesenheit von ATP vorinkubiert und anschließend die Fluoreszenzemission des Substrates Suc-LLVY-AMC bei 460 nm gemessen. Dargestellt ist die Fluoreszenzzunahme pro min zwischen 45-90 min nach Versuchsbeginn. Legende: molares Verhältnis 26S Proteasom zu CSN (Huang et al., 2005)

Aufgereinigtes 26S Proteasom wurde mit CSN in unterschiedlichen molaren Verhältnissen (1:0, 1:2,5, 1:10 und 1:20) in An- oder Abwesenheit von ATP bei 37°C für 30 min vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Substrates gestartet. Die Fluoreszenzemission wurde bei 460 nm für 120 min in 5 min-Intervallen bei konstanter Temperatur gemessen.

Nach einer Anfangsphase von 30 min zeigte sich eine konstante Fluoreszenzzunahme bis ca. 100 min nach Versuchsbeginn. In Abb. 15 ist die relative Aktivität des 26S Proteasoms pro Minute im Zeitintervall zwischen 45 und 90 min nach Versuchsbeginn dargestellt. Die Zugabe von ATP bewirkte beim 26S Proteasom die erwartete Steigerung der Aktivität von 1,3 auf 12,4. Wurde CSN in ansteigenden Konzentrationen zugefügt, änderte sich die Aktivität des 26S Proteasoms im Ansatz ohne ATP auf 1,1. Dagegen wurde im Ansatz mit ATP der Abbau des fluorogenen Peptids durch das 26S Proteasom bei einem molaren Verhältnis 26S zu CSN von 1:20 um 40% auf 7,6 reduziert.

4.1.6 Einfluss des CSN auf den Abbau ubiquitinerter Substrate durch das 26S Proteasom

Die ersten Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung einer Interaktion zwischen CSN und 26S Proteasom gewonnen mit Hilfe des fluorogenen Peptids sollten im Weiteren näher untersucht werden. Dazu wurden polyubiquitinierte Proteine eingesetzt, welche die natürlichen Substrate des 26S Proteasoms in der Zelle darstellen.

Zunächst wurde als Substrat Ub₅-E7 verwendet (bereitgestellt von Annett Helfrich). E7 ist ein Oncoprotein des humanen Papillomavirus (HPV) Typ 16, welches durch das 26S Proteasom abgebaut wird (Reinstein et al., 2000). Nach Generierung über PCR wurde das E7 in einen Vektor C-terminal hinter Ub kloniert und das Produkt exprimiert und aufgereinigt. In einer enzymatischen Reaktion wurde über K48 verknüpftes Tetraubiquitin (Ub₄) an das K48 des linearen Ub-E7-Proteins geknüpft und so das Substrat Ub₅-E7 erhalten.

Im Folgenden wurden aufgereinigtes 26S Proteasom allein oder mit einem 20-fachen molaren Überschuss an CSN sowie CSN allein mit Ub₅-E7 inkubiert und nach 0, 2 und 4 h Aliquots entnommen.

Nach SDS-PAGE und Westernblot wurde die Immundetektion mit Anti-E7-Antikörper durchgeführt. Abb. 16 zeigt, dass das Substrat nicht vom 26S Proteasom abgebaut wurde. Überraschenderweise konnte dafür eine Abspaltung von Ub vom Ub₅-E7 in Anwesenheit des CSN beobachtet werden. Dieselben Abbauprodukte entstanden, als das CSN alleine eingesetzt wurde.

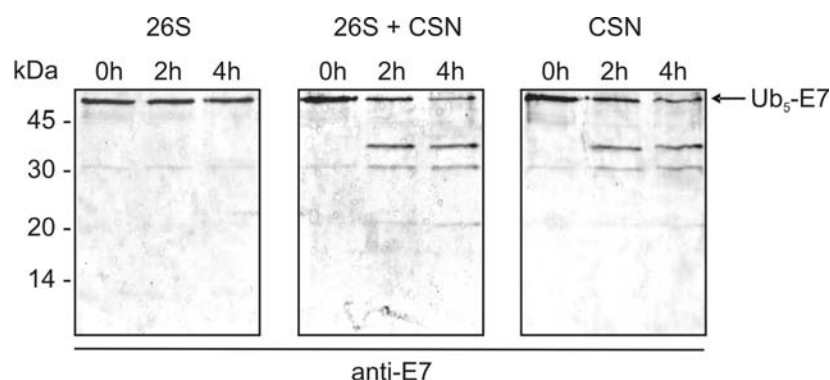


Abb. 16: Einfluss des CSN auf die Proteaseaktivität des 26S Proteasoms

26S Proteasom wurde mit oder ohne Überschuss an CSN im Verhältnis von 1:20 vorinkubiert und die Reaktion mit Ub₅-E7 gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und nach einem Westernblot mit Anti-E7-Antikörper getestet.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Epitop 950 – 958 (STAPPVHNV) des Glycoproteins Muc1 untersucht (bereitgestellt von Annett Helfrich). Die Peptidsequenz wurde viermal in Folge hinter Ub kloniert. Anschließend erfolgte wieder die enzymatische Verknüpfung von Ub₄ an das K48 des linearen Ub-(Muc1₉₅₀₋₉₅₈)₄, wodurch Ub₅-(Muc1₉₅₀₋₉₅₈)₄ gewonnen wurde (hiernach Ub₅-Muc1 genannt).

In diesen Versuchen wurden das 26S Proteasom alleine oder mit einem 10-fachen molaren Überschuss an CSN sowie als Kontrolle das CSN alleine mit dem Substrat bei 37°C inkubiert. Der Substratabbau wurde wie oben beschrieben untersucht.

Nach Westernblotting war mit dem Anti-Muc1-Antikörper deutlich der Abbau des Substrates durch das 26S Proteasom zu erkennen (Abb. 17 oben). Im Ansatz mit 26S Proteasom und CSN war bereits nach 1 h kein Ub₅-Muc1 mehr vorhanden und ausschließlich Mono-Ub-Muc1 zu sehen, welches sich nach 2 h weiter reduziert hat. Dasselbe Ergebnis konnte nach Inkubation des Substrates mit CSN alleine erzielt werden.

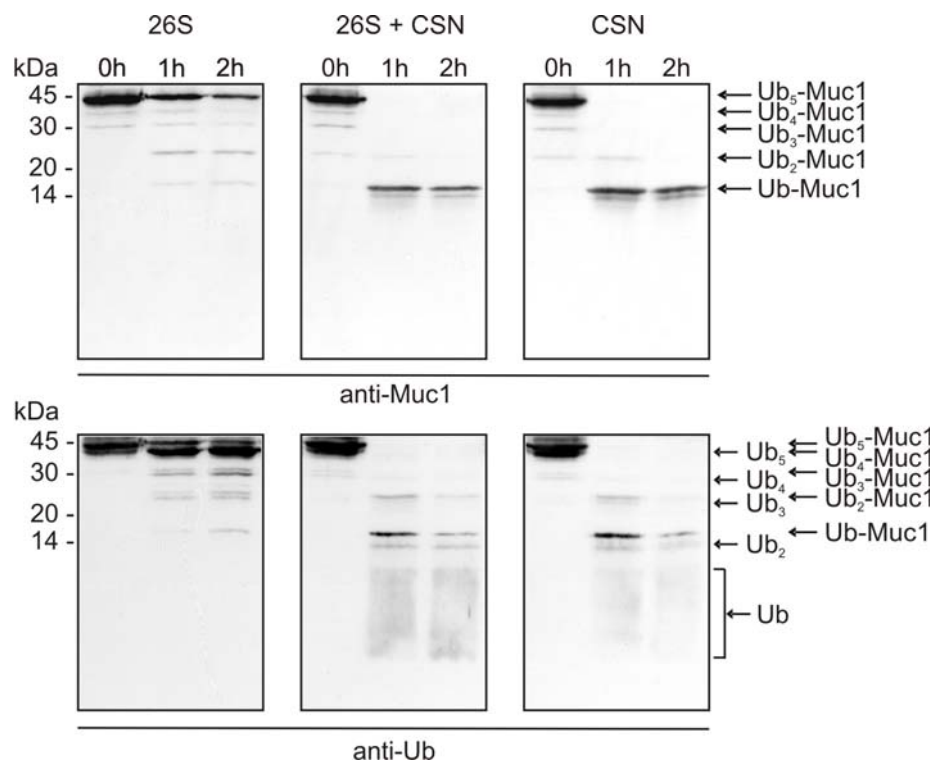


Abb. 17: Einfluss des CSN auf die Proteaseaktivität des 26S Proteasoms

Das 26S Proteasom wurde mit oder ohne CSN im Verhältnis von 1:10 vorinkubiert und die Reaktion mit Ub₅-Muc1 gestartet. Nach 0, 1 und 2 h wurden Aliquots entnommen und damit ein Westernblot durchgeführt. Es wurden Anti-Muc1- (oben) und Anti-Ub-Antikörper (unten) zum Nachweis verwendet. Die gebildeten Produkte sind angegeben.

Bei Verwendung des Anti-Ub-Antikörpers waren alle Abbauprodukte zu erkennen. Vom 26S Proteasom wurden Ub₅ vom Substrat abgespalten und die vier hintereinanderliegenden Muc1-Epitope gespalten. Die neun Aminosäure langen Muc1-Fragmente sind im Westernblot nicht zu detektieren. War im Ansatz CSN enthalten, zeigte sich ein völlig anderes Bild. Neben Ub-

Muc1 waren nach 1 h deutlich Mono-Ub sowie schwach alle weiteren möglichen Ub-Polymere zu sehen. Auch mit diesem Substrat war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Ansatz mit CSN alleine oder in Kombination mit dem 26S Proteasom zu erkennen.

Aus den Experimenten wird deutlich, dass das CSN über eine eigene Deubiquitinierungsaktivität verfügt, die den Abbau von polyubiquitinierten Substraten durch das 26S Proteasom durch Abspaltung des Erkennungssignals verhindert.

4.2 DEUBIQUITINIERUNGSAKTIVITÄT DES CSN

Zu Beginn meiner Promotion im Jahre 2002 war bekannt, dass das CSN eine intrinsische Deneddylierungsaktivität besitzt (Lyapina et al., 2001), die später dem JAMM-Motiv der Untereinheit CSN5 zugeordnet werden konnte (Cope et al., 2002). Damit gehört CSN5 zu den Deubiquitinierungsenzymen. Von einigen DUBs ist bekannt, dass sie nicht nur eines sondern mehrere Ub-ähnliche Proteine spalten können. Die Abspaltung von Ub neben Nedd8 durch CSN5 war somit denkbar und sollte im Weiteren näher untersucht werden.

4.2.1 Bindung von Ub₄ an CSN und Lid

Aus früheren Studien in unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass sowohl aus Erythrozyten aufgereinigtes CSN als auch der Lid-Subkomplex Ub₄ binden. In Abb. 18 sind Elektronenmikrographen beider Komplexe mit goldmarkiertem Ub₄ zu sehen, die von Barbara Kapelari angefertigt wurden.

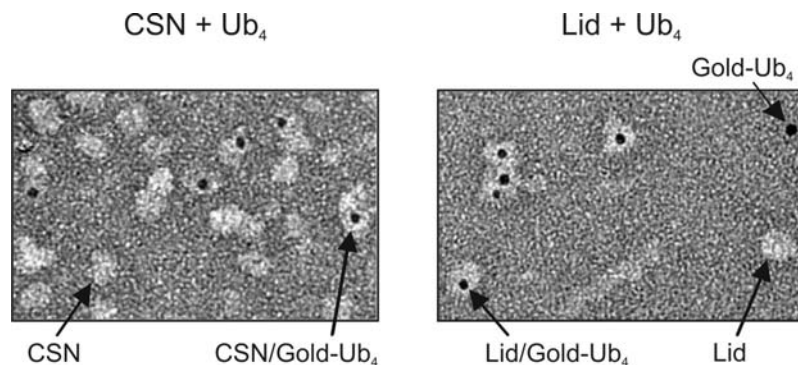


Abb. 18: Elektronenmikroskopie von aufgereinigtem CSN und Lid-Subkomplex mit goldmarkiertem Ub₄

Die Komplexe wurden mit 3,5 nm kolloidalem, goldmarkiertem Ub₄ inkubiert. Nach 30 s wurden die Komplexe mit 2% (w/v) Uranylacetat negativ gefärbt. Der freie CSN-Komplex (CSN, linkes Bild) oder Lid-Subkomplex (Lid, rechtes Bild) sowie Komplexe mit gebundenem, goldmarkiertem Ub₄ (CSN/Gold-Ub₄ oder Lid/Gold-Ub₄) sind durch Pfeile bezeichnet. Übereinstimmend mit vorherigen Ergebnissen erscheinen beide Komplexe in einer Vielzahl von 2-dimensionalen Ansichten mit diffusen Grenzen und bilden Di- und Oligomere (Kapelari et al., 2000) (Hetfeld et al., 2005).

Es konnte die Bindung von Ub₄ an den Lid bei über 50% der Komplexe gezeigt werden. Das markierte Ub₄ bindet außerdem an etwa 1/3 der CSN-Komplexe.

4.2.2 Deubiquitinierung von Ub₄

Die Elektronenmikrographen sowie die vorangegangenen Experimente mit gereinigtem CSN und 26S Proteasom wiesen auf eine Deubiquitinierungsaktivität am CSN hin.

Daher sollte untersucht werden, ob über K48 verknüpftes Ub₄ als Substrat vom aufgereinigten CSN gespalten werden kann. Dazu wurde das CSN für 4 h mit Ub₄ inkubiert und Aliquots nach 0, 1 und 4 h durch Westernblotting untersucht. Wie in Abb. 19 zu erkennen ist, konnte das CSN Ub₄ bereits in 1 h in alle Ub-Produkte spalten. Nach 4 h war kein Ub₄ mehr nachzuweisen.

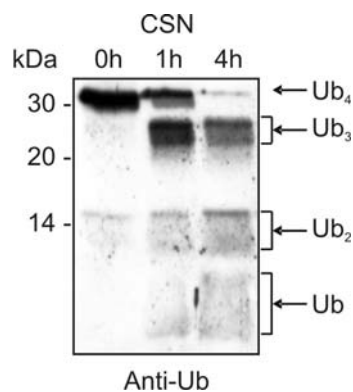


Abb. 19: Deubiquitinierung von Ub₄ durch das CSN

Über K48 verknüpftes Ub₄ wurde mit dem CSN inkubiert. Nach Westernblotting ist mit dem Anti-Ub-Antikörper der Abbau zu Tri- (Ub₃), Di- (Ub₂) und Mono-Ub bereits nach 1 h zu sehen (Hetfeld et al., 2005)

Die aktive Untereinheit des Komplexes, CSN5, könnte neben der Deneddylierung auch die Abspaltung von Ub bewirken. CSN5 gehört zur Klasse der Metalloproteasen (Cope et al., 2002). Da es sich bei dem CSN um einen aus Erythrozyten aufgereinigten Komplex handelt, könnten wie die Kinasen auch Deubiquitinasen am CSN assoziiert vorliegen. Für eine Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Enzymaktivitäten wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt.

Zur Hemmung von CSN5 wurde der Metalloproteaseinhibitor ortho-Phenanthrolin (OPT) und zur Hemmung von Deubiquitinierungsenzymen, die zur Klasse der Cysteinproteasen gehören, N-ethylmaleimid (NEM) sowie Curcumin eingesetzt. Das aufgereinigte CSN wurde mit 5 mM OPT, 5 mM NEM oder 50 µM Curcumin 15 min vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Ub₄ gestartet. Als Kontrolle wurde Ub₄ alleine inkubiert. Aliquots wurden stündlich entnommen und nach Westernblot mit Anti-Ub-Antikörper analysiert.

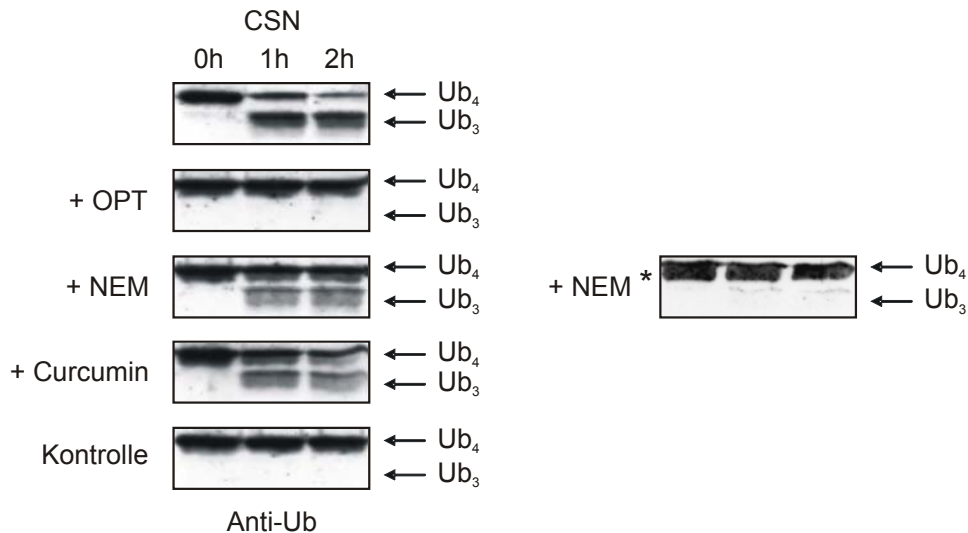


Abb. 20: OPT und NEM hemmen die Deubiquitinierung von Ub₄ durch das CSN

Das CSN wurde 15 min mit 5 mM OPT, 5 mM NEM oder 50 µM Curcumin bei 37°C vorinkubiert und anschließend für die angegebenen Zeitintervalle mit Ub₄ inkubiert. Als Kontrolle wurde Ub₄ alleine inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Anti-Ub-Antikörper. „*“ kennzeichnet eine verlängerte Vorinkubation mit NEM für 1 h (Hetfeld et al., 2005).

In Abb. 20 ist zu erkennen, dass durch Curcumin keine oder nur eine sehr geringe Hemmung der Deubiquitinierung eintrat. Dagegen bewirkte der Metalloproteasehemmstoff OPT eine vollständige Inhibierung der Aktivität des CSN. Nach 15-minütiger Vorinkubation war mit dem Cysteinproteaseinhibitor NEM nach 1 h ein Abbau von Ub₄ zu Ub₃ zu erkennen, der anschließend stagnierte.

Die teilweise Hemmung der Deubiquitinierung mit NEM war schwer zu erklären, da die vollständige Hemmung mit OPT gegen die Anwesenheit eines weiteren DUB sprach. Im Folgenden wurde deshalb getestet, ob die Inhibitoren einen Einfluss auf die Komplexintegrität haben.

Das CSN wurde für 1 h mit den Hemmstoffen in gleicher Konzentration wie im Versuch zuvor inkubiert und anschließend im nativen Polyacrylamidgel getrennt. Der Westernblot mit Anti-CSN5-Antikörper ist in Abb. 21A dargestellt und zeigt, dass OPT und Curcumin keinen Einfluss auf die Integrität des Komplexes haben. Dagegen führt der Inhibitor NEM zum Zerfall des CSN.

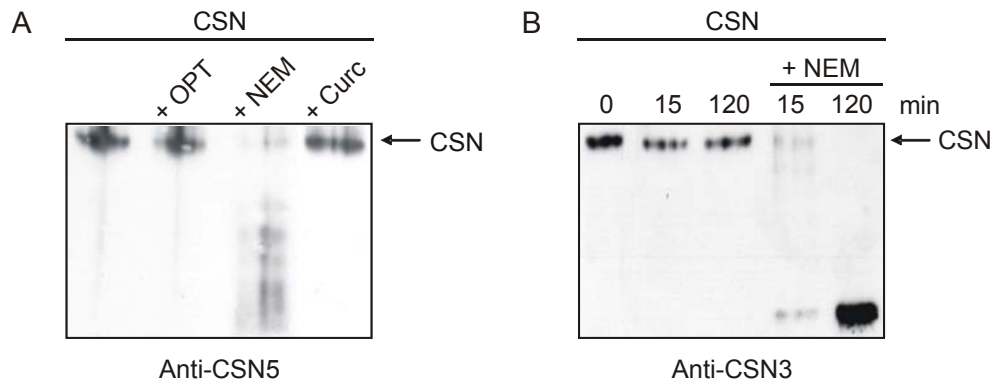


Abb. 21: NEM zerstört den CSN-Komplex

A) Das CSN wurde für 1 h mit denselben Konzentrationen an Hemmstoffen wie in Abb. 20 inkubiert und anschließend eine native Gelelektrophorese durchgeführt. Die Position des CSN-Komplexes wurde nach Westernblot mit Anti-CSN5-Antikörper nachgewiesen. B) Das CSN wurde für die angegebenen Zeitintervalle mit 5 mM NEM inkubiert und anschließend wie in A) aufgetrennt. Mit Anti-CSN3-Antikörper sind der CSN-Komplex sowie die CSN3-Untereinheit zu erkennen (Hetfeld et al., 2005).

Anschließend wurde die Wirkung von NEM in einer Zeitreihe untersucht. Mit dem Anti-CSN3-Antikörper war im Westernblot nach Trennung im nativen Gel zu erkennen, dass der Komplex ohne NEM 2 h stabil bleibt, jedoch unter Einwirkung des Hemmstoffes bereits nach 15 min die Zerstörung des Komplexes beginnt (Abb. 21B). Nach 2 h ist kein intakter CSN-Komplex mehr nachweisbar.

Unter Berücksichtigung der erhaltenen Ergebnisse wurde der Deubiquitinierungsversuch mit Ub₄ wiederholt. Die Vorinkubation des CSN mit NEM wurde auf 1 h verlängert. Es war deutlich die vollständige Hemmung der Deubiquitinierungsaktivität am CSN durch NEM im Westernblot zu erkennen (Abb. 20, + NEM*).

4.2.3 Deubiquitinierung von Ub₅-Muc1

Im Folgenden wurde das Substrat Ub₅-Muc1 zur Deubiquitinierung eingesetzt, welches schon in 4.1.6 beschrieben wurde. Es wurden ebenfalls die Hemmstoffe OPT, NEM und Curcumin getestet. Die Reaktion wurde nach einer Vorinkubation von 15 min durch die Zugabe des Substrates gestartet und über 2 h verfolgt.

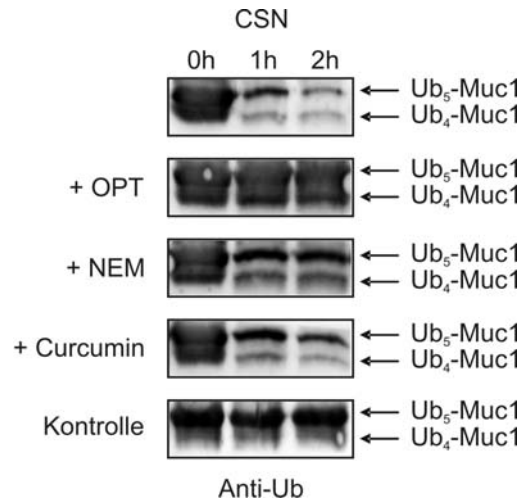


Abb. 22: OPT hemmt den Abbau von Ub₅-Muc1 durch das CSN

Das CSN wurde mit denselben Hemmstoffen wie in Abb. 20 und Ub₅-Muc1 als Substrat inkubiert. Als Kontrolle wurde Ub₅-Muc1 alleine inkubiert. Auf den Westernblot folgte die Detektion mit Anti-Ub-Antikörper. Das Substrat sowie Ub₄-Muc1 als Abbauprodukt sind angegeben.

Der Nachweis mit Anti-Ub-Antikörper zeigte auch bei diesem Substrat dieselbe Wirkung der Hemmstoffe auf die Deubiquitinierungsaktivität des CSN wie im Experiment zuvor (Abb. 22). Mit OPT trat eine vollständige Hemmung auf. Das Substrat wurde mit NEM zunächst abgebaut, nach 1 h war der CSN-Komplex zerstört und kein weiterer Abbau des Substrates fand statt. Curcumin bewirkte unter diesen Bedingungen keine signifikante Inhibition der Deubiquitinierung.

4.3 CHARAKTERISIERUNG VON USP15

In den letzten Jahren wurde bereits eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die mit dem CSN assoziiert sind (siehe Abb. 6). In unserer Arbeitsgruppe wurde über Massenspektrometrie des aus Erythrozyten aufgereinigten CSN-Komplexes die Deubiquitinase USP15 nachgewiesen (Abb. 23 + (Zhou et al., 2003)).

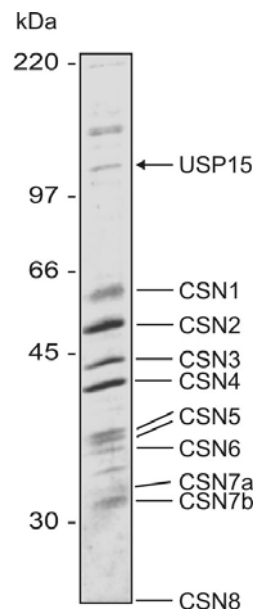


Abb. 23: Identifizierung von USP15 im aufgereinigten CSN-Komplex

Coomassie-Färbung von aufgereinigtem CSN aus Erythrozyten. Die angezeigten Banden wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert (Zhou et al., 2003).

Hierbei handelt es sich um ein ca. 130 kDa großes Deubiquitinierungsenzym (DUB), das zur Klasse der Ub-spezifischen Proteasen (UBP) gehört. USP15 ist eine Cysteinprotease, die die typische katalytisch aktive Triade Cystein, Histidin, Aspartat in den Positionen 269, 862 und 879 aufweist (siehe Abb. 31). Von dem Protein sind drei Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen. Isoform 1 besitzt 981 AS, Isoform 2 nur 952, wobei die AS 228 bis 256 fehlen. Bei der 3. Isoform ist die Sequenz im Bereich zwischen den AS 217 und 256 „DGTWPRGPSTPKSPGASNFSTLPKISPSSLSNNYNNMNNR“ durch folgende 15 AS lange Sequenz ersetzt: „QKNEDGTWPRGPSTP“. Auffällig in der Sequenz ist die große Insertion zwischen dem aktiven Cystein und den beiden anderen katalytisch aktiven Aminosäuren (siehe Abb. 31).

4.3.1 Coelution von USP15 und CSN bei der Präparation

Im nächsten Schritt wurde USP15 mittels PCR aus einer HeLa cDNA-Bank generiert. Dies gelang durch Zusammenfügen zweier Fragmente über eine interne *XhoI*-Schnittstelle an Position 1644. Die Sequenzierung des vollständigen Konstrukts ergab, dass es sich bei dem generierten Protein um die Isoform 2 des USP15 handelte. Mit Hilfe eines C-terminalen Fragmentes von USP15 (724-952) konnte ein Antikörper in Kaninchen gewonnen werden (in Zusammenarbeit mit Rüdiger Schade). Dieser Antikörper kann somit alle drei Isoformen, die sich im C-terminalen Bereich nicht unterscheiden, erkennen.

Mit Hilfe dieses Antikörpers wurde die Co-Elution von USP15 und dem CSN-Komplex während der gesamten Präparation des CSN aus Erythrozyten verfolgt. Nach der Lyse der Zellen wurde im ersten Schritt der Aufreinigung das Erythrozytenlysat über einen DEAE Anionenaustauscher in ca. 65 Fraktionen mit ansteigendem Salzgradienten (50 – 400 mM KCl) von einer Säule eluiert.

In Abb. 24A sind die Fraktionen 40 - 54 dargestellt. In den Fraktionen 44 - 50 eluierten sowohl das CSN als auch USP15. Der Großteil des Enzyms eluierte jedoch bei höherer Salzkonzentration von der Säule. Für die anschließende Aufreinigung im Glyceringradienten (10 - 40%) wurden die Fraktionen 39 - 48 vereinigt und eine Ultrazentrifugation durchgeführt. Im Westernblot war nun eine Gleichverteilung von CSN und USP15 zu sehen (Abb. 24B), die sich nach Vereinen der Fraktionen 13 - 15 in den nachfolgenden Aufreinigungsschritten fortsetzte.

Der am Ende nach der MonoQ-Säule gewonnene CSN-Komplex wies ebenfalls USP15 auf (Abb. 24C). Die folgenden Experimente wurden mit den Fraktionen 22 - 26 durchgeführt.

In den ersten Aufreinigungsschritten war deutlich eine zweite Bande, die in der SDS-PAGE langsamer migrierte, mit dem Anti-USP15-Antikörper zu erkennen. Dabei könnte es sich um eine andere Isoform des USP15 oder um eine phosphorylierte Form des Enzyms handeln (siehe 4.3.3).

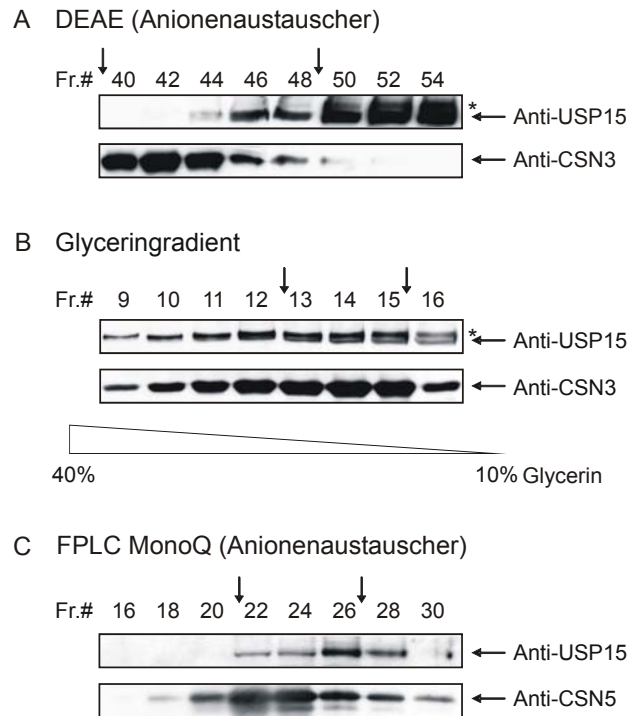


Abb. 24: USP15 wird während der Präparation aus humanen Erythrozyten mit dem CSN aufgereinigt

(A) Westernblot von den Fraktionen 40-54 der DEAE-Säule, dem ersten Aufreinigungsschritt der CSN-Präparation. Die Membranen wurden mit Anti-USP15- und Anti-CSN3-Antikörper inkubiert. Die mit Pfeilen markierten Fraktionen 39-48 wurden für die weitere Aufreinigung vereinigt. (B) Westernblot der Fraktionen 9-16 des 10-40% Glyceringradienten mit denselben Antikörpern wie in (A). Die Fraktionen 13-15 wurden für die weitere Aufreinigung vereinigt. (C) Westernblot der Fraktionen 16-30 der MonoQ-Säule. Das aufgereinigte CSN eluiert in die durch Pfeile gekennzeichneten Fraktionen 22-26 wie durch Anti-CSN5-Antikörper gezeigt. In diesem Schritt coeluiert das USP15 mit dem CSN. „*“ kennzeichnet mögliche Phosphorylierungsbanden von USP15 (Hetfeld et al., 2005).

4.3.2 Interaktion zwischen CSN und USP15

Als nächstes sollte untersucht werden, an welche Untereinheit/-en des CSN das USP15 bindet. Dazu wurde ein Far-Westernblot (Filterbindungsassay) mit den rekombinanten CSN-Untereinheiten CSN1, 2, 3, 5, 6, 7 und 8 sowie mit dem aufgereinigten CSN-Komplex durchgeführt. Nach dem Westernblot wurde die blockierte Membran mit rekombinantem USP15 inkubiert und anschließend die Interaktionen mit dem Anti-USP15-Antikörper identifiziert.

In Abb. 25 ist die Bindung von USP15 an CSN5 und CSN7 des CSN-Komplexes sowie an die rekombinanten Untereinheiten CSN5 und CSN7 zu erkennen. Die übrigen Untereinheiten zeigten keine Wechselwirkung mit USP15.

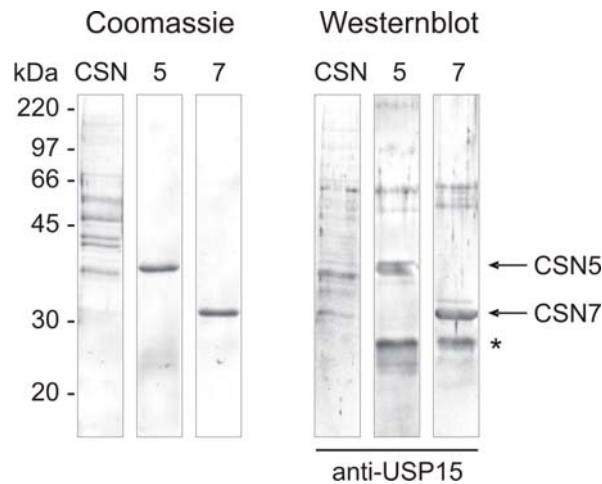


Abb. 25: Bindung von USP15 an CSN5 und CSN7

FAR-Westernblot des CSN-Komplex und der rekombinanten Untereinheiten CSN5 und CSN7. Nach SDS-PAGE und Westernblot wurde die blockierte Membran mit rekombinatem USP15 inkubiert und anschließend ein Nachweis mit Anti-USP15-Antikörper durchgeführt. Die Position der Proteine ist gekennzeichnet. „*“ kennzeichnet eine unspezifische Wechselwirkung des Anti-Kaninchen-Antikörpers.

Zur weiteren Eingrenzung der Interaktion zwischen dem Enzym und dem CSN-Komplex wurden nun Fragmente von USP15 hergestellt. Durch das Ausnutzen interner Restriktionsschnittstellen wurde ein N-terminales Fragment von USP15 von Aminosäure 1-488 und ein C-terminales Fragment von 724-952 mit N-terminalem His-Tag kloniert und die Proteine aufgereinigt. Diese beiden Fragmente wurden mit oder ohne CSN-Komplex für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend im Glyceringradienten (5-30%) aufgetrennt.

Abb. 26 zeigt Westernblots jeder zweiten Fraktion der vier Gradienten nach TCA-Fällung. Das N-terminale Fragment USP15 (1-488) scheint zu dimerisieren, da es sich mit dem Anti-His₆-Antikörper hauptsächlich in den Fraktionen 14-16 des Gradienten wiederfinden ließ (Abb. 26A). Zusammen mit dem CSN kam es zu einer Verschiebung hin in die schwereren Fraktionen, in denen sich das CSN befand. Dagegen zeigte sich beim C-terminalen Fragment USP15 (724-952) eine breite Verteilung über den Gradienten bereits ohne CSN-Komplex (Abb. 26B). Der Hauptanteil befand sich jedoch in den Fraktionen 16-18. Die Inkubation mit CSN führte zu einer leichten Verschiebung hin zu schwereren Fraktionen, die jedoch nicht deutlich ausfiel.

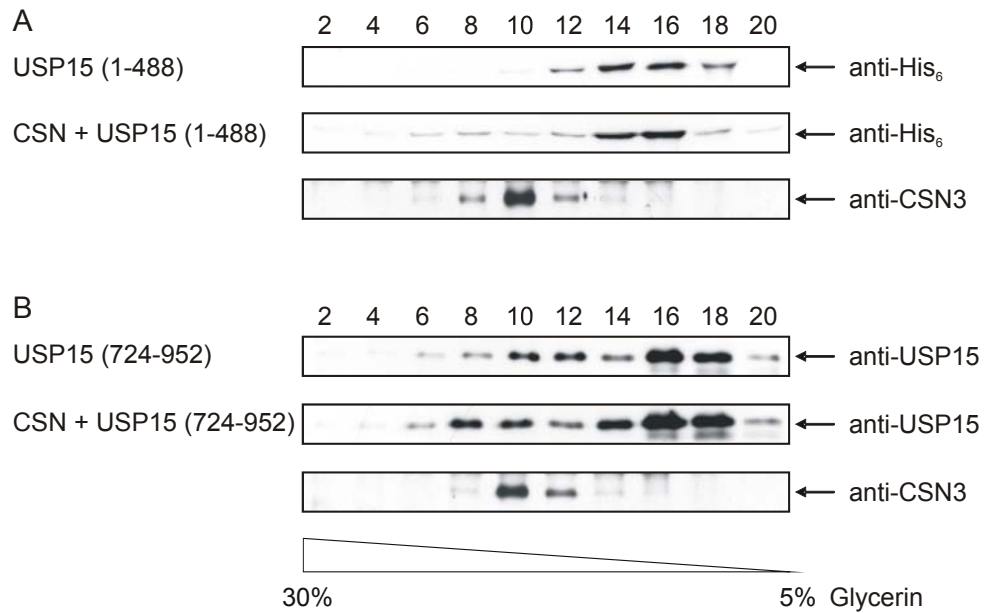


Abb. 26: Interaktion zwischen USP15 (1-488) oder USP15 (724-952) und CSN

Glyceringradient (5-30%) von rekombinantem His-USP15 (1-488) oder His-USP15 (724-952) mit oder ohne CSN nach 30 min Inkubation bei 37°C. A) Westernblot nach TCA-Fällung jeder zweiten Fraktion des Gradienten. Nachweis von USP15 (1-488) mit Anti-His- und des CSN mit Anti-CSN3-Antikörper. B) Westernblot nach TCA-Fällung wie in A). Der Nachweis von USP15 (724-952) erfolgte mit Anti-USP15-Antikörper.

4.3.3 Phosphorylierung von USP15

Beim Nachweis von USP15 in der Präparation des CSN aus Erythrozyten wurde in den ersten Aufreinigungsschritten eine Doppelbande mit dem spezifischen Antikörper detektiert. Eine mögliche Erklärung sind Phosphorylierungen des Enzyms. In unserer Arbeitsgruppe konnten zwei am CSN assoziierte Kinasen identifiziert werden, die CK2 und die PKD. Beide lassen sich am aufgereinigten CSN-Komplex nachweisen (Uhle et al., 2003). Um zu klären, ob diese Kinasen USP15 phosphorylieren, wurden neben dem rekombinanten Protein auch die beiden Fragmente USP15 (1-488) und USP15 (724-952) eingesetzt. Die Proteine wurden entweder mit rekombinanter CK2, PKD oder der CSN-Präparation zusammen mit radioaktivem [γ -³²P]ATP für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE getrennt, mit Coomassie gefärbt und eine Autoradiographie des getrockneten Gels angefertigt.

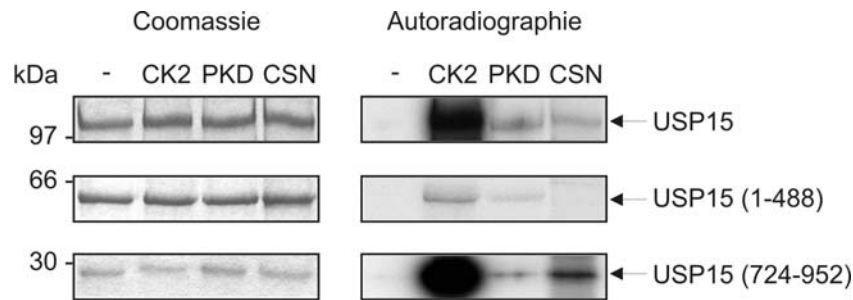


Abb. 27: Phosphorylierung von USP15wt und USP15 (724-952) durch CSN und die CSN-assoziierte Kinase CK2. Rekombinantes His-USP15, USP15 (1-488) und USP15 (724-952) wurden mit rekombinanter CK2, PKD oder dem aufgereinigten CSN in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Nach 1 h bei 37°C wurden die Ansätze durch SDS-PAGE getrennt, mit Coomassie gefärbt (linkes Bild) und eine Autoradiographie des getrockneten Gels angefertigt (rechtes Bild). Die Positionen der rekombinanten Proteine sind durch Pfeile markiert (Hetfeld et al., 2005).

In Abb. 27 ist bei gleicher Proteinmenge (linke Spalte) in der Autoradiographie (rechts) eine starke Phosphorylierung des gesamten Proteins durch die rekombinante CK2 und durch das CSN, nicht jedoch durch die PKD zu sehen. Das N-terminale Fragment von Aminosäure 1 - 488 weist nahezu keine Phosphorylierung auf. Dagegen wird USP15 (724-952) stark durch die CK2 und auch durch den CSN-Komplex phosphoryliert.

Die am CSN assoziierte Kinase CK2 scheint somit den C-Terminus von USP15 an einer oder mehreren Stellen zu phosphorylieren. Daher wurde nach den Konsensussequenzen für die CK2 in diesem Bereich des Enzyms gesucht. Die Konsensussequenz der CK2 lautet: S/T-x-x-D/E/pS/pY (Meggio et al., 1994). Es konnten vier potentielle Motive im Bereich zwischen den Aminosäuren 724 und 952 identifiziert werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: CK2-Konsensussequenzen in USP15 (724-952)

CK2-Konsensussequenz	Aminosäure in USP15
T-T-K-E	767 - 770
T-L-V-D	821 - 824
T-A-S-E	885 - 888
S-D-E-D	932 - 935

Zunächst wurde an der potentiellen Phosphorylierungsstelle S932 eine Punktmutation zu Alanin generiert. Zum Vergleich wurden das mutierte Protein sowie der Wildtyp (wt) mit rekombinanter CK2 und radioaktivem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wie oben beschrieben inkubiert. In Abb. 28

ist zu erkennen, dass die Mutante USP15S932A durch die CK2 genauso stark wie das Wildtypenzym phosphoryliert wird. Die mutierte Aminosäure spielt somit höchstwahrscheinlich keine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung.



Abb. 28: Phosphorylierung von His-USP15 und His-USP15S932A durch die CK2

Rekombinantes His-USP15 und His-USP15S932A wurden mit rekombinanter CK2 in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Nach 1 h bei 37°C wurden die Ansätze durch SDS-PAGE getrennt, mit Coomassie gefärbt (linkes Bild) und eine Autoradiographie des getrockneten Gels angefertigt (rechtes Bild).

In einem zweiten Ansatz zur Identifizierung der relevanten Phosphorylierungsstellen wurde eine Massenspektrometrie durchgeführt. Das C-terminale Fragment USP15 (724-952) wurde mit oder ohne rekombinanter CK2 und 1 oder 0,1 mM ATP für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach SDS-PAGE wurden die mit Coomassie gefärbten Proteinbanden in Kooperation mit Christoph Weise tryptisch verdaut und die Fragmente über Massenspektrometrie vermessen. Die analysierten Massen deckten fast das gesamte Protein ab. Die Methode war jedoch nicht sensitiv genug. Es konnten keine Differenzpeaks festgestellt werden, aus denen auf die Phosphorylierungsstellen hätte geschlossen werden können.

4.3.4 Ubiquitinierungsassay mit USP15

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die vorliegende Phosphorylierung durch die CK2 einen Einfluss auf die Stabilität von USP15 aufweist. Dazu wurde der Einfluss von Curcumin, einem bekannten Kinasehemmstoff, in einem *in vitro* Ubiquitinierungsassay untersucht. Als Quelle für das Ubiquitinierungssystem wurde HeLa Zellysate eingesetzt. Das rekombinante USP15 wurde mit einem ATP-regenerierenden System, zusätzlichem Ub, dem Zellysate sowie mit oder ohne 50 μM Curcumin für 0 bzw. 4 h bei 37°C inkubiert. Aliquots wurden nach Westernblotting mit Anti-USP15-Antikörper analysiert. Die restlichen Ansätze wurden mit Ni-NTA-Beads inkubiert, gewaschen und die gebundenen Proteine ebenfalls im Westernblot mit Anti-USP15- sowie Anti-Ub-Antikörper nachgewiesen.

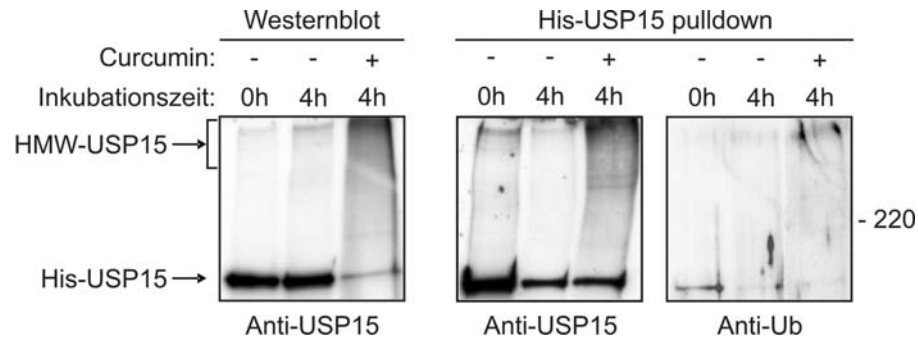


Abb. 29: Curcumin induziert die Bildung von HMW-USP15

Rekombinantes His-USP15 wurde mit Ub und HeLa-Zellysat mit oder ohne 50 μm Curcumin für die angezeigten Zeitintervalle inkubiert. Aliquots wurden nach Westernblot mit Anti-USP15-Antikörper detektiert (links). Inkubation der Proben mit Ni-NTA Magnetarosepartikeln. Nachweis der hochmolekularen USP15-Spezies (HMW-USP15) nach Westernblot mit Anti-USP15- und Anti-Ub-Antikörpern (Mitte und rechts) (Heffeld et al., 2005).

In Abb. 29 sind die Ergebnisse dargestellt. Im Westernblot (linkes Bild) war deutlich zu erkennen, dass die Inkubation von USP15 im HeLa Zellysat über 4 h bei 37°C keinen Einfluss auf die Stabilität ausübte. Hingegen kam es bei Zugabe von Curcumin zu einer deutlichen Reduktion von USP15 bei gleichzeitiger Bildung von hochmolekularen Banden, die der Anti-USP15-Antikörper erkannte. Wahrscheinlich handelte es sich dabei um ubiquitinierte USP15-Spezies (HMW-USP15). Die Inkubation der Ansätze mit den Ni-NTA Magnetarosepartikeln (mittleres und rechtes Bild) zeigte zum einen eine stärkere Bindung der 0 h-Kontrolle an die Partikel als nach Inkubation bei 37°C. Darüber hinaus war die starke Bildung von HMW-USP15 nach Zugabe von Curcumin mit dem Anti-USP15-Antikörper zu sehen. Mit dem Anti-Ub-Antikörper wurde bestätigt, dass es sich dabei um Poly-Ub-Konjugate handelte. Außerdem erkannte der Antikörper wie erwartet eine Bande auf Höhe des USP15, am deutlichsten bei 0 h zu sehen, welche das am aktiven Zentrum des USP15 gebundene Ub kennzeichnet.

4.3.5 Sequenzanalyse von USP15

Im Anschluss wurde die Sequenz des identifizierten Enzyms näher charakterisiert. In den vorangegangenen Experimenten mit aufgereinigtem CSN-Komplex zeigte sich eine unerwartete vollständige Hemmung der USP15-Aktivität durch den Metalloproteaseinhibitor OPT (4.2.2). Deubiquitinierungsenzyme der UBP-Gruppe waren jedoch bisher als Cysteinproteasen beschrieben. Deshalb wurde in Kooperation mit Hartmut Scheel und Kay Hofmann von der Firma Memorec eine Sequenzanalyse von den ca. 60 heute bekannten humanen USPs durchgeführt.

USP15	HS	430	NDSIIIVDTIFHGLFKSTLVCP	CAKISVTFEDPF	CYLILPLPMK	KEH	(330)	DPWYCPNCKEH	Q9Y4E8-2
USP11	HS	407	NDSVIIVDTTFHGLFKSTLVCP	DCGNVSVTFEDPF	CYLSVPLPLSHKR	CKQH	(303)	NPWYCPNCKQH	P51784
USP4	HS	443	NDSVIIVDTTFHGLFKSTLVCP	CAKVSVTFEDPF	CYLILPLPLKDR	CKKH	(307)	DPWYCPNCKKH	Q13107
UBP12	SC	518	NCSVIIVDTLFLVGMKSTLYC	PECQNVSVITFDP	YNDVTLPLPVD	TFVW	(418)	DSWYCPNCKEH	P39538
UBP12B	SP	424	NDSIIIVQLFQGMKSTLYC	CSICYQKSTAFDP	FMYLILPLP	PTSAKW	(240)	DSWYCPGCKAF	Q9USM5
UBP12A	SP	455	NDSLIVDLFQGMKSTLYC	PVCNTVSVITFDP	FMDLILPLP	VKQVW	(344)	DPWYCPNCKEF	O60079
USP15	CE	417	NDSIIIVDTLHGQIKSTLVC	PVCEKISIKEDPF	GYLSLPLPP	KEQI	(255)	DSWYCPNCKKH	Q9TYY8
USP15	AT	470	NDSVIIVDVVCGQYKSTLVCP	PACGKISITFDP	FMYLIVLPLP	STLTR	(278)	DMWFNCPNCKEH	Q93Y01
*									
USP7	HS	316	VEGTLPKLFRCKMVSYLQ	CKEVDYRS	DRRFDYYDIQL	SIKGGKNI	(16)	NKYDAGEHGLQ	Q93009
UBP15	SC	307	VEGKINEIFVCKRMKSYLRC	INVDYESARVDF	WDLQLNVKN	FKNL	(16)	NQYAAQDYGLQ	P50101
UBP15	SP	332	VENALNDIFVCKRMKSYVRC	IDVNYESSRVED	FWDLQLNVK	GMDTL	(16)	NKYAEGHGLQ	Q9UTT1
UBP5	SP	336	VENALTNLIFVCKRMKSYLAC	VNVNFE	SARSEDYWDIQL	NVKGKML	(16)	NQYFADTYGFQ	Q09879
%									

Abb. 30: Sequenzvergleich der Zn-Finger enthaltenden Region des humanen USP15 und ausgewählter UBPs

Der obere Block enthält Paraloge und Orthologe von USP15. Orthologe von USP7/HAUSP sind im unteren Block dargestellt. Die möglichen Zn-koordinierenden Cysteine sind blau unterlegt und durch einen Stern gekennzeichnet. Die Cysteine der unteren USP7-Gruppe binden wahrscheinlich kein Zn. Die zweite Spalte gibt die Spezies, die dritte die Position der dargestellten Sequenz an. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der im Sequenzvergleich nicht dargestellten AS an. Konservierte Positionen in wenigstens 50% von ~60 untersuchten USPs sind in grau, unveränderliche Positionen in schwarz/blau unterlegt. „%“ gibt die Bindungsstelle von USP7 für den Hemmstoff Ub-aldehyd an (Hu et al., 2002). In der letzten Spalte ist die SWISS-PROT Zugangsnummer für jede Sequenz angegeben. Verwendete Abkürzungen: *H. sapiens* (HS), *S. pombe* (SP), *S. cerevisiae* (SC), *C. elegans* (CE) und *A. thaliana* (AT) (Ausschnitt aus der Dissertation von Hartmut Scheel und (Hetfeld et al., 2005))

In Abb. 30 ist ein Auszug der Ergebnisse des Sequenzvergleichs dargestellt. USP15 gehört zu einer Subgruppe von UBPs, die vier Cysteinreste aufweisen, die paarweise mit einer großen Insertion dazwischen angeordnet sind. Im oberen Abschnitt dargestellt sind USP15 mit seinen Paralogen USP11 und USP4 sowie die Orthologen verschiedener Spezies, die alle das identifizierte Motiv aufweisen. Die vier Cysteinreste könnten einen Zinkfinger bilden, d.h. Zn^{2+} koordinieren.

Bei der Sequenzanalyse wurde eine weitere Subgruppe innerhalb der USPs identifiziert. Zu dieser gehört USP7/HAUSP. In Abb. 30 ist das Enzym mit seinen Orthologen in Hefe im unteren Block dargestellt. Diese Gruppe von Proteinen besitzt ein kleineres Molekulargewicht als die erste, enthält nur noch ein konserviertes Cystein und keine Insertion, kann somit wahrscheinlich kein Zn binden.

4.3.6 Deubiquitinierung von linearem Ub-GFP

Die Identifizierung eines möglichen Zinkfingers in USP15 bildete einen Hinweis für die beobachtete Inhibition mit dem Metalloproteaseinhibitor OPT bei der CSN-Präparation (siehe

Abb. 20). Um die Funktionalität des Zinkfingers zu testen, wurde durch Punktmutation das Cystein an Position 783 zu Alanin mutiert, um somit die potentielle Bindung eines Metallions zu unterbinden.

Das Modell in Abb. 31 veranschaulicht die Positionen der paarweisen Cysteinreste innerhalb der katalytisch aktiven Triade des USP15.

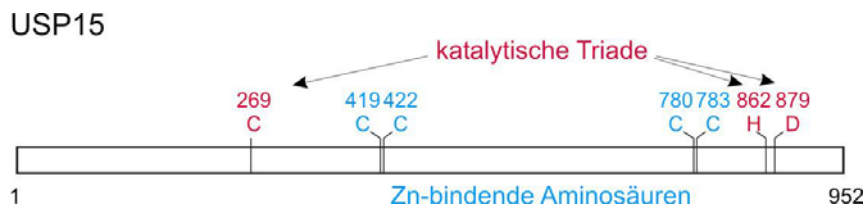


Abb. 31: Modell von USP15

Humanes USP15 Isoform 2 (Q9Y4E8-2) mit katalytisch aktiver Triade an den Positionen C269, H862 und D879 (rot) sowie Zn-bindende Cysteine an den Positionen 419, 422, 780 und 783 (blau) (Hetfeld et al., 2005).

Zunächst wurde lineares Ub-GFP als Substrat mit dem wt USP15 sowie der Mutante USP15C783A eingesetzt. Wie im Westernblot in Abb. 32 mit Anti-GFP-Antikörper zu sehen ist, wurde das Substrat von beiden Enzymen gleichmäßig gut gespalten. Die Inkubation mit OPT zeigte hier weder beim Wildtyp noch bei der Mutante eine Wirkung. Der Cysteinproteaseinhibitor NEM hemmte wie erwartet beide Enzyme vollständig.

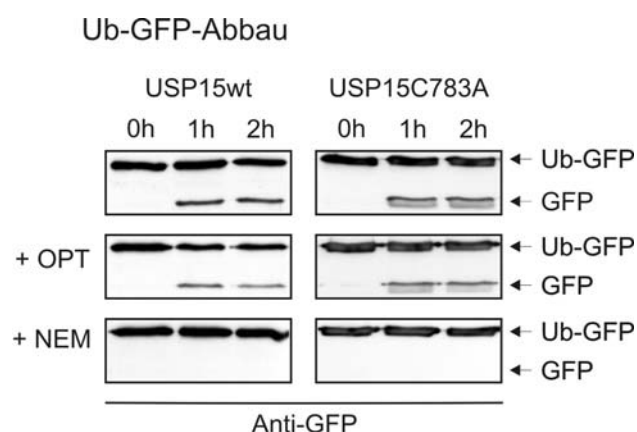


Abb. 32: Inhibitoreffekte auf die Deubiquitinierungsaktivität von USP15wt und USP15C783A beim Abbau von Ub-GFP. Inkubation von His-USP15wt und His-USP15C783A mit Ub-GFP bei 37°C in Ab- oder Anwesenheit von 5 mM OPT oder 5 mM NEM für die angegebenen Zeitpunkte. Westernblot mit Anti-GFP-Antikörper. Ub-GFP und GFP sind angezeigt (Hetfeld et al., 2005).

4.3.7 Abbau von polyubiquitinierten Substraten durch USP15

Im Folgenden wurde die Deubiquitinierungsaktivität von rekombinantem USP15wt und der Mutante USP15C783A mit über K48 verknüpftem Ub₄ und den beiden Hemmstoffen OPT und NEM getestet. Abb. 33A zeigt nach Westernblot mit Anti-Ub-Antikörper einen zeitabhängigen Abbau von Ub₄ durch den Wildtyp.

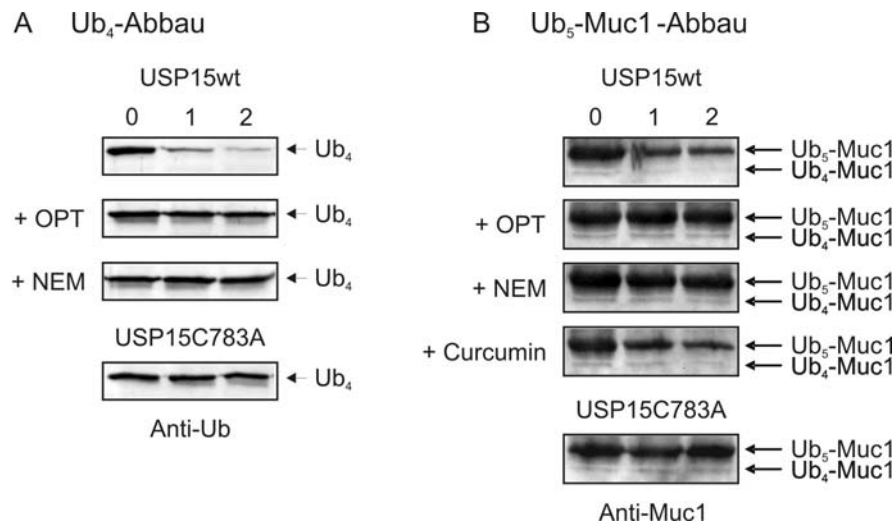


Abb. 33: Abbau von Ub₄ und Ub₅-Muc1 durch His-USP15wt und His-USP15C783A

Die rekombinanten Proteine wurden mit 5 mM OPT, 5 mM NEM oder 50 µM Curcumin für 15 min vorinkubiert und den Ansätzen nach Zugabe von Ub₄ (A) bzw. Ub₅-Muc1 (B) nach den angegebenen Zeitpunkten Aliquots entnommen. Die Membranen wurden nach Westernblotting mit Anti-Ub- bzw. Anti-Muc1-Antikörper inkubiert. Die Positionen von Ub₄ sowie Ub₅-Muc1 und Ub₄-Muc1 sind angegeben (Hetfeld et al., 2005).

Dieser Abbau wurde wie erwartet vollständig durch NEM gehemmt. Überraschend trat nun ebenfalls eine vollständige Hemmung durch OPT auf. Im Experiment wurde das Enzym wie zuvor für 15 min mit den Hemmstoffen vorinkubiert.

Als nächstes wurde das polyubiquitinierte Substrat Ub₅-Muc1 unter denselben Bedingungen eingesetzt (Abb. 33B). Hier wurde zusätzlich Curcumin in einer Konzentration von 50 µM als Inhibitor der DUB-Aktivität verwendet. Auch bei diesem Substrat lag eine vollständige Hemmung des Abbaus sowohl bei NEM als auch bei Verwendung von OPT vor. Curcumin zeigte unter diesen Bedingungen keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität.

Die Mutante USP15C783A wurde ebenfalls mit beiden Substraten inkubiert (Abb. 33A+B unten). Es zeigte sich, dass der Verlust eines Zink-koordinierenden Cysteins ausreicht, um eine vollständige Hemmung der Deubiquitinierungsaktivität bei beiden Substraten zu bewirken.

4.3.8 Bindung von Ub₄ an USP15

Die unterschiedlichen Ergebnisse von wt USP15 und der Mutante je nach eingesetztem Substrat und Hemmstoff deuteten darauf hin, dass der identifizierte Zinkfinger nur für den Abbau von über Isopeptidbindungen verknüpften Ub-Ketten relevant ist. Der Zinkfinger könnte somit eine Bindungsstelle für polyubiquitinierte Substrate darstellen. Um diese Fragestellung näher zu beleuchten, wurde rekombinantes His-USP15 mit oder ohne NEM oder die Mutante ohne funktionsfähigen Zn-Finger an Ni-NTA-Magnetagarosepartikel gebunden, gewaschen und anschließend für 15 min mit Ub₄ inkubiert. Die kurze Inkubationszeit sollte dem Abbau des Substrates entgegenwirken. Nach dreimaligem Waschen wurden die Proteine in der SDS-PAGE getrennt, auf Nitrocellulose überführt und mit dem Anti-Ub-Antikörper die Bindung von Ub₄ überprüft.

Abb. 34 zeigt die Bindung von Ub₄ an wt USP15. Die Zugabe von NEM, das im aktiven Zentrum des Enzyms bindet, reduzierte die Bindung signifikant. Die Mutante USP15C783A ohne funktionsfähigen Zinkfinger weist ebenfalls eine stark reduzierte Bindung von Ub₄ auf.

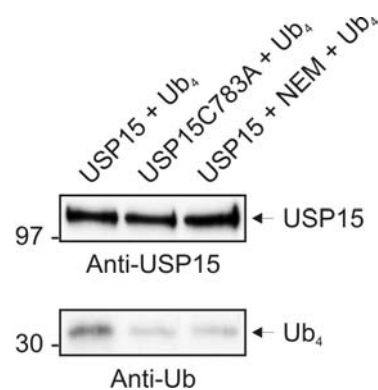


Abb. 34: Zn-Finger von USP15 ist essentiell für die Bindung von Ub₄

Rekombinantes USP15 mit oder ohne NEM oder USP15C783A wurden an Ni-NTA-Magnetagarosepartikel gebunden und für 15 min mit Ub₄ inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Partikel aufgekocht und nach der SDS-PAGE und Westernblotting mit Anti-USP15- und Anti-Ub-Antikörper getestet (Hetfeld et al., 2005).

4.3.9 Effekt von USP15 auf Rbx1

Die Identifizierung eines Deubiquitinierungsenzyms am CSN-Komplex warf die Frage nach einer Funktion *in vivo* auf. Es war bekannt, dass Cullin-haltige E3-Ligasen an das CSN binden und vom JAMM-Motiv in CSN5 die Culline deneddyliert werden. Die eigentliche Ub-Ligase in diesen Komplexen ist ein Vertreter der Rbx-Familie, welcher nach

Autoubiquitinierung durch das 26S Proteasom abgebaut wird (Ohta et al., 1999).

Um zu klären, ob das am CSN assoziierte USP15 einen Einfluss auf die Ub-Ligase zeigt, wurde Rbx1 mit einem C-terminalen zz-Tag (bereitgestellt von Michael Seeger) zusammen mit Myc-USP15, der Mutante Myc-USP15C783A oder als Kontrolle mit Myc-Vektor in HeLa Zellen transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für 0, 3 oder 6 h mit Cycloheximid behandelt, um den Abbau von Rbx1 ohne weitere Translation zu untersuchen. Die Zellen wurden lysiert und nach dem Westernblot Rbx1, USP15 und als Ladekontrolle die 20S Proteasom-Untereinheit $\alpha 6$ mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

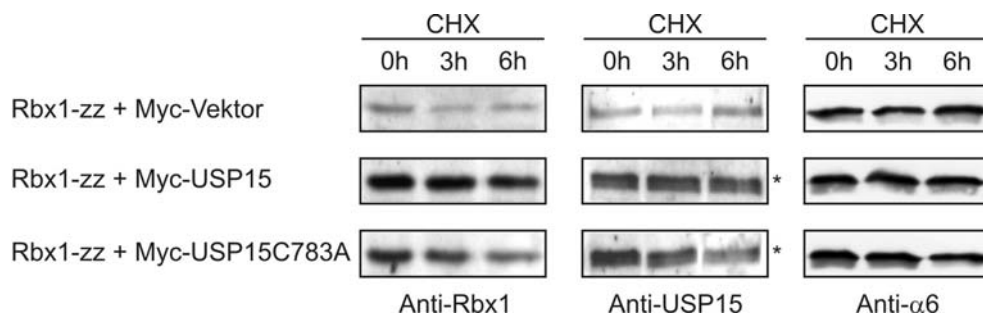


Abb. 35: Die Co-Transfektion von Rbx1 und wt USP15, aber nicht USP15C783A, stabilisiert Rbx1

HeLa Zellen wurden transient mit den cDNAs von Rbx1-zz und Myc-Vektor, Myc-USP15 oder Myc-USP15C783A transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für die angegebenen Zeitintervalle mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (CHX) behandelt, anschließend lysiert und gleiche Proteinmengen auf das Gel zur SDS-PAGE geladen. Nach dem Westernblot wurde die Membran mit Anti-Rbx1-, Anti-USP15- und als Ladekontrolle mit Anti- $\alpha 6$ -Antikörper inkubiert. „*“ kennzeichnet das vom USP15-Antikörper neben dem endogenen USP15 erkannte exprimierte Myc-USP15 oder Myc-USP15C783A (Hetfeld et al., 2005).

In Abb. 35 ist zu erkennen, dass wt USP15 und die Mutante USP15C783A gut in den Zellen exprimiert wurden. Der Antikörper zeigte die Myc-markierten Proteine als Bande oberhalb des endogenen USP15 (mit „*“ markiert). Die Proteinmenge von USP15 nimmt innerhalb der untersuchten Zeitspanne nur geringfügig ab. Dagegen war der Gehalt an mutiertem USP15 nach 6 h leicht reduziert. Bei der Co-Transfektion von Rbx1 mit USP15 zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Proteinkonzentration von Rbx1 im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Die Mutante ohne funktionsfähigen Zinkfinger bewirkte dagegen eine geringere Stabilisierung des Rbx1. Im Zeitverlauf nahm die Proteinkonzentration von Rbx1 in Gegenwart oder Abwesenheit der Mutante ab. Die Coexpression von wt USP15 führte hingegen zur Stabilisierung der E3 Ligase.

Ob USP15 auch eine Stabilisierung der zweiten Gruppe von RING-Ligasen ohne Cullin bewirkt, wurde anhand der monomeren E3-Ligase Mdm2 untersucht. In einem Ubiquitinierungsassay wurde rekombinantes Mdm2 mit und ohne USP15 *in vitro* inkubiert. Hier konnte jedoch keine stabilisierende Wirkung von USP15 auf Mdm2 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Damit ist bisher nur ein Einfluss von USP15 auf die E3 Ligase Rbx1 gezeigt.

5 DISKUSSION

Seit der Entdeckung des CSN 1994 in *A. thaliana* (Wei et al., 1994) sind zahlreiche interagierende Proteine sowie assoziierte und intrinsische Aktivitäten beschrieben worden, die jedoch noch kein vollständiges Bild von der Funktion des CSN-Komplexes in der Zelle ergeben (zusammengefasst in (Bech-Otschir et al., 2005)). In der vorliegenden Arbeit wurden neue Erkenntnisse zur Rolle des CSN als Komponente des UPS gewonnen.

5.1 DAS CSN ALS „ALTERNATIVER LID“ DES 26S PROTEASOMS

Die Hypothese, dass der CSN-Komplex als „alternativer Lid“ des 26S Proteasoms fungieren könnte, basiert auf mehreren Grundlagen: Sequenzanalysen zeigten, dass jeder der acht CSN-Untereinheiten eine entsprechende Lid-Untereinheit zugeordnet werden kann (Henke et al., 1999). Dies weist auf einen möglichen gemeinsamen Vorläufer beider Komplexe hin. Zudem zeigten Interaktionsstudien der Komplexe Parallelen in der Anordnung der Untereinheiten zueinander (Fu et al., 2001). Erste zweidimensionale Ergebnisse lieferten elektronenmikroskopische Untersuchungen beider Komplexe, die eine ähnliche Architektur bestätigten (Kapelari et al., 2000). Als letzter Hinweis diente die Tatsache, dass der CSN-Komplex bei der Aufreinigung des 26S Proteasoms identifiziert wurde (Seeger et al., 1998).

Dem „alternativen Lid“ widersprachen Ergebnisse, in denen eine direkte Interaktion der Lid-Untereinheit Rpn6 mit CSN1 und CSN2 beschrieben wurde (Kwok et al., 1999; Lier and Paululat, 2002). Während die funktionelle Beteiligung des CSN am UPS gesichert scheint, konnte somit bisher nicht zwischen einer direkten oder indirekten Interaktion des CSN und des 26S Proteasoms unterschieden werden.

In dieser Arbeit wurde zunächst eine geeignete Methodik zur Detektion der postulierten Wechselwirkung etabliert. Die Komplexe sollten mittels Co-Immunpräzipitation wechselseitig nachgewiesen werden, was in den ersten Experimenten mit HeLa-Zelllysaten nicht gelang. Dies sprach dafür, dass die Assoziation des CSN an das 26S Proteasom anstelle des Lid-Subkomplexes oder auch an den intakten 19S Regulator nur in geringem Umfang *in vivo* auftritt. Zudem lagen keine Daten zur Stabilität oder zu den notwendigen Bedingungen für eine solche Anlagerung beider Komplexe vor, was Gründe dafür sein könnten, dass bei der Detektion mit Antikörpern die Nachweisgrenze unterschritten wurde.

Eine Interaktion zwischen CSN und 26S Proteasom konnte durch die Optimierung der Methodik in zwei Punkten erreicht werden: Zum einen wurde durch die Generierung von B8-Mausfibroblasten, die permanent humanes Flag-CSN2 exprimieren, eine Verdopplung der CSN-Konzentration in den Zellen erzielt (Huang et al., 2005). Zum anderen wurden die Proteinkomplexe durch eine zusätzliche Auftrennung des Zelllysates im Glyceringradienten angereichert. Obwohl mit den B8-Zellen ein Wechsel vom humanen ins murine System vollzogen wurde, konnte mit dem Einbau der Untereinheit in den Komplex gerechnet werden, da die Aminosäuresequenz von humanem CSN2 identisch ist mit der murinen. Interessant bleibt, dass die stabile Transfektion von HeLa-Zellen mit der Flag-CSN2-Untereinheit zum Zelltod führte. Die Erhöhung der CSN-Konzentration in den B8-Zellen bestätigt frühere Ergebnisse, bei denen CSN2 transient transfiziert wurde (Naumann et al., 1999). Auf welche Effekte diese *de novo*-Assemblierung des Komplexes zurückzuführen ist, bleibt bisher ungeklärt. Weitere untersuchte Untereinheiten des CSN zeigen diesen Konzentrationsanstieg nach Transfektion nicht.

Der effiziente Einbau von Flag-CSN2 in den murinen Komplex konnte im Gradienten durch die Sedimentation der Untereinheit in die Fraktionen, in denen sich das CSN nachweisen ließ, belegt werden (Abb. 9). Im Glyceringradienten wurde neben der erwarteten Trennung des 26S Proteasoms und des CSN-Komplexes ein Überlappungsbereich zwischen den jeweiligen Hauptpeaks detektiert, in dem sich beide Komplexe wiederfanden. Dieser Nachweis lässt mehrere Erklärungen zu. Es könnte sich um jeweilige Subpopulationen der Komplexe handeln, die im Falle des CSN mit weiteren oder im Falle des 26S Proteasoms mit weniger Proteinen assoziiert vorliegen. Andererseits könnte es sich hier gemäß der oben aufgestellten Hypothese um die gesuchten Hybrid-Komplexe aus dem CSN gebunden an Base und 20S handeln. Bei einem solchen Hybrid-Komplex sind wie auch beim 26S Proteasom mehrere Varianten denkbar. Der 20S Kernkomplex könnte nur auf einer oder auf beiden Seiten mit CSN-Base assoziiert sein. Denkbar wäre auch ein 20S Proteasom flankiert von dem 19S Regulator auf der einen und dem CSN-Base auf der anderen Seite. Hybrid-Komplexe mit Regulatoren auf beiden Seiten sollten vom Molekulargewicht her dem 26S Proteasom entsprechen. Im Gradienten konnten in den Hauptfraktionen des 26S Proteasoms jedoch keine solchen Komplexe nachgewiesen werden. Wahrscheinlich war ihre Konzentration im Lysat so gering, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze der Antikörper lagen. Möglich bleibt außerdem, dass die Bildung der Hybrid-Komplexe die Sedimentationsgeschwindigkeit im Gradienten veränderte und sie sich ebenfalls im Überlappungsbereich befinden.

Nach Immunpräzipitation des CSN-Komplexes aus den Zwischenfraktionen gelang der Nachweis der Base-Untereinheit Rpn2 und der ATPase Rpt2 (Abb. 10). Untereinheiten des Lid wurden nicht gefunden. Diese Ergebnisse decken sich mit der Annahme eines Hybrid-Komplexes aus CSN-Base, der als Regulator auf nur einer Seite des 20S Proteasoms vorliegt. Nicht ausgeschlossen werden kann in diesen Experimenten eine indirekte Interaktion des CSN mit dem intakten 19S Regulator.

Auch in der Arbeitsgruppe von Xing Deng konnten zur selben Zeit Hinweise auf eine Interaktion zwischen CSN und 26S Proteasom erbracht werden. Eine Gelfiltration von Blumenkohllysat in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren und ATP zeigte die Elution von ca. 5% der Gesamtmenge des CSN zusammen mit Rpn6 und Rpt5 (Peng et al., 2003). Bei weiteren Experimenten mit Formaldehyd als Cross-linker konnte das CSN zusammen mit 20S Proteasom, Base, Lid und Komponenten von SCF-Komplexen in Fraktionen mit einem Molekulargewicht über dem des 26S Proteasoms nachgewiesen werden. Die Anordnung der drei Komponenten blieb ungeklärt. Immunpräzipitationen dieser hochmolekularen Fraktionen von CSN, 26S Proteasom und drei unterschiedlichen F-Box-Proteinen zeigten jeweils Proteine der beiden anderen Komplexe. Durch die Ergebnisse wurde die Existenz von Superkomplexen bestätigt, eine Klärung der Frage nach einer direkten oder indirekten Interaktion zwischen CSN und 26S Proteasom jedoch nicht erreicht.

Mit Durchführung eines Flag-Pulldown gelang Xiaohua Huang aus den Flag-CSN2-B8 Zelllysaten die spezifische Elution des CSN-Komplexes mit weiteren assoziierten Proteinen. Im Westernblot ließen sich eindeutig neben dem vollständigen CSN-Komplex das 20S Proteasom sowie Untereinheiten des Base-Subkomplexes nachweisen (Abb. 12). Der Nachweis von Lid-Untereinheiten gelang nur in einigen Experimenten. Die Ergebnisse bekräftigen die Existenz von Hybrid-Komplexen aus CSN-Base-20S Proteasom und ein geringes Maß von 20S flankiert von 19S auf einer und CSN-Base auf der anderen Seite. Trotz der Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Glyceringradienten erbrachte der Flag-Pulldown noch keine eindeutige Zuordnung der Bindungsstelle des CSN ans Proteasom.

In einer *in vitro*-Kompetitionsstudie konnte jedoch ein weiterer Hinweis zur Bindungsstelle geliefert werden. Die Inkubation der aufgereinigten Komplexe aus humanen Erythrozyten in ansteigenden molaren Verhältnissen von CSN zu 26S Proteasom mit anschließender Immunpräzipitation des 20S Proteasoms führte zur Verdrängung des Lid-Subkomplexes und zu einer Zunahme des CSN (Abb. 14).

Insgesamt deuten die vorliegenden Daten auf eine Anlagerung des CSN anstelle des Lid-Subkomplexes an das Base-20S Proteasom hin. Die Assoziation des CSN an das gesamte 26S Proteasom kann, wie bei Peng et al. diskutiert (Peng et al., 2003), nicht ausgeschlossen werden. Dieser Hybrid-Komplex ist zudem mit Cullin-haltigen RING-Ligasen assoziiert (Huang et al., 2005). Weitere Experimente sind notwendig, um detaillierte Aussagen zu den Bedingungen für einen Austausch von CSN und Lid oder die Anlagerung des CSN an das 26S Proteasom treffen zu können.

5.2 DAS CSN - EIN EFFEKTOR DES 26S PROTEASOMS

Die Bindung des CSN als „alternativer Lid“ wirft die Frage nach der funktionellen Bedeutung einer solchen Interaktion auf. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein Einfluss des CSN auf die Aktivität des 26S Proteasoms gezeigt werden. Mit zunehmenden molaren Verhältnissen von CSN zu 26S Proteasom konnte eine Reduktion der Peptidaseaktivität in Anwesenheit von ATP um bis zu 40% bei einem Verhältnis von 20:1 (CSN : 26S Proteasom) gezeigt werden (Abb. 15). Das verwendete fluorogene Peptid ist ein Substrat für die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms, wird jedoch auch alleine vom 20S Proteasom ohne Regulator abgebaut. Dass die Reduktion der Aktivität nur bei Anwesenheit von ATP gemessen wurde, lässt auf eine Beeinflussung des 26S Proteasoms schließen.

Die Ergebnisse dieser Experimente geben einen ersten Hinweis auf einen Effekt des CSN auf die Aktivität des Proteasoms. Die Bindung des CSN an die ATPasen des Base-Subkomplexes könnte zu einer Konformationsänderung führen, welche das Eintreten des Substrates ins 20S Proteasom erschwert. Denkbar bleibt weiterhin die Assoziation des CSN an das gesamte 26S Proteasom, wodurch sich die Möglichkeit einer sterischen Hemmung des Substrateintritts zusätzlich zu einer ausgelösten Konformationsänderung ergibt.

Das 26S Proteasom degradiert hauptsächlich polyubiquitinierte Substrate, wobei Ub-Ketten mit vier oder mehr verknüpften Ub erkannt werden (Thrower et al., 2000). Aus diesem Grunde wurden zwei penta-ubiquitinierte Proteine eingesetzt, um den Einfluss des CSN auf die Aktivität des 26S Proteasoms weiter aufzuklären. Bei den Substraten Ub₅-E7 und Ub₅-Muc1 von Annett Helfrich war das Protein jeweils linear am N-Terminus mit der Ub-Kette verknüpft. Für das Papillomavirusprotein E7 ist diese seltene N-terminale Polyubiquitinierung und der Abbau durch das 26S Proteasom beschrieben worden (Reinstein et al., 2000). Bei dem zweiten Substrat handelt es sich um das artifiziell viermal aneinander gereihete Epitop

950-958 des Glycoproteins Mucin1. Für dieses Epitop ist die Generierung durch das Proteasom und die Präsentation als Tumorantigen auf MHC Klasse I auf der Zelloberfläche bekannt (Brossart et al., 1999). Die mehrmalige Verknüpfung des Epitops und lineare Markierung mit der Poly-Ub-Kette erwies sich nach Angaben von Annett Helfrich als geeignet, um als Substrat für das 26S Proteasom zu fungieren.

Der Einsatz von Ub₅-E7 führte weder zur erwarteten Abspaltung des Ub₅ und Proteolyse von E7 durch das 26S Proteasom noch zu einer Deubiquitinierung überhaupt (Abb. 16). Das 26S Proteasom besitzt mit seiner Lid-Untereinheit Rpn11 eine intrinsische Deubiquitinierungsaktivität und zudem mindestens zwei assoziierte DUBs, UCH37 (wahrscheinlich an Rpn12 gebunden) und USP14 (wahrscheinlich an Rpn1 gebunden). Für das Ausbleiben der Spaltung der Poly-Ub-Kette lassen sich mehrere Gründe aufführen:

Nach dem vielstufigen Prozess der Aufreinigung ist es wahrscheinlich, dass die DUBs nicht mehr am 26S Proteasom assoziiert sind. Unklar bleibt, warum Rpn11 mit seiner intrinsischen Aktivität keine Wirkung aufwies. In jedem Fall war der vollständige Lid-Komplex während der Präparation erhalten geblieben. Einen weiteren Grund der mangelnden Spaltung liefert das Substrat selber. Für das HPV E7 wurde die pH-abhängige Konformationsänderung gezeigt, die zur Bildung von Oligomeren zu führen scheint (Alonso et al., 2004). Möglicherweise ist das von den Antikörpern gegen E7 und Ub detektierte Protein nicht das gewünschte Ub₅-E7, sondern hauptsächlich ein Konglomerat aus linearen Ub-E7-Proteinen. Eine solche hochmolekulare Struktur könnte einerseits nach Bindung zu einer Blockierung des 26S Proteasoms führen, andererseits könnte ein Oligomer gar nicht als Substrat erkannt werden. Die Folge wären weder eine Deubiquitinierung noch die Proteolyse durch das Proteasom, wie im Experiment zu beobachten war.

Der Einsatz des artifiziellen zweiten Substrates Ub₅-Muc1 zeigte hingegen den effektiven Abbau der Muc1-Epitope durch das 26S Proteasom bei gleichzeitiger Deubiquitinierung der Poly-Ub-Kette (Abb. 17). Diese Ergebnisse bestätigen, dass in der Präparation des 26S Proteasoms zumindest Rpn11 oder sogar weitere assoziierte DUBs in aktiver Form vorliegen.

Zur Beantwortung der Ausgangsfrage nach einer Beeinflussung der Aktivität des 26S Proteasoms durch das CSN schien folglich nur das zweite Substrat geeignet. Der Einsatz eines 10-fachen molaren Überschusses an CSN verlangsamte die Proteolyse durch das Proteasom nachdrücklich und führte stattdessen zur Generierung von Ub-Muc1 und Spaltprodukten der Ub₄-Kette bis hin zu Mono-Ub (Abb. 17). Im Vergleich zur Kontrolle, in der das CSN alleine

inkubiert wurde, ist kein signifikanter Unterschied zwischen An- oder Abwesenheit des 26S Proteasoms erkennbar. Daraus ergaben sich mehrere Schlussfolgerungen:

Der CSN-Komplex verfügt selber über eine Deubiquitinierungsaktivität. Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls im Experiment mit dem Substrat Ub₅-E7. Das lineare Zwischenprodukt Ub-Muc1 scheint ein schlechteres Substrat sowohl für das 26S Proteasom als auch für das CSN darzustellen, konnte also nur langsam weiter gespalten werden. Denkbar wäre, dass die fehlende Poly-Ub-Kette eine Anlagerung an das 26S Proteasom und somit den weiteren Abbau unwahrscheinlich macht. Von der Arbeitsgruppe von Robert Cohen konnte beim Einsatz von Ub₅-DHFR (Dihydrofolatreduktase) als Substrat für das 26S Proteasom neben der Proteolyse und Bildung von Ub₅ ebenfalls eine Anreicherung von Mono-Ub-DHFR beobachtet werden (Yao and Cohen, 2002). Trotzdem bleibt zu beachten, dass die Spaltung von linearen Ub-Konjugaten durch Rpn11 von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt wurde (Guterman and Glickman, 2004; Yao and Cohen, 2002). Gemäß der Hypothese vom CSN als „alternativem Lid“ würde ein solcher Austausch beider Komplexe zur Freisetzung des Lid führen. Bisher ist unklar, ob der freie Lid-Subkomplex Deubiquitinierungsaktivität aufweist (Guterman and Glickman, 2004; Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002).

Die Anwesenheit des CSN im Experiment inhibiert die Proteolyse des Substrates Ub₅-Muc1 durch das 26S Proteasom. Neben dem Austausch von Lid und CSN könnte auch eine Assoziation des CSN an das gesamte 26S Proteasom die Bindung des Substrates behindern. Damit bestätigen diese Experimente die Aussagen, die mit dem fluorogenen Peptid getroffen wurden. Die Fähigkeit des CSN zur Spaltung von Poly-Ub-Ketten könnte alleine der Grund für die beobachtete Hemmung der Proteolyse darstellen. Ohne Ub-Kette stellen die eingesetzten Proteine keine geeigneten Substrate für das 26S Proteasom dar.

5.3 DAS CSN BESITZT DEUBIQUITINIERUNGSAKTIVITÄT

Eine Deubiquitinierungsaktivität des CSN wurde erstmals auf Grund der Ergebnisse der Elektronenmikroskopie von Barbara Kapelari postuliert. Sie konnte eine Bindung von goldmarkiertem Ub₄ sowohl an das CSN als auch den Lid-Komplex nachweisen (Abb. 18 + (Hetfeld et al., 2005)). Die Bindung von Poly-Ub-Ketten an den Lid-Komplex ist sehr wahrscheinlich auf die Assoziation an Rpn11, die DUB-Untereinheit mit JAMM-Motiv, zurückzuführen (Maytal-Kivity et al., 2002; Verma et al., 2002). Denkbar wäre ebenfalls, dass Ub₄ an das assoziierte DUB UCH37 bindet (Li et al., 2001).

Bei dem CSN-Komplex war eine Bindung von Ub₄ an ein Drittel der Komplexe zu sehen und deutete auf die Anwesenheit eines oder mehrerer DUBs hin. Bereits 2001 wurde die Abspaltung von Nedd8 von Cullinen durch das CSN beschrieben (Lyapina et al., 2001) und später dem JAMM-Motiv von CSN5 zugeordnet (Cope et al., 2002). Da Nedd8 die größte Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zum Ub im Vergleich zu allen bisher beschriebenen UBLs aufweist, erschien die Bindung von Ub an CSN5 möglich. Es wurden bereits DUBs beschrieben, die gleichzeitig Ub und Nedd8 abspalten und folglich zuvor binden können (Amerik and Hochstrasser, 2004).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der aufgereinigte CSN-Komplex mit Ub₄ inkubiert, und es konnten alle Spaltprodukte bis hin zum Mono-Ub nachgewiesen werden (Abb. 19). Die Sequenzanalyse aller CSN-Untereinheiten zeigte keine weiteren potentiellen DUB-Motive neben dem JAMM-Motiv von CSN5.

Bestätigt wurde diese Deubiquitinierungsaktivität des CSN von der Gruppe von Yoshihiro Nakatani, die einen E3-Ub-Ligase-Komplex aus Cul4A, Rbx1 und DDB1 identifizierten, der zur Substraterkennung entweder CSA oder DDB2 beinhaltet und bei der DNA-Reparatur beteiligt ist (Groisman et al., 2003). Diese beiden unterschiedlichen Komplexe binden das CSN, welches wie erwartet Nedd8 von Cul4A abspaltet. Gleichzeitig konnte hier eine Abspaltung von Ub-Ketten von Cul4A gezeigt werden. Eine Mutation im JAMM-Motiv führte zur Deubiquitinierung nur bis zur Stufe von Mono-Ub-Cul4A. Aufgrund dieser Ergebnisse postulierten sie die Anwesenheit von mindestens zwei unterschiedlichen Deubiquitinierungsaktivitäten am CSN: Ein DUB, welches Poly-Ub-Ketten spaltet, und CSN5, welches die Spaltung von Mono-Ub katalysiert.

Die vollständige Spaltung von Ub₄ durch den CSN-Komplex aus Erythrozyten deutete folglich ebenfalls auf die Anwesenheit eines assoziierten DUB in der Präparation hin, wenn CSN5 tatsächlich nur mono-ubiquitinierte Substrate zu spalten vermag.

Zur Unterscheidung der zwei DUB-Aktivitäten wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt. Der Metalloproteaseinhibitor OPT sollte die intrinsische Aktivität hemmen und der Cysteinproteaseinhibitor NEM die Aktivität von zusätzlichen DUBs. Überraschenderweise zeigte sich sowohl beim Einsatz von OPT als auch bei NEM eine vollständige Hemmung der Deubiquitinierungsaktivität des aufgereinigten CSN-Komplexes (Abb. 20). Die Hemmung mit OPT könnte bedeuten, dass auch zusätzliche assoziierte DUBs zu den Metalloproteasen

gehören. Demgegenüber stand die Hemmung durch den Cysteinproteaseinhibitor, die in diesem Falle unerwartet war.

Dieser Widerspruch ließ sich nach der Inkubation des Komplexes mit den Hemmstoffen und anschließendem Nachweis auf einem nativen Gel klären. Es konnte erstmalig ein Einfluss von NEM auf die Komplexintegrität des CSN gezeigt werden. Nach einer 15-minütigen Inkubation war bereits der beginnende Zerfall des CSN zu beobachten, welcher nach 60 min vollständig abgeschlossen war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im CSN-Komplex Cysteinreste existieren, die für die Stabilität des Komplexes notwendig sind. Bisher sind keine konservierten Disulfidbrücken beim CSN oder Lid beschrieben worden.

Für das 26S Proteasom wurde ebenfalls eine Hemmung durch NEM beschrieben, die auf einen Einfluss auf die ATPasen Rpt4 und Rpt6 (Russell et al., 2001) sowie auf das 20S Proteasom (Dick et al., 1992) zurückzuführen ist. Der Lid-Subkomplex alleine wurde bisher nicht untersucht. Es bleibt in künftigen Experimenten zu klären, ob diese Wirkung von NEM in dem paralogen Komplex ebenfalls auftritt.

Der Einfluss von NEM auf die Aktivität von CSN5 konnte nun durch eine Dissoziation des gesamten Komplexes erklärt werden, da die Untereinheit als Monomer keine Aktivität aufweist (Cope et al., 2002). Diese Experimente belegten zunächst, dass auch die Deubiquitinierungsaktivität das komplexgebundene CSN5 benötigt. Die Identität eines assoziierten DUB blieb jedoch weiterhin unklar.

5.4 USP15 ALS NEUER INTERAKTIONSPARTNER DES CSN

Zur Ermittlung einer möglichen assoziierten Deubiquitinierungsaktivität am CSN wurden massenspektrometrische Untersuchungen der CSN-Präparation durchgeführt, die zur Identifizierung von USP15 führten, einer Cysteinprotease der UBP-Familie (Abb. 23). USP15 kommt in drei Isoformen vor, die sich nur durch kurze Variationen im N-Terminus noch vor dem zweigeteilten aktiven Zentrum unterscheiden (EMBL-Eintrag 1997 von Y. Kimura + (Angelats et al., 2003)). Aufgrund der geringen Sequenzunterschiede zwischen den Enzymvarianten war es bisher nicht möglich zu ermitteln, welche Isoform am CSN gebunden vorliegt. Die Herstellung des rekombinanten Proteins aus einer HeLa cDNA-Bank lieferte die Isoform 2. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem in der CSN-Präparation gefundenen Enzym um eine der beiden anderen Spleißvarianten handelt. Eine erneute Identifizierung mittels Massenspektrometrie wird diese Frage klären.

Erstmals beschrieben wurde die Isoform 2 von USP15 bereits 1999 als Paralog zu UNP (heute: USP4) (Baker et al., 1999). Bei USP4 sind ebenfalls zwei Spleißvarianten bekannt, die im Sequenzvergleich an derselben Stelle wie bei USP15 zusätzliche 47 AS aufweisen oder nicht. USP15 ist auf Chromosom 12q14 lokalisiert und spaltet die linearen Substrate Ub-R- β -Gal und Ub-P¹-GST. Damit ist USP15 neben USP4 eines der wenigen UBPs, das eine Spaltung zwischen Glycin und Prolin katalysieren kann. Das Protein enthält wie auch USP4 die Sequenzelemente CR1 und CR2, für welche bei USP4 eine Assoziation an das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein Rb gezeigt werden konnte (Blanchette et al., 2001; Defeo-Jones et al., 1991). Aus Sequenzvergleichen geht hervor, dass das Ortholog von USP15 in *S. cerevisiae* Ubp12p ist und im humanen System die Paralogen USP4 und USP11 vorkommen (Angelats et al., 2003).

Um möglichst alle Isoformen des Enzyms detektieren zu können, wurde ein Antikörper gegen den C-Terminus des USP15 generiert, der in allen Varianten identisch ist. Mit diesem konnte die Co-Elution des Enzyms mit dem CSN-Komplex während der gesamten Aufreinigung aus humanen Erythrozyten nachgewiesen werden (Abb. 24). In den ersten zwei Schritten der Präparation wurden vom Antikörper zwei Proteinbanden detektiert, bei denen es sich um die beschriebenen Spleißvarianten handeln könnte. Möglich wäre ebenfalls eine posttranslationale Modifizierung des Enzyms z.B. durch Phosphorylierung. Da es sich bei dem C-Terminus von USP15 um den am höchsten konservierten Bereich in der Gruppe der UBPs handelt, bleibt der Nachweis eines anderen UBP, vielleicht der Paralogen USP4 oder USP11, denkbar.

Die Isoform 2 des USP15 assoziiert direkt an die Untereinheiten CSN5 und CSN7, was ein Far-Westernblot mit den rekombinanten Untereinheiten und dem CSN-Komplex belegte (Abb. 25). Das in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe von Zhou et al. in *S. pombe* identifizierte Ortholog Ubp12p zeigte ebenfalls die Assoziation an verschiedene CSN-Untereinheiten (Zhou et al., 2003). Die durchgeführten Pulldown-Experimente nach Überexpression mehrerer Untereinheiten ließen jedoch keinen Schluss auf eine direkte Wechselwirkung mit einzelnen Untereinheiten zu.

Eine Eingrenzung der Bindungsdomäne von USP15 an den CSN-Komplex gelang nur teilweise. Für das N-terminale Fragment USP15 (1-488) konnte eine Assoziation an das CSN im Glyceringradienten gezeigt werden (Abb. 26). Dagegen ließ die Oligomerisierung des C-terminalen Fragment USP15 (724-952) keine eindeutige Aussage bezüglich einer Bindung an den Komplex zu. Der C-Terminus enthält die beiden AS H862 und D879, die im gefalteten

Enzym mit C269 das aktive Zentrum bilden. Somit ist eine Einteilung des USP15 in Domänen schwierig und die beiden gewählten Fragmente lagen wahrscheinlich nicht in ihrer natürlichen Konformation vor. Die bisherigen Experimente sprechen für eine Assoziation des N-Terminus, ohne dabei die Bindung weiterer Bereiche im Enzym ausschließen zu können.

Ergänzend zu den *in vitro*-Daten konnte die Interaktion von murinem USP15 an das CSN *in vivo* nach Flag-Pulldown des CSN-Komplexes aus den Flag-CSN2-B8 Mausfibroblasten gezeigt werden (Daten von Xiaohua Huang, nicht gezeigt). In beiden Spezies sind 98% der Aminosäuren von USP15 identisch (Angelats et al., 2003). Im Experiment wies der USP15-Antikörper nur eine Proteinbande nach. Murines USP15 kommt jedoch wie humanes in zwei Spleißvarianten vor, so dass auch hier keine Zuordnung zu einer Isoform des Enzyms möglich war.

Zur weiteren Charakterisierung von USP15 wurde untersucht, ob CSN-assoziierte Kinasen einen Einfluss auf USP15 zeigen. In unserer Arbeitsgruppe konnten die zwei Kinasen CK2 und PKD identifiziert werden (Uhle et al., 2003), die in der CSN-Präparation co-purifizieren. Diese Kinasen phosphorylieren die CSN-Untereinheiten CSN2 und CSN7 sowie weitere assoziierte Proteine, wie c-Jun und p53.

In einem *in-vitro*-Assay konnte eine Phosphorylierung des C-terminalen Bereichs von USP15-Isoform2 durch die assoziierte CK2 gezeigt werden. Sehr geringe oder keine Phosphorylierung wurde im N-terminalen Fragment bis AS 488 gefunden. Die Phosphorylierung liefert eine mögliche Erklärung für die beobachtete Doppelbande in der CSN-Präparation, die mit dem USP15-Antikörper nachgewiesen wurde (Abb. 24). Die Phosphorylierungsbande mit der CK2 war selbst bei kurzer Belichtung so stark, dass die Höhe der Bande im Gel nicht genau zugeordnet werden konnte, eine leichte Verschiebung aufgrund zusätzlicher negativer Ladung durch Phosphorylierung also denkbar scheint. Da die Konsensussequenz der CK2-Phosphorylierung bekannt ist (Meggio et al., 1994), wurde die Sequenz von USP15 (724-952) auf mögliche Bindungsstellen der CK2 hin untersucht. In der Sequenz wurden vier potentielle Motive identifiziert und das S932 einer möglichen Phosphorylierungsstelle zu Alanin mutiert. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Phosphorylierung, so dass diese Position keine wichtige Phosphorylierungsstelle sein konnte. In zukünftigen Experimenten bleibt zu klären, an welchen Positionen USP15 phosphoryliert wird.

Für Substrate, die durch die am CSN assoziierten Kinasen phosphoryliert werden, konnte ein Einfluss auf deren Stabilität gezeigt werden (Bech-Otschir et al., 2001; Uhle et al., 2003). Eine solche funktionale Bedeutung der gefundenen Phosphorylierung von USP15 durch die CK2 wurde mit dem Kinaseinhibitor Curcumin untersucht. Für Curcumin wurde bereits ein Einfluss auf zelluläre Ub-Konjugate gezeigt. Wie in Abb. 29 zu sehen ist, führte die Inhibition der Phosphorylierung von USP15 durch Curcumin zur Bildung von hochmolekularen USP15-Spezies, bei denen es sich wahrscheinlich um Ub-Konjugate handelt. Folglich scheint die Assoziation des USP15 an das CSN zur Phosphorylierung durch die assoziierten Kinasen zu führen und damit eine Stabilisierung des Enzyms zu bewirken.

Bisher wurde nur für den Tumorsuppressor CYLD (cylindromatosis protein), ein DUB der UCH-Familie, eine Regulation durch Phosphorylierung nachgewiesen (Reiley et al., 2005). Diese Phosphorylierung durch IKK γ (I κ B kinase γ) an einer Serin-reichen Sequenz von CYLD führt zur Inaktivierung des Enzyms, so dass das Substrat Traf-2 ubiquitiniert werden kann.

Eine Ubiquitinierung anderer DUBs konnte bereits für DUB-1a (Baek et al., 2004) und USP36 (Kim et al., 2005) gezeigt werden. Bei DUB-1a wurde spekuliert, dass der Ubiquitinierung eine Phosphorylierung vorausgeht. Es konnte jedoch weder die Kinase noch die Phosphorylierungsstelle am Enzym identifiziert werden. Gezeigt wurde lediglich, dass es sich nicht um eine Modifizierung eines Tyrosin-Restes handelt. USP36 enthält in seiner Sequenz ein PEST-Motiv (Rogers et al., 1986), für welches ein Zusammenhang mit dem Abbau durch das UPS bekannt ist (Rechsteiner and Rogers, 1996; Spencer et al., 2004). Eine Regulation des Abbaus durch Phosphorylierung konnte bereits bei mehreren PEST-Motiv-enthaltenden Proteinen gezeigt werden (Lin et al., 1996; Shen et al., 2001).

Insgesamt scheint durch die Phosphorylierung eine Regulation von USP15 vorzuliegen, die wahrscheinlich den Abbau durch das 26S Proteasom nach Polyubiquitinierung verhindert. Ob die Phosphorylierung die Bindung an den CSN-Komplex beeinflusst, konnte noch nicht geklärt werden. Des Regulationsmechanismus der Phosphorylierung und/oder Ubiquitinierung scheinen sich auch andere DUBs zu bedienen. Interessant wäre, ob sich eine PEST-ähnliche Domäne im C-terminalen Bereich von USP15 finden ließe und sich so eine Parallele zu USP36 ergäbe.

5.5 IDENTIFIZIERUNG EINES FÜR DIE SPALTUNG VON UB-KETTEN ESSENTIELLEN ZINK-FINGERS IN USP15

Die Interaktion des CSN mit dem DUB USP15 liefert eine weitere Erklärung für die beobachtete Bindung von Ub₄ an den Komplex in der Elektronenmikroskopie. Im aktiven Zustand muss USP15 zunächst Poly-Ub-Ketten binden, bevor die Spaltung erfolgen kann. Allerdings gehört USP15 zu den Cysteinproteasen, sollte folglich mit NEM nicht aber mit dem Metalloproteaseinhibitor OPT hemmbar sein. Diese Tatsache stand zunächst im Widerspruch zu den Ergebnissen der Deubiquitinierung durch den aufgereinigten CSN-Komplex.

Der Sequenzvergleich der Isoform 2 von USP15 mit anderen UBPs führte zur Identifizierung eines neuen Motivs innerhalb des großen Sequenzeinschubs zwischen der Cys- und His-Box mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums. Von Hartmut Scheel wurden alle 58 bis heute bekannten humanen USPs verglichen. Er konnte eine Gruppe innerhalb dieser USPs identifizieren, die vier paarweise angeordnete Cysteine aufweisen. Diese könnten ein Zn²⁺-Ion koordinieren und so einen Zinkfinger ausbilden. Den restlichen USPs fehlt eines oder mehrere dieser Cysteine, so dass keine Metallionen gebunden werden können. Zu dieser letztgenannten Gruppe gehört USP7/HAUSP und sein Ortholog in Hefe Ubp15. Im Jahr 2004 wurde für USP7 ein Strukturelement beschrieben, welches einem Zn-Finger ähnelt (Krishna and Grishin, 2004). Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu einem Zn-Finger enthält USP7 keine Zn-bindenden Aminosäuren an den entsprechenden Positionen, bildet also mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen Zn-Finger aus.

Es ist auffällig, dass die DUBs der USP15-Gruppe eine über 250 AS große Insertion zwischen den zwei CxxC-Diaden aufweisen. Ein Metallion könnte zur Stabilisierung oder Positionierung dieser insertierten Domäne dienen. Diese Idee wird von der Beobachtung unterstützt, dass die Zn-bindenden Seitenketten in allen USPs mit großem Sequenzeinschub konserviert sind, während die USP7-ähnlichen DUBs diese Insertion nicht aufweisen.

Um die Bedeutung des potentiellen Zn-Fingers in USP15 zu untersuchen, wurde das C783 zu Alanin mutiert, was laut Voraussage zur Unterbindung der vermuteten Metallbindung ausreichen sollte. Der Wildtyp von USP15-Isoform 2 zeigte wie erwartet eine Spaltung sowohl von linearem Ub-GFP als auch von verzweigten Ub-Ketten, die durch den Cysteininhibitor NEM gehemmt wurde. Anders verhielt es sich beim Einsatz des Metalloproteaseinhibitors OPT, der am CSN-Komplex die vollständige Hemmung zeigt

hatte. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass OPT die Spaltung von verzweigten Poly-Ub-Ketten durch USP15 verhinderte, während die Deubiquitinierung von linearen Ub-Konstrukten unbeeinflusst blieb (Abb. 32).

Diese Ergebnisse bekräftigten die Spekulation, dass eine Metall-bindende Domäne innerhalb von USP15 an dem Abbau von Isopeptidbindungen beteiligt war. Die Sequenzanalysen von Hartmut Scheel deuteten auf einen Zinkfinger hin. Der Einsatz der Mutante ohne funktionsfähige Metall-bindende Domäne in den Deubiquitinierungsassays entsprach dann genau den Erwartungen. Kein Unterschied zeigte sich in der Spaltung und Hemmbarkeit bei Ub-GFP als Substrat. Dagegen war der Abbau der Poly-Ub-Ketten vollständig unterbunden. Ergänzend konnte durch einen Pulldown gezeigt werden, dass ohne potentiellen Zn-Finger die Mutante die Fähigkeit zur Bindung von Ub₄-Ketten verloren hat (Abb. 34).

Das Zn-Finger-Motiv spielt somit eine essentielle Rolle bei der Bindung und scheint notwendig für die Spaltung von Poly-Ub-Ketten zu sein. Die Bindung von Poly-Ub-Ketten durch einen Zn-Finger wurde bereits mehrmals gezeigt. Die Ub-bindende Aktivität der NZF (Npl4-Zn-finger)-Familie wurde erstmalig für das Protein Npl4 (nuclear protein localization 4), welches zusammen mit Ufd1 (Ub fusion degradation 1) einen Adaptor Komplex für die AAA ATPase p97/Cdc48 bildet, beschrieben (Meyer et al., 2002). Zu den NZF-Proteinen gehören ebenfalls die E3 Ligase Mdm2 sowie TAB2 und TAB3, Adaptorproteine des zur Aktivierung von NFκB führenden Kinasekomplexes mit TAK1. Für die beiden letztgenannten konnte die bevorzugte Bindung von K63-Ub-Ketten mit dem konservierten Zn-Finger gezeigt werden (Kanayama et al., 2004).

Bei USP5/Isopeptidase T wurde ebenfalls eine Abhängigkeit der Aktivität von Zn nachgewiesen (Gabriel et al., 2002). Anders als USP15 enthalten USP5 und zwölf weitere UBPs eine sogenannte PAZ (poly-Ub associated zinc finger)-Domäne (Dissertation von Hartmut Scheel). Diese erstmalig in HDAC 6 (Histone deacetylase 6) beschriebene Domäne bindet Poly-Ub-Ketten (Hook et al., 2002). Ein Zn-Finger als Ub-Bindungsstelle ist auch bei den RING E3-Ligasen im aktiven Zentrum vorhanden.

Ob der Zn-Finger gleichzeitig die Substratspezifität bestimmt, werden zukünftige Experimente zeigen. Zu berücksichtigen bleibt, dass USP7 ohne CxxC-Diaden trotzdem Poly-Ub-Ketten spalten kann (Canning et al., 2004). Demzufolge ist die Metallbindung keine Voraussetzung für die Spaltung von Isopeptidbindungen durch diese Enzymgruppe. Andererseits konnte für das DUB Cezanne (cellular zinc finger NFκB) der Otubain-Gruppe

gezeigt werden, dass der C-Terminus für die Erkennung von Poly-Ub-Ketten wichtig ist. In diesem Bereich befindet sich ein Zn-Finger, der ebenfalls eine Rolle spielen könnte (Evans et al., 2003).

Damit scheint der Zn-Finger in der identifizierten USP-Gruppe eine weitere regulatorische Domäne darzustellen. Denkbar ist, dass diese nur Struktur-gebend wirkt, also nicht auf das aktive Zentrum direkt, sondern vielmehr auf die Substratbindung Einfluss nimmt. Zusätzlich könnten noch weitere, möglicherweise Substrat-spezifische Bindungsdomänen in der großen Insertion zwischen den Cystein-Diaden liegen, die bisher unentdeckt sind.

In den Experimenten wurde gleichzeitig die Wirkung des Kinaseinhibitors Curcumin auf USP15 untersucht. Dabei zeigte sich beim rekombinanten USP15 ebenso wie beim CSN keine Hemmung der Deubiquitinierungsaktivität durch den Inhibitor. Dieses Ergebnis stand nicht im Einklang mit früheren Ergebnissen, bei denen Curcumin als ein Inhibitor von Isopeptidasen identifiziert wurde (Mullally and Fitzpatrick, 2002). Da in der genannten Studie die Aktivität der DUBs in Zellen bestimmt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Hemmung statt um einen direkten um einen indirekten Effekt gehandelt haben könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Curcumin zur Bildung von hochmolekularen USP15-Konjugaten führt, bei denen es sich wahrscheinlich um Poly-Ub-Ketten handelt. Beeinflusst Curcumin also durch Inhibition relevanter Kinasen die zur Proteinstabilität notwendige Phosphorylierung von UBPs, wäre die abnehmende Deubiquitinierungsaktivität durch den Abbau der Enzyme zu erklären und nicht durch eine Aktivitätshemmung dieser.

5.6 DIE ROLLE DES CSN IM UBIQUITIN-26S PROTEASOMSYSTEM

Mit der Identifizierung von USP15 ist eine weitere Möglichkeit des CSN zur Regulation des UPS aufgedeckt worden. Der scheinbare Widerspruch zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Daten, die einerseits von einer Aktivierung (Cope et al., 2002; Schwechheimer et al., 2001) und andererseits von einer Hemmung (Lyapina et al., 2001) von Cullin-haltigen E3-Ligasen durch das CSN sprechen, konnte durch das assoziierte DUB erklärt werden.

Während aufgereinigte E3-Ligasen aus Wildtypzellen inaktiv waren, zeigten Ub-Ligasen aus CSN- oder Ubp12p-Mutanten eine starke Ubiquitinierungsaktivität (Groisman et al., 2003; Zhou et al., 2003). In *S. pombe* verhindert Ubp12p durch seine Deubiquitinierungsaktivität die

Autoubiquitinierung des F-Box-Proteins Pop1p und führt so zu einer Stabilisierung des Proteins (Zhou et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass das assoziierte USP15 zusätzlich eine Stabilisierung der RING Ub-Ligase Rbx1 bewirkt. Die Cotransfektion von USP15 und Rbx1 in HeLa Zellen führte zu einer Stabilisierung der E3-Ligase nach Cycloheximidbehandlung (Abb. 35). Ebenso wie die Culline und F-Box-Proteine unterliegt auch Rbx1 der Autoubiquitinierung, die zum Abbau durch das Ub-System führt (Ohta et al., 1999) (Abb. 36a). Ausgehend von den Zellkulturexperimenten scheint USP15 diese Autoubiquitinierung umzukehren und somit Rbx1 vor dem Abbau zu schützen. Die Mutante USP15C783A, bei der ein möglicher Zn-Finger nicht ausgebildet werden kann, bietet keinen Schutz mehr für Rbx1. Somit scheint die Abspaltung der Poly-Ub-Kette notwendig für die Stabilisierung von Rbx1 und F-Box-Proteinen zu sein. Für USP7/HAUSP konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es die E3-Ligase ICP0 vor der Autoubiquitinierung und dem Abbau schützt (Canning et al., 2004).

Das CSN mit assoziiertem USP15 könnte damit als eine Plattform zur Reassemblierung für Cullin-haltige E3 Ligasen dienen (Abb. 36). Die neddylierten CRLs binden gleichzeitig ein ubiquitiniertes E2 und mit ihrem Substrat-bindenden Rezeptor das Zielprotein, welches in mehreren Zyklen poly-ubiquitiniert wird. Die Bindung des CSN an Cullin führt zur Deneddylierung durch CSN5 und die Bindung des E2 an Cullin wird aufgehoben (Kawakami et al., 2001). Es kommt zur Abspaltung von Adaptor und Rezeptor, so dass sich nach erneuter Neddylierung durch Ubc12 ein neuer E3-Ligasekomplex formieren kann. In diesem Zyklus verhindert USP15 die Autoubiquitinierung der Komponenten, die sonst zum Abbau der E3 Ligase führen würde. Zusätzlich könnte durch eine Phosphorylierung der am CSN assoziierten Kinasen USP15 selbst während der Reassemblierung der CRL stabilisiert werden (Uhle et al., 2003).

Zumindest beim SCF-Komplex wird der Mechanismus durch CAND1 noch komplizierter. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das CSN und CAND1 dieselbe Bindungsstelle am Cull1 besetzen und eine gleichzeitige Bindung sich deshalb ausschließt (Min et al., 2005). Noch sind die Daten aber nicht eindeutig und es bleibt in zukünftigen Experimenten der Zusammenhang zwischen CSN und *De-novo*-Assemblierung von Cullin-haltigen E3-Ligasen zu klären.

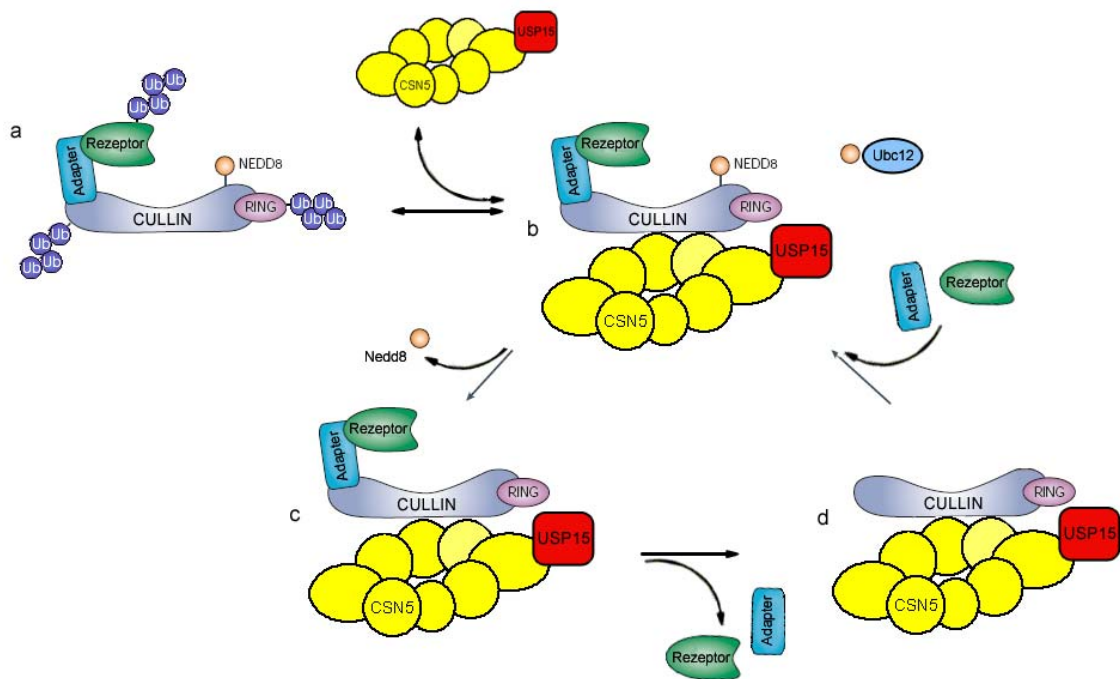


Abb. 36: Einfluss von USP15 auf die Stabilität von CRLs

(a) CRLs bestehend aus Substrat-bindendem Rezeptor, neddyltiertem Cullin und RING-Ligase können nach Autoubiquitinierung vom Proteasom degradiert werden. (b) Nach der Bindung des CSN an den CRLs verhindert das assoziierte USP15 diese Autoubiquitinierung. (c) CSN5 katalysiert die Abspaltung von Nedd8 vom Cullin. (d) Adaptor und Substratrezeptor lösen sich z.B. durch Verdrängung durch CAND1 vom Komplex. Nach Neddylierung des Cullins durch Ubc12 und Bindung eines neuen Rezeptors wird ein weiteres Substrat ubiquitiniert.

Doch welche Rolle spielt das USP15 im Zusammenspiel zwischen CSN und 26S Proteasom? In Pflanzen- und humanen Zellen konnten Superkomplexe aus dem CSN, dem 26S Proteasom und Cullin-haltigen E3 Ligasen identifiziert und charakterisiert werden (Huang et al., 2005; Peng et al., 2003). Diese Superkomplexe könnten Degradationsmaschinen darstellen, die den Abbau von Substraten von der Ub-Markierung bis hin zur Spaltung in Peptide katalysieren (Abb. 37). Der Austausch vom Lid gegen das CSN könnte zur Proteolyse von unterschiedlichen Proteinen führen.

Zu bedenken bleibt, dass bisher eine Vielzahl von E3-Ligasen mit dem CSN assoziiert gefunden wurde, aber nur wenige direkt an das 19S Proteasom binden. Bisher wurden eine direkte Assoziation bei Ubr1p, einer RING-E3-Ligase, und bei der HECT-E3 Ligase Ufd4p an Untereinheiten des Base-Subkomplexes nachgewiesen (Xie and Varshavsky, 2000). Die Vermittlung der Bindung zwischen E3-Ligasen und dem 26S Proteasom könnte somit eine wichtige Funktion des CSN darstellen.

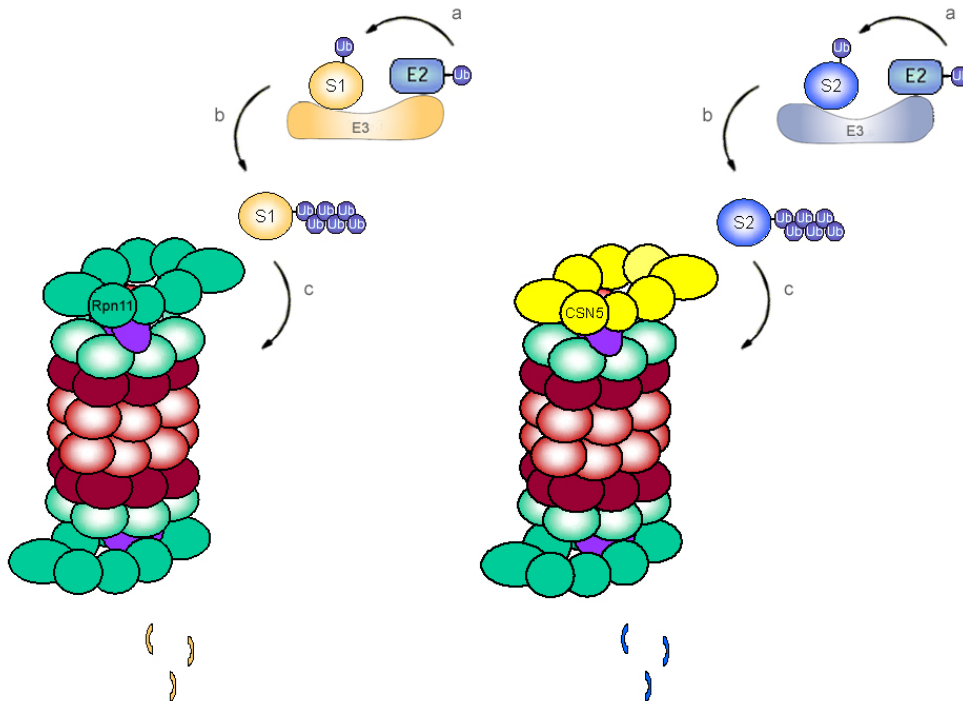


Abb. 37: Modell zur Rolle des CSN als "alternativer Lid"

(a) Ub wird vom E2 auf verschiedene Substrate (S1 oder S2) nach deren Bindung an ihrer spezifischen E3-Ligase übertragen. (b) Mehrere Zyklen liefern poly-ubiquitinierte Substrate. (c) Lid oder CSN gebunden an das Proteasom führen zum Abbau von unterschiedlichen Substraten.

In diesen Komplexen sind zwei Funktionen für das USP15 denkbar. Zum einen könnte es durch die Nähe zum 26S Proteasom dieses frei von Poly-Ub-Ketten halten, um so den effizienten Ablauf der Proteolyse zu gewährleisten. Zum anderen schützt USP15 den Superkomplex an sich, in dem es den Ub-abhängigen Abbau seiner Komponenten verhindert. Während der Neugruppierung der E3-Ligase am CSN wäre eine zeitweise Hemmung der Aktivität des 26S Proteasoms denkbar, wie sie in Anwesenheit vom CSN beobachtet werden konnte.

Die physiologische Bedeutung der Anlagerung des CSN anstelle des Lid wird durch zukünftige Experimente geklärt werden. Dass dem CSN-Komplex eine wichtige regulatorische Rolle im UPS durch seine intrinsischen wie assoziierten Aktivitäten zukommt, konnte hier durch die Identifizierung von USP15 erneut gezeigt werden. Die zukünftige Erforschung des CSN wird helfen, die Rolle dieses Komplexes in der Zelle besser zu verstehen.

5.7 AUSBLICK

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich weitere Fragestellungen, deren Beantwortung das Zusammenspiel zwischen 26S Proteasom, dem CSN und den Cullin-RING-Ligasen besser erklären könnten. Unter welchen Bedingungen kommt es zur Bildung der Superkomplexe mit oder ohne Austausch von Lid und CSN am Proteasom? Sind extrazelluläre Signale ein Auslöser? Durch die Applikation geeigneter Signalstoffe könnten spezifische Signalkaskaden in Zellen eingeschaltet werden und der Einfluss auf die Superkomplexe bestimmt werden. Hierzu bietet der Flag-Pulldown des CSN aus den B8-Mausfibroblasten ein geeignetes Werkzeug, Unterschiede in der Stabilität der Superkomplexe zu bestimmen. Ergänzend könnten die CRLs und/oder 26S Proteasome mit markierten Untereinheiten versehen und so ebenfalls aus Zellen eluiert und untersucht werden.

Die Deubiquitinierungsaktivität des CSN-Komplexes sollte weiter charakterisiert werden. Denkbar wäre, dass noch andere DUBs am CSN assoziiert sind, die über Massenspektrometrie identifiziert werden könnten. Zu klären bleibt, welchen Anteil CSN5 an der DUB-Aktivität des CSN einnimmt. Diese Frage konnte mit den verwendeten Hemmstoffen nicht geklärt werden. Der Austausch von CSN5 im Komplex gegen eine katalytisch inaktive Mutante wäre eine Möglichkeit.

Darüber hinaus sollte die Bedeutung der Phosphorylierung von USP15 weiter aufgeklärt werden. Eine Identifizierung der genauen Phosphorylierungsstellen wäre z.B. durch Massenspektrometrie nach radioaktiver Markierung des Proteins denkbar. Ob die Phosphorylierung eine Voraussetzung für die Assoziation mit dem CSN-Komplex ist, ließe sich in Glyceringradienten nach Inkubation verschiedener Mutanten oder mit Hemmstoffen klären.

Zur Bestätigung der essentiellen Bedeutung des identifizierten Zn-Fingers in USP15 für die Bindung von Ub-Ketten könnten zum einen andere Vertreter der USP15-Gruppe charakterisiert werden. Zum anderen wäre ein Austausch des Ub-bindenden Zn-Fingers durch ein anderes Ub-bindendes Motiv interessant. Ebenfalls wichtig bleibt die Frage, wie die Mitglieder der USP7-Gruppe ohne Zn-Finger Poly-Ub-Ketten erkennen. Sequenzanalysen könnten in dieser Gruppe zur Identifizierung eines noch unbekanntes Ub-bindenden Motivs führen. Arbeiten in diese Richtung würden noch tiefere Einblicke in die Funktionen der UBPs im UPS liefern.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alonso, L. G.; Garcia-Alai, M. M.; Smal, C.; Centeno, J. M.; Iacono, R.; Castano, E.; Gualfetti, P. and de Prat-Gay, G. (2004): The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers, *Biochemistry* 43 pp. 3310-7.
- Amerik, A. Y. and Hochstrasser, M. (2004): Mechanism and function of deubiquitinating enzymes, *Biochim Biophys Acta* 1695 [1-3], pp. 189-207.
- Amerik, A. Y.; Li, S. J. and Hochstrasser, M. (2000): Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biol Chem* 381 [9-10], pp. 981-92.
- Amerik, AYu; Swaminathan, S.; Krantz, B. A.; Wilkinson, K. D. and Hochstrasser, M. (1997): In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome, *Embo J* 16 [16], pp. 4826-38.
- Andersen, M. W.; Ballal, N. R.; Goldknopf, I. L. and Busch, H. (1981): Protein A24 lyase activity in nucleoli of thioacetamide-treated rat liver releases histone 2A and ubiquitin from conjugated protein A24, *Biochemistry* 20 [5], pp. 1100-4.
- Angelats, C.; Wang, X. W.; Jermini, L. S.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A. and Baker, R. T. (2003): Isolation and characterization of the mouse ubiquitin-specific protease Usp15, *Mamm Genome* 14 [1], pp. 31-46.
- Aravind, L. and Koonin, E. V. (2000): The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination, *Curr Biol* 10 [4], pp. R132-4.
- Aravind, L. and Ponting, C. P. (1998): Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation, *Protein Sci* 7 [5], pp. 1250-4.
- Baek, K. H.; Kim, M. S.; Kim, Y. S.; Shin, J. M. and Choi, H. K. (2004): DUB-1A, a novel deubiquitinating enzyme subfamily member, is polyubiquitinated and cytokine-inducible in B-lymphocytes, *J Biol Chem* 279 [4], pp. 2368-76. Epub 2003 Oct 28.
- Baker, R. T.; Wang, X. W.; Woollatt, E.; White, J. A. and Sutherland, G. R. (1999): Identification, functional characterization, and chromosomal localization of USP15, a novel human ubiquitin-specific protease related to the UNP oncoprotein, and a systematic nomenclature for human ubiquitin-specific proteases, *Genomics* 59 [3], pp. 264-74.
- Balakirev, M. Y.; Tcherniuk, S. O.; Jaquinod, M. and Chroboczek, J. (2003): Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway, *EMBO Rep* 4 [5], pp. 517-22.
- Bech-Otschir, D.; Kapelari, B. and Dubiel, W. (2005): The COP9 Signalosome: Its Possible Role in the Ubiquitin System, Mayer, R.J., Ciechanover, A.J., and Rechsteiner, M., *Ubiquitin and the Chemistry of Life* 1 pp. 348-369, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Bech-Otschir, D.; Kraft, R.; Huang, X.; Henklein, P.; Kapelari, B.; Pollmann, C. and Dubiel, W. (2001): COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system, *Embo J* 20 [7], pp. 1630-9.
- Berse, M.; Bounpheng, M.; Huang, X.; Christy, B.; Pollmann, C. and Dubiel, W. (2004): Ubiquitin-dependent degradation of Id1 and Id3 is mediated by the COP9 signalosome, *J Mol Biol* 343 [2], pp. 361-70.

- Blanchette, P.; Gilchrist, C. A.; Baker, R. T. and Gray, D. A. (2001): Association of UNP, a ubiquitin-specific protease, with the pocket proteins pRb, p107 and p130, *Oncogene* 20 [39], pp. 5533-7.
- Borodovsky, A.; Kessler, B. M.; Casagrande, R.; Overkleeft, H. S.; Wilkinson, K. D. and Ploegh, H. L. (2001): A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14, *Embo J* 20 [18], pp. 5187-96.
- Brossart, P.; Heinrich, K. S.; Stuhler, G.; Behnke, L.; Reichardt, V. L.; Stevanovic, S.; Muhm, A.; Rammensee, H. G.; Kanz, L. and Brugger, W. (1999): Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies, *Blood* 93 [12], pp. 4309-17.
- Bylebyl, G. R.; Belichenko, I. and Johnson, E. S. (2003): The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast, *J Biol Chem* 278 [45], pp. 44113-20. Epub 2003 Aug 26.
- Canning, M.; Boutell, C.; Parkinson, J. and Everett, R. D. (2004): A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7, *J Biol Chem* 279 [37], pp. 38160-8. Epub 2004 Jul 6.
- Chamovitz, D. A.; Wei, N.; Osterlund, M. T.; von Arnim, A. G.; Staub, J. M.; Matsui, M. and Deng, X. W. (1996): The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch, *Cell* 86 [1], pp. 115-21.
- Claret, F. X.; Hibi, M.; Dhut, S.; Toda, T. and Karin, M. (1996): A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors, *Nature* 383 [6599], pp. 453-7.
- Cope, G. A. and Deshaies, R. J. (2003): COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases, *Cell* 114 [6], pp. 663-71.
- Cope, G. A.; Suh, G. S.; Aravind, L.; Schwarz, S. E.; Zipursky, S. L.; Koonin, E. V. and Deshaies, R. J. (2002): Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1, *Science* 298 [5593], pp. 608-11.
- Corn, P. G.; McDonald, E. R., 3rd; Herman, J. G. and El-Deiry, W. S. (2003): Tat-binding protein-1, a component of the 26S proteasome, contributes to the E3 ubiquitin ligase function of the von Hippel-Lindau protein, *Nat Genet* 35 [3], pp. 229-37.
- Defeo-Jones, D.; Huang, P. S.; Jones, R. E.; Haskell, K. M.; Vuocolo, G. A.; Hanobik, M. G.; Huber, H. E. and Oliff, A. (1991): Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product, *Nature* 352 [6332], pp. 251-4.
- Deng, X. W.; Dubiel, W.; Wei, N.; Hofmann, K.; Mundt, K.; Colicelli, J.; Kato, J.; Naumann, M.; Segal, D.; Seeger, M.; Carr, A.; Glickman, M. and Chamovitz, D. A. (2000): Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development, *Trends Genet* 16 [5], pp. 202-3.
- Dharmasiri, S.; Dharmasiri, N.; Hellmann, H. and Estelle, M. (2003): The RUB/Nedd8 conjugation pathway is required for early development in Arabidopsis, *Embo J* 22 [8], pp. 1762-70.
- Dias, D. C.; Dolios, G.; Wang, R. and Pan, Z. Q. (2002): CUL7: A DOC domain-containing cullin selectively binds Skp1.Fbx29 to form an SCF-like complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [26], pp. 16601-6. Epub 2002 Dec 12.

- Dick, L. R.; Moomaw, C. R.; Pramanik, B. C.; DeMartino, G. N. and Slaughter, C. A. (1992): Identification and localization of a cysteinyl residue critical for the trypsin-like catalytic activity of the proteasome, *Biochemistry* 31 [32], pp. 7347-55.
- Donaldson, T. D.; Noureddine, M. A.; Reynolds, P. J.; Bradford, W.; Duronio, R. J. and Thacker, S. A. (2004): Targeted disruption of *Drosophila* Roc1b reveals functional differences in the Roc subunit of Cullin-dependent E3 ubiquitin ligases
- Drosophila* Roc1a encodes a RING-H2 protein with a unique function in processing the Hh signal transducer Ci by the SCF E3 ubiquitin ligase, *Mol Biol Cell* 15 [11], pp. 4892-903. Epub 2004 Aug 25.
- Elsasser, S.; Gali, R. R.; Schwickart, M.; Larsen, C. N.; Leggett, D. S.; Muller, B.; Feng, M. T.; Tubing, F.; Dittmar, G. A. and Finley, D. (2002): Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains, *Nat Cell Biol* 4 [9], pp. 725-30.
- Evans, P. C.; Smith, T. S.; Lai, M. J.; Williams, M. G.; Burke, D. F.; Heyninck, K.; Kreike, M. M.; Beyaert, R.; Blundell, T. L. and Kilshaw, P. J. (2003): A novel type of deubiquitinating enzyme, *J Biol Chem* 278 [25], pp. 23180-6. Epub 2003 Apr 7.
- Eytan, E.; Armon, T.; Heller, H.; Beck, S. and Hershko, A. (1993): Ubiquitin C-terminal hydrolase activity associated with the 26 S protease complex, *J Biol Chem* 268 [7], pp. 4668-74.
- Ferrell, K.; Wilkinson, C. R.; Dubiel, W. and Gordon, C. (2000): Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem, *Trends Biochem Sci* 25 [2], pp. 83-8.
- Freilich, S.; Oron, E.; Kapp, Y.; Nevo-Caspi, Y.; Orgad, S.; Segal, D. and Chamovitz, D. A. (1999): The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*, *Curr Biol* 9 [20], pp. 1187-90.
- Fu, H.; Reis, N.; Lee, Y.; Glickman, M. H. and Vierstra, R. D. (2001): Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome, *Embo J* 20 [24], pp. 7096-107.
- Fukumoto, A.; Tomoda, K.; Kubota, M.; Kato, J. Y. and Yoneda-Kato, N. (2005): Small Jab1-containing subcomplex is regulated in an anchorage- and cell cycle-dependent manner, which is abrogated by ras transformation, *FEBS Lett* 579 [5], pp. 1047-54.
- Gabriel, J. M.; Lacombe, T.; Carobbio, S.; Paquet, N.; Bisig, R.; Cox, J. A. and Jaton, J. C. (2002): Zinc is required for the catalytic activity of the human deubiquitinating isopeptidase T, *Biochemistry* 41 [46], pp. 13755-66.
- Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev* 82 [2], pp. 373-428.
- Glickman, M. H.; Rubin, D. M.; Coux, O.; Wefes, I.; Pfeifer, G.; Cjeka, Z.; Baumeister, W.; Fried, V. A. and Finley, D. (1998): A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3, *Cell* 94 [5], pp. 615-23.
- 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, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [17], pp. 8970-5.

- Groisman, R.; Polanowska, J.; Kuraoka, I.; Sawada, J.; Saijo, M.; Drapkin, R.; Kisselev, A. F.; Tanaka, K. and Nakatani, Y. (2003): The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage, *Cell* 113 [3], pp. 357-67.
- Groll, M.; Bajorek, M.; Kohler, A.; Moroder, L.; Rubin, D. M.; Huber, R.; Glickman, M. H. and Finley, D. (2000): A gated channel into the proteasome core particle, *Nat Struct Biol* 7 [11], pp. 1062-7.
- 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 [6624], pp. 463-71.
- Guterman, A. and Glickman, M. H. (2004): Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome, *J Biol Chem* 279 [3], pp. 1729-38. Epub 2003 Oct 27.
- Guterman, A. and Glickman, M. H. (2004): Deubiquitinating enzymes are IN/(trinsic to proteasome function), *Curr Protein Pept Sci* 5 [3], pp. 201-11.
- Hadari, T.; Warme, J. V.; Rose, I. A. and Hershko, A. (1992): A ubiquitin C-terminal isopeptidase that acts on polyubiquitin chains. Role in protein degradation, *J Biol Chem* 267 [2], pp. 719-27.
- Hatakeyama, S. and Nakayama, K. I. (2003): U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases, *Biochem Biophys Res Commun* 302 [4], pp. 635-45.
- Henke, W.; Ferrell, K.; Bech-Otschir, D.; Seeger, M.; Schade, R.; Jungblut, P.; Naumann, M. and Dubiel, W. (1999): Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid, *Mol Biol Rep* 26 [1-2], pp. 29-34.
- Hetfeld, B. K.; Helfrich, A.; Kapelari, B.; Scheel, H.; Hofmann, K.; Guterman, A.; Glickman, M.; Schade, R.; Kloetzel, P. M. and Dubiel, W. (2005): The Zinc Finger of the CSN-Associated Deubiquitinating Enzyme USP15 Is Essential to Rescue the E3 Ligase Rbx1, *Curr Biol* 15 [13], pp. 1217-1221.
- Hetfeld, B. K. J.; Bech-Otschir, D. and Dubiel, W. (2005): Purification method of the COP9 signalosome from human erythrocytes, *Methods in Enzymology, "Ubiquitin And Protein Degradation, Part A"* 398 pp. 481-491, Elsevier, Inc., San Diego.
- Hoareau Alves, K.; Bochar, V.; Rety, S. and Jalinot, P. (2002): Association of the mammalian proto-oncogene Int-6 with the three protein complexes eIF3, COP9 signalosome and 26S proteasome, *FEBS Lett* 527 [1-3], pp. 15-21.
- Hofmann, K. and Bucher, P. (1998): The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes, *Trends Biochem Sci* 23 [6], pp. 204-5.
- Holz, H.; Kapelari, B.; Kellermann, J.; Seemuller, E.; Sumegi, M.; Udvardy, A.; Medalia, O.; Sperling, J.; Muller, S. A.; Engel, A. and Baumeister, W. (2000): The regulatory complex of *Drosophila melanogaster* 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme, *J Cell Biol* 150 [1], pp. 119-30.
- Hook, S. S.; Orian, A.; Cowley, S. M. and Eisenman, R. N. (2002): Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [21], pp. 13425-30. Epub 2002 Sep 27.

- Hori, T.; Osaka, F.; Chiba, T.; Miyamoto, C.; Okabayashi, K.; Shimbara, N.; Kato, S. and Tanaka, K. (1999): Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8, *Oncogene* 18 [48], pp. 6829-34.
- Hu, M.; Li, P.; Li, M.; Li, W.; Yao, T.; Wu, J. W.; Gu, W.; Cohen, R. E. and Shi, Y. (2002): Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde, *Cell* 111 [7], pp. 1041-54.
- Huang, X.; Hetfeld, B. K.; Seifert, U.; Kahne, T.; Kloetzel, P. M.; Naumann, M.; Bech-Otschir, D. and Dubiel, W. (2005): Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction, *Febs J* 272 [15], pp. 3909-17.
- Huibregtse, J. M.; Scheffner, M.; Beaudenon, S. and Howley, P. M. (1995): A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [7], pp. 2563-7.
- Huibregtse, J. M.; Scheffner, M. and Howley, P. M. (1993): Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53, *Mol Cell Biol* 13 [2], pp. 775-84.
- Kamitani, T.; Kito, K.; Fukuda-Kamitani, T. and Yeh, E. T. (2001): Targeting of NEDD8 and its conjugates for proteasomal degradation by NUB1, *J Biol Chem* 276 [49], pp. 46655-60. Epub 2001 Oct 3.
- Kanayama, A.; Seth, R. B.; Sun, L.; Ea, C. K.; Hong, M.; Shaito, A.; Chiu, Y. H.; Deng, L. and Chen, Z. J. (2004): TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains, *Mol Cell* 15 [4], pp. 535-48.
- Kapelari, B.; Bech-Otschir, D.; Hegerl, R.; Schade, R.; Dumdey, R. and Dubiel, W. (2000): Electron microscopy and subunit-subunit interaction studies reveal a first architecture of COP9 signalosome, *J Mol Biol* 300 [5], pp. 1169-78.
- Karniol, B.; Malec, P. and Chamovitz, D. A. (1999): Arabidopsis FUSCA5 encodes a novel phosphoprotein that is a component of the COP9 complex, *Plant Cell* 11 [5], pp. 839-48.
- Kawakami, T.; Chiba, T.; Suzuki, T.; Iwai, K.; Yamanaka, K.; Minato, N.; Suzuki, H.; Shimbara, N.; Hidaka, Y.; Osaka, F.; Omata, M. and Tanaka, K. (2001): NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase, *Embo J* 20 [15], pp. 4003-12.
- Kim, M. S.; Kim, Y. K.; Kim, Y. S.; Seong, M.; Choi, J. K. and Baek, K. H. (2005): Deubiquitinating enzyme USP36 contains the PEST motif and is polyubiquitinated, *Biochem Biophys Res Commun* 330 [3], pp. 797-804.
- 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 [5], pp. 635-44.
- Krishna, S. S. and Grishin, N. V. (2004): The finger domain of the human deubiquitinating enzyme HAUSP is a zinc ribbon, *Cell Cycle* 3 [8], pp. 1046-9. Epub 2004 Aug 8.
- Kwok, S. F.; Piekos, B.; Misera, S.; Deng, X. W.; Muller, A. J.; Weiland-Heidecker, U. and Jurgens, G. (1996): A complement of ten essential and pleiotropic arabidopsis COP/DET/FUS genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness

- The FUSCA genes of Arabidopsis: negative regulators of light responses, *Plant Physiol* 110 [3], pp. 731-42.
- Kwok, S. F.; Solano, R.; Tsuge, T.; Chamovitz, D. A.; Ecker, J. R.; Matsui, M. and Deng, X. W. (1998): Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations, *Plant Cell* 10 [11], pp. 1779-90.
- Kwok, S. F.; Staub, J. M. and Deng, X. W. (1999): Characterization of two subunits of Arabidopsis 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex, *J Mol Biol* 285 [1], pp. 85-95.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], pp. 680-5.
- Lam, Y. A.; DeMartino, G. N.; Pickart, C. M. and Cohen, R. E. (1997): Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes, *J Biol Chem* 272 [45], pp. 28438-46.
- 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 [6882], pp. 763-7.
- Lee, J. W.; Choi, H. S.; Gyuris, J.; Brent, R. and Moore, D. D. (1995): Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor, *Mol Endocrinol* 9 [2], pp. 243-54.
- Leggett, D. S.; Hanna, J.; Borodovsky, A.; Crosas, B.; Schmidt, M.; Baker, R. T.; Walz, T.; Ploegh, H. and Finley, D. (2002): Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function, *Mol Cell* 10 [3], pp. 495-507.
- Li, L. and Deng, X. W. (2003): The COP9 signalosome: an alternative lid for the 26S proteasome?, *Trends Cell Biol* 13 [10], pp. 507-9.
- Li, T.; Duan, W.; Yang, H.; Lee, M. K.; Bte Mustafa, F.; Lee, B. H. and Teo, T. S. (2001): Identification of two proteins, S14 and UIP1, that interact with UCH37, *FEBS Lett* 488 [3], pp. 201-5.
- Li, T.; Naqvi, N. I.; Yang, H. and Teo, T. S. (2000): Identification of a 26S proteasome-associated UCH in fission yeast, *Biochem Biophys Res Commun* 272 [1], pp. 270-5.
- Lier, S. and Paululat, A. (2002): The proteasome regulatory particle subunit Rpn6 is required for Drosophila development and interacts physically with signalosome subunit Alien/CSN2, *Gene* 298 [2], pp. 109-19.
- Lin, R.; Beauparlant, P.; Makris, C.; Meloche, S. and Hiscott, J. (1996): Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability, *Mol Cell Biol* 16 [4], pp. 1401-9.
- Lyapina, S.; Cope, G.; Shevchenko, A.; Serino, G.; Tsuge, T.; Zhou, C.; Wolf, D. A.; Wei, N. and Deshaies, R. J. (2001): Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome, *Science* 292 [5520], pp. 1382-5.
- Maytal-Kivity, V.; Piran, R.; Pick, E.; Hofmann, K. and Glickman, M. H. (2002): COP9 signalosome components play a role in the mating pheromone response of *S. cerevisiae*, *EMBO Rep* 3 [12], pp. 1215-21.

- Maytal-Kivity, V.; Reis, N.; Hofmann, K. and Glickman, M. H. (2002): MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function, *BMC Biochem* 3 [1], p. 28.
- McCullough, J.; Clague, M. J. and Urbe, S. (2004): AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase, *J Cell Biol* 166 [4], pp. 487-92.
- Meggio, F.; Marin, O. and Pinna, L. A. (1994): Substrate specificity of protein kinase CK2, *Cell Mol Biol Res* 40 [5-6], pp. 401-9.
- Megumi, Y.; Miyauchi, Y.; Sakurai, H.; Nobeyama, H.; Lorick, K.; Nakamura, E.; Chiba, T.; Tanaka, K.; Weissman, A. M.; Kirisako, T.; Ogawa, O. and Iwai, K. (2005): Multiple roles of Rbx1 in the VBC-Cul2 ubiquitin ligase complex, *Genes Cells* 10 [7], pp. 679-91.
- Mendoza, H. M.; Shen, L. N.; Botting, C.; Lewis, A.; Chen, J.; Ink, B. and Hay, R. T. (2003): NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins, *J Biol Chem* 278 [28], pp. 25637-43.
- Meyer, H. H.; Wang, Y. and Warren, G. (2002): Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4, *Embo J* 21 [21], pp. 5645-52.
- Min, K. W.; Kwon, M. J.; Park, H. S.; Park, Y.; Yoon, S. K. and Yoon, J. B. (2005): CAND1 enhances deneddylation of CUL1 by COP9 signalosome, *Biochem Biophys Res Commun* 334 [3], pp. 867-74.
- Misera, S.; Muller, A. J.; Weiland-Heidecker, U. and Jurgens, G. (1994): The FUSCA genes of Arabidopsis: negative regulators of light responses, *Mol Gen Genet* 244 [3], pp. 242-52.
- Mullally, J. E. and Fitzpatrick, F. A. (2002): Pharmacophore model for novel inhibitors of ubiquitin isopeptidases that induce p53-independent cell death, *Mol Pharmacol* 62 [2], pp. 351-8.
- Mundt, K. E.; Liu, C. and Carr, A. M. (2002): Deletion mutants in COP9/signalosome subunits in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* display distinct phenotypes, *Mol Biol Cell* 13 [2], pp. 493-502.
- Mundt, K. E.; Porte, J.; Murray, J. M.; Brikos, C.; Christensen, P. U.; Caspari, T.; Hagan, I. M.; Millar, J. B.; Simanis, V.; Hofmann, K. and Carr, A. M. (1999): The COP9/signalosome complex is conserved in fission yeast and has a role in S phase, *Curr Biol* 9 [23], pp. 1427-30.
- Naumann, M.; Bech-Otschir, D.; Huang, X.; Ferrell, K. and Dubiel, W. (1999): COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK, *J Biol Chem* 274 [50], pp. 35297-300.
- Nordgard, O.; Dahle, O.; Andersen, T. O. and Gabrielsen, O. S. (2001): JAB1/CSN5 interacts with the GAL4 DNA binding domain: a note of caution about two-hybrid interactions, *Biochimie* 83 [10], pp. 969-71.
- Ohta, T.; Michel, J. J.; Schottelius, A. J. and Xiong, Y. (1999): ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity, *Mol Cell* 3 [4], pp. 535-41.
- Ohta, T.; Michel, J. J. and Xiong, Y. (1999): Association with cullin partners protects ROC proteins from proteasome-dependent degradation, *Oncogene* 18 [48], pp. 6758-66.
- Oron, E.; Mannervik, M.; Rencus, S.; Harari-Steinberg, O.; Neuman-Silberberg, S.; Segal, D. and Chamovitz, D. A. (2002): COP9 signalosome subunits 4 and 5 regulate multiple pleiotropic pathways in *Drosophila melanogaster*, *Development* 129 [19], pp. 4399-409.

- Osaka, F.; Saeki, M.; Katayama, S.; Aida, N.; Toh, E. A.; Kominami, K.; Toda, T.; Suzuki, T.; Chiba, T.; Tanaka, K. and Kato, S. (2000): Covalent modifier NEDD8 is essential for SCF ubiquitin-ligase in fission yeast, *Embo J* 19 [13], pp. 3475-84.
- Pan, Z. Q.; Kentsis, A.; Dias, D. C.; Yamoah, K. and Wu, K. (2004): Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction, *Oncogene* 23 [11], pp. 1985-97.
- Peng, Z.; Serino, G. and Deng, X. W. (2001): Molecular characterization of subunit 6 of the COP9 signalosome and its role in multifaceted developmental processes in Arabidopsis, *Plant Cell* 13 [11], pp. 2393-407.
- Peng, Z.; Shen, Y.; Feng, S.; Wang, X.; Chitteti, B. N.; Vierstra, R. D. and Deng, X. W. (2003): Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo, *Curr Biol* 13 [13], pp. R504-5.
- Petroski, M. D. and Deshaies, R. J. (2005): Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 [1], pp. 9-20.
- Pickart, C. M. and Eddins, M. J. (2004): Ubiquitin: structures, functions, mechanisms, *Biochim Biophys Acta* 1695 [1-3], pp. 55-72.
- Pickart, C. M. and Fushman, D. (2004): Polyubiquitin chains: polymeric protein signals, *Curr Opin Chem Biol* 8 [6], pp. 610-6.
- Quesada, V.; Diaz-Perales, A.; Gutierrez-Fernandez, A.; Garabaya, C.; Cal, S. and Lopez-Otin, C. (2004): Cloning and enzymatic analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases, *Biochem Biophys Res Commun* 314 [1], pp. 54-62.
- Rechsteiner, M. and Hill, C. P. (2005): Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors, *Trends Cell Biol* 15 [1], pp. 27-33.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis, *Trends Biochem Sci* 21 [7], pp. 267-71.
- Reiley, W.; Zhang, M.; Wu, X.; Granger, E. and Sun, S. C. (2005): Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation, *Mol Cell Biol* 25 [10], pp. 3886-95.
- Reinstein, E.; Scheffner, M.; Oren, M.; Ciechanover, A. and Schwartz, A. (2000): Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue, *Oncogene* 19 [51], pp. 5944-50.
- Rogers, S.; Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986): Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis, *Science* 234 [4774], pp. 364-8.
- Russell, S. J.; Gonzalez, F.; Joshua-Tor, L. and Johnston, S. A. (2001): Selective chemical inactivation of AAA proteins reveals distinct functions of proteasomal ATPases, *Chem Biol* 8 [10], pp. 941-50.
- Saeki, Y.; Sone, T.; Toh-e, A. and Yokosawa, H. (2002): Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome, *Biochem Biophys Res Commun* 296 [4], pp. 813-9.
- Scheel, H. and Hofmann, K. (2005): Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes, *BMC Bioinformatics* 6 [1], p. 71.

- Scheffner, M.; Huibregtse, J. M.; Vierstra, R. D. and Howley, P. M. (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53, *Cell* 75 [3], pp. 495-505.
- Schubert, U.; Anton, L. C.; Gibbs, J.; Norbury, C. C.; Yewdell, J. W. and Bennink, J. R. (2000): Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes, *Nature* 404 [6779], pp. 770-4.
- Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M. (2003): A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers, *Trends Biochem Sci* 28 [6], pp. 321-8.
- Schwechheimer, C.; Serino, G.; Callis, J.; Crosby, W. L.; Lyapina, S.; Deshaies, R. J.; Gray, W. M.; Estelle, M. and Deng, X. W. (2001): Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response, *Science* 292 [5520], pp. 1379-82.
- Seeger, M.; Kraft, R.; Ferrell, K.; Bech-Otschir, D.; Dumdey, R.; Schade, R.; Gordon, C.; Naumann, M. and Dubiel, W. (1998): A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits, *Faseb J* 12 [6], pp. 469-78.
- Serino, G.; Su, H.; Peng, Z.; Tsuge, T.; Wei, N.; Gu, H. and Deng, X. W. (2003): Characterization of the last subunit of the Arabidopsis COP9 signalosome: implications for the overall structure and origin of the complex, *Plant Cell* 15 [3], pp. 719-31.
- Serino, G.; Tsuge, T.; Kwok, S.; Matsui, M.; Wei, N. and Deng, X. W. (1999): Arabidopsis cop8 and fus4 mutations define the same gene that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome, *Plant Cell* 11 [10], pp. 1967-80.
- Shen, J.; Channavajhala, P.; Seldin, D. C. and Sonenshein, G. E. (2001): Phosphorylation by the protein kinase CK2 promotes calpain-mediated degradation of I κ B α , *J Immunol* 167 [9], pp. 4919-25.
- Slot, J. W. and Geuze, H. J. (1985): A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry, *Eur J Cell Biol* 38 [1], pp. 87-93.
- Spencer, M. L.; Theodosiou, M. and Noonan, D. J. (2004): NPDC-1, a novel regulator of neuronal proliferation, is degraded by the ubiquitin/proteasome system through a PEST degradation motif, *J Biol Chem* 279 [35], pp. 37069-78. Epub 2004 Jun 30.
- Stickle, N. H.; Chung, J.; Klcio, J. M.; Hill, R. P.; Kaelin, W. G., Jr. and Ohh, M. (2004): pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development, *Mol Cell Biol* 24 [8], pp. 3251-61.
- Sullivan, J. A.; Shirasu, K. and Deng, X. W. (2003): The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants, *Nat Rev Genet* 4 [12], pp. 948-58.
- Sun, Y.; Wilson, M. P. and Majerus, P. W. (2002): Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1, *J Biol Chem* 277 [48], pp. 45759-64.
- Tanahashi, N.; Yokota, K.; Ahn, J. Y.; Chung, C. H.; Fujiwara, T.; Takahashi, E.; DeMartino, G. N.; Slaughter, C. A.; Toyonaga, T.; Yamamura, K.; Shimbara, N. and Tanaka, K. (1997): Molecular properties of the proteasome activator PA28 family proteins and gamma-interferon regulation, *Genes Cells* 2 [3], pp. 195-211.

- Tateishi, K.; Omata, M.; Tanaka, K. and Chiba, T. (2001): The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice, *J Cell Biol* 155 [4], pp. 571-9. Epub 2001 Nov 5.
- Tatham, M. H.; Jaffray, E.; Vaughan, O. A.; Desterro, J. M.; Botting, C. H.; Naismith, J. H. and Hay, R. T. (2001): Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9, *J Biol Chem* 276 [38], pp. 35368-74.
- Thrower, J. S.; Hoffman, L.; Rechsteiner, M. and Pickart, C. M. (2000): Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *Embo J* 19 [1], pp. 94-102.
- Tomoda, K.; Kubota, Y.; Arata, Y.; Mori, S.; Maeda, M.; Tanaka, T.; Yoshida, M.; Yoneda-Kato, N. and Kato, J. Y. (2002): The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex, *J Biol Chem* 277 [3], pp. 2302-10.
- Tran, H. J.; Allen, M. D.; Lowe, J. and Bycroft, M. (2003): Structure of the Jab1/MPN domain and its implications for proteasome function, *Biochemistry* 42 [39], pp. 11460-5.
- Tsuge, T.; Matsui, M. and Wei, N. (2001): The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain, *J Mol Biol* 305 [1], pp. 1-9.
- Uhle, S.; Medalia, O.; Waldron, R.; Dumdey, R.; Henklein, P.; Bech-Otschir, D.; Huang, X.; Berse, M.; Sperling, J.; Schade, R. and Dubiel, W. (2003): Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome, *Embo J* 22 [6], pp. 1302-12.
- Ustrell, V.; Hoffman, L.; Pratt, G. and Rechsteiner, M. (2002): PA200, a nuclear proteasome activator involved in DNA repair, *Embo J* 21 [13], pp. 3516-25.
- 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 [5593], pp. 611-5.
- Warburg, O. and Christian, W. (1941): Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase, *Biochem. Z.* 310, pp. 384-423.
- Wee, S.; Hetfeld, B.; Dubiel, W. and Wolf, D. A. (2002): Conservation of the COP9/signalosome in budding yeast, *BMC Genet* 3 [1], p. 15.
- Wei, N.; Chamovitz, D. A. and Deng, X. W. (1994): Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development, *Cell* 78 [1], pp. 117-24.
- Wei, N. and Deng, X. W. (1992): COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in arabidopsis, *Plant Cell* 4 [12], pp. 1507-18.
- Wei, N. and Deng, X. W. (1998): Characterization and purification of the mammalian COP9 complex, a conserved nuclear regulator initially identified as a repressor of photomorphogenesis in higher plants, *Photochem Photobiol* 68 [2], pp. 237-41.
- Wei, N. and Deng, X. W. (1999): Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human, *Trends Genet* 15 [3], pp. 98-103.
- Wei, N. and Deng, X. W. (2003): The cop9 signalosome, *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, pp. 261-86.

- Wei, N.; Tsuge, T.; Serino, G.; Dohmae, N.; Takio, K.; Matsui, M. and Deng, X. W. (1998): The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex, *Curr Biol* 8 [16], pp. 919-22.
- Wertz, I. E.; O'Rourke, K. M.; Zhou, H.; Eby, M.; Aravind, L.; Seshagiri, S.; Wu, P.; Wiesmann, C.; Baker, R.; Boone, D. L.; Ma, A.; Koonin, E. V. and Dixit, V. M. (2004): De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling, *Nature* 430 [7000], pp. 694-9. Epub 2004 Jul 18.
- Whitby, F. G.; Masters, E. I.; Kramer, L.; Knowlton, J. R.; Yao, Y.; Wang, C. C. and Hill, C. P. (2000): Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators, *Nature* 408 [6808], pp. 115-20.
- Wilk, S. and Orłowski, M. (1983): Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex, *J Neurochem* 40 [3], pp. 842-9.
- Wolf, D. A.; Zhou, C. and Wee, S. (2003): The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases?, *Nat Cell Biol* 5 [12], pp. 1029-33.
- Wu, K.; Chen, A. and Pan, Z. Q. (2000): Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization, *J Biol Chem* 275 [41], pp. 32317-24.
- Wu, K.; Yamoah, K.; Dolios, G.; Gan-Erdene, T.; Tan, P.; Chen, A.; Lee, C. G.; Wei, N.; Wilkinson, K. D.; Wang, R. and Pan, Z. Q. (2003): DEN1 is a dual function protease capable of processing the C terminus of Nedd8 and deconjugating hyper-neddylated CUL1, *J Biol Chem* 278 [31], pp. 28882-91.
- Xie, Y. and Varshavsky, A. (2000): Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [6], pp. 2497-502.
- Xie, Y. and Varshavsky, A. (2002): UFD4 lacking the proteasome-binding region catalyses ubiquitination but is impaired in proteolysis, *Nat Cell Biol* 4 [12], pp. 1003-7.
- Xirodimas, D. P.; Saville, M. K.; Bourdon, J. C.; Hay, R. T. and Lane, D. P. (2004): Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity, *Cell* 118 [1], pp. 83-97.
- Yahalom, A.; Kim, T. H.; Winter, E.; Karniol, B.; von Arnim, A. G. and Chamovitz, D. A. (2001): Arabidopsis eIF3e (INT-6) associates with both eIF3c and the COP9 signalosome subunit CSN7, *J Biol Chem* 276 [1], pp. 334-40.
- Yao, T. and Cohen, R. E. (2002): A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome, *Nature* 419 [6905], pp. 403-7. Epub 2002 Sep 1.
- Yen, Hsueh-Chi S.; Gordon, Colin and Chang, Eric C. (2003): *Schizosaccharomyces pombe* Int6 and Ras Homologs Regulate Cell Division and Mitotic Fidelity via the Proteasome, *Cell* 112 [2], pp. 207-217.
- Zhang, Z.; Krutchinsky, A.; Endicott, S.; Realini, C.; Rechsteiner, M. and Standing, K. G. (1999): Proteasome activator 11S REG or PA28: recombinant REG alpha/REG beta hetero-oligomers are heptamers, *Biochemistry* 38 [17], pp. 5651-8.
- Zheng, J.; Yang, X.; Harrell, J. M.; Ryzhikov, S.; Shim, E. H.; Lykke-Andersen, K.; Wei, N.; Sun, H.; Kobayashi, R. and Zhang, H. (2002): CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex, *Mol Cell* 10 [6], pp. 1519-26.

- Zhou, C.; Wee, S.; Rhee, E.; Naumann, M.; Dubiel, W. and Wolf, D. A. (2003): Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p, *Mol Cell* 11 [4], pp. 927-38.
- Zhou, P. and Howley, P. M. (1998): Ubiquitination and degradation of the substrate recognition subunits of SCF ubiquitin-protein ligases, *Mol Cell* 2 [5], pp. 571-80.

7 ANHANG

7.1 GENERIERTE PLASMIDE

Tabelle 3: Generierte Plasmide

Vektorbezeichnung	Beschreibung
pCR2.1-NtermUSP15	TA Cloning Vektor pCR2.1 mit CDS 1-1799 von USP15
pCR2.1-CtermUSP15	TA Cloning Vektor pCR2.1 mit CDS 1778-2859 von USP15
pCR2.1-USP15	TA Cloning Vektor pCR2.1 mit CDS 1-2859 von USP15
pQE32-USP15(1-488)	prokaryotischer Expressionsvektor pQE32 mit CDS 1-1465 von USP15, liefert His-USP15 (AS 1-488)
pQE31-USP15(724-952)	prokaryotischer Expressionsvektor pQE31 mit CDS 2172-2859 von USP15, liefert His-USP15 (AS 724-952)
pQE32-USP15	prokaryotischer Expressionsvektor pQE32 mit CDS 1-2859 von USP15, liefert His-USP15
pQE32-USP15-S932A	prokaryotischer Expressionsvektor pQE32 mit CDS 1-2859 von USP15 und Punktmutationen
pQE32-USP15-C783A	prokaryotischer Expressionsvektor pQE32 mit CDS 1-2859 von USP15 und Punktmutationen
pQE32-USP15-C419A	prokaryotischer Expressionsvektor pQE32 mit CDS 1-2859 von USP15 und Punktmutationen
pCMV-Tag3B-USP15	eukaryotischer Expressionsvektor pCMV-Tag3B mit CDS 1-2859 von USP15, liefert Myc-USP15
pCMV-Tag3B-USP15-S932A	eukaryotischer Expressionsvektor pCMV-Tag3B mit CDS 1-2859 von USP15 und Punktmutationen
pCMV-Tag3B-USP15-C783A	eukaryotischer Expressionsvektor pCMV-Tag3B mit CDS 1-2859 von USP15 und Punktmutationen
pCMV-Tag3B-USP15-C419A	eukaryotischer Expressionsvektor pCMV-Tag3B mit CDS 1-2859 von USP15 und Punktmutationen

7.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAA	ATPases associated with a variety of different activities
AMSH	Associated molecule with the SH3 domain of STAM
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
Blm3	Bleomycin-sensitive 3
BTB-Domäne	Broad-Complex, Trimtrack, Brick a brac-Domäne
CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
CDS	codierende DNA-Sequenz
Cezanne	cellular zinc finger NFκB
CHIP	carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein
CHX	Cycloheximid
CK2	Casein kinase 2
COP	Constitutive photomorphogenic
CRL	Cullin-RING-Ligase
CSN	COP9 Signalosom
CYLD	cylindromatosis protein
DEN1	Deneddylase 1
det	deetioliert
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DRiPs	Defective ribosomal products
DUB	deubiquitinating enzyme
eIF3	eukaryontischen Translations-Initiations-Komplex 3
fus	fusca
<i>H. s.</i>	<i>Homo sapiens</i>
HAUSP	Herpes-virus-associated ubiquitin-specific protease
HDAC 6	Histone deacetylase 6
HECT	homologous to E6-AP C-terminus
HPV	Humanes Papillomavirus
Id3	Inhibitor of differentiation 3
IFNγ	Interferon γ
IKKγ	IκB kinase γ
IP	Immunpräzipitation
IP ₃ -5/6-kinase	Inositol-1,3,4-trisphosphat-5/6-Kinase
Jab1	Jun-activation-domain-binding protein 1
JAMM	Jab1/MPN domain metalloenzyme
Mdm2	Mouse double minute 2
MHC	Major histocompatibility complex
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MPN	Mpr1-Pad1-N-terminal
Muc1	Mucin 1
Nedd8	neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated 8
NEDP1	NEDD8-specific protease 1
NEM	N-Ethylmaleimid
NFκB	Nuclear factor κ B
Npl4	nuclear protein localization 4
NZF	Npl4-Zn-finger
OPT	ortho-Phenanthrolin
Otubain	OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein
PAZ	Polyubiquitin Associated Zinc finger
PCI	Proteasome, COP9 signalosome, initiation factor 3
PEST-Motiv	Sequenzmotiv reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin
PGPH	peptidylglutamyl peptide hydrolase
PINT	Proteasome subunits, Int-6, Nip-1, and Trip15

PKD	Protein kinase D
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PR	Progesterone receptor
pVHL	von Hippel Lindau protein
Rbx1	RING box protein 1
RING	really interesting new gene
Rpn	Regulatory particle non-ATPase
Rpt	Regulatory particle ATPase
Rub1	related-to-ubiquitin 1
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SCF complex	Skp1-Cul1-F-box protein complex
SRC-1	steroid receptor co-activator 1
Suc-LLVY-AMC	N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methyl-coumarin
SUMO	small Ub-related modifier
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRAF-2	tumour-necrosis factor receptor-associated factor 2
Trip15	Thyroid hormone receptor-interacting protein 15
Ub	Ubiquitin
Ub ₄	Tetraubiquitin
UBA-Domäne	Ubiquitin-associated domain
Ubc12	Ubiquitin-conjugating enzyme 12
UBL	Ubiquitin-like modifiers
UBL-Domäne	carboxy terminal ubiquitin-like domain
U-box	Ufd2 homology-box
UBP	Ubiquitin-specific processing protease
UCH	Ubiquitin C-terminal hydrolase
Ufd4	ubiquitin fusion degradation protein 4
UNP	ubiquitous nuclear protein
UPS	Ubiquitin-26S Proteasomsystem
USP15	Ubiquitin-specific protease 15
UZ	Ultrazentrifuge
WB	Westernblot
wt	wild type

7.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: AUFBAU DES 26S PROTEASOMS	2
ABB. 2: UBIQUITIN-26S PROTEASOMSYSTEM.....	4
ABB. 3: DIE VERSCHIEDENEN CULLIN-HALTIGEN RING-LIGASEN UND DER APC/C-KOMPLEX.....	7
ABB. 4: PHÄNOTYP DER <i>COP9-I</i> -MUTANTE IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	11
ABB. 5: ELEKTRONENMIKROGRAPHEN VOM CSN UND LID-KOMPLEX.....	14
ABB. 6: MODELL DES CSN MIT DEN BISHER BEKANNTEN INTERAGIERENDEN PROTEINEN	16
ABB. 7: DAS JAMM/MPN ⁺ -MOTIV INNERHALB DER MPN-DOMÄNE VON CSN5.....	18
ABB. 8: STRUKTURVERGLEICH EINES PROTEINS MIT JAMM-MOTIV MIT EINER DEAMINASE	18
ABB. 9: NACHWEIS VON CSN UND 26S IM GLYCERINGRADIENT VON FLAG-CSN2-B8 ZELLYSAT	44
ABB. 10: NACHWEIS VON BASE-UNTEREINHEITEN NACH IMMUNPRÄZIPITATION DES CSN-KOMPLEXES	45
ABB. 11: NACHWEIS DES VOLLSTÄNDIGEN CSN-KOMPLEXES NACH FLAG-PULLDOWN	46
ABB. 12: NACHWEIS DES 26S PROTEASOMS NACH FLAG-PULLDOWN DES CSN.....	47
ABB. 13: 26S PROTEASOM UND CSN AUS ERYTHROZYTENKONZENTRATEN.....	48
ABB. 14: VERDRÄNGUNG DES LID VOM 26S PROTEASOM DURCH DAS CSN <i>IN VITRO</i>	49
ABB. 15: EINFLUSS DES CSN AUF DIE CHYMOTRYPSIN-ÄHNLICHE AKTIVITÄT DES 26S PROTEASOMS	50
ABB. 16: EINFLUSS DES CSN AUF DIE PROTEASEAKTIVITÄT DES 26S PROTEASOMS.....	51
ABB. 17: EINFLUSS DES CSN AUF DIE PROTEASEAKTIVITÄT DES 26S PROTEASOMS.....	52
ABB. 18: ELEKTRONENMIKROSKOPIE VON AUFGEREINIGTEM CSN UND LID-SUBKOMPLEX MIT GOLDMARKIERTEM UB ₄	54
ABB. 19: DEUBIQUITINIERUNG VON UB ₄ DURCH DAS CSN	55
ABB. 20: OPT UND NEM HEMMEN DIE DEUBIQUITINIERUNG VON UB ₄ DURCH DAS CSN	56
ABB. 21: NEM ZERSTÖRT DEN CSN-KOMPLEX	57
ABB. 22: OPT HEMMT DEN ABBAU VON UB ₅ -MUC1 DURCH DAS CSN.....	58
ABB. 23: IDENTIFIZIERUNG VON USP15 IM AUFGEREINIGTEN CSN-KOMPLEX	59
ABB. 24: USP15 WIRD WÄHREND DER PRÄPARATION AUS HUMANEN ERYTHROZYTEN MIT DEM CSN AUFGEREINIGT.....	61
ABB. 25: BINDUNG VON USP15 AN CSN5 UND CSN7	62
ABB. 26: INTERAKTION ZWISCHEN USP15 (1-488) ODER USP15 (724-952) UND CSN.....	63
ABB. 27: PHOSPHORYLIERUNG VON USP15WT UND USP15 (724-952) DURCH CSN UND DIE CSN-ASSOZIIERTE KINASE CK2.....	64
ABB. 28: PHOSPHORYLIERUNG VON His-USP15 UND His-USP15S932A DURCH DIE CK2	65
ABB. 29: CURCUMIN INDUZIERT DIE BILDUNG VON HMW-USP15.....	66
ABB. 30: SEQUENZVERGLEICH DER ZN-FINGER ENTHALTENDEN REGION DES HUMANEN USP15 UND AUSGEWÄHLTER UBPs.....	67
ABB. 31: MODELL VON USP15	68
ABB. 32: INHIBITOREFFEKTE AUF DIE DEUBIQUITINIERUNGSAKTIVITÄT VON USP15WT UND USP15C783A BEIM ABBAU VON UB-GFP	68

ABB. 33: ABBAU VON UB ₄ UND UB ₅ -MUC1 DURCH HIS-USP15WT UND HIS-USP15C783A.....	69
ABB. 34: ZN-FINGER VON USP15 IST ESSENTIELL FÜR DIE BINDUNG VON UB ₄	70
ABB. 35: DIE CO-TRANSFEKTION VON RBX1 UND WT USP15, ABER NICHT USP15C783A, STABILISIERT RBX1 ...	71
ABB. 36: EINFLUSS VON USP15 AUF DIE STABILITÄT VON CRLS	88
ABB. 37: MODELL ZUR ROLLE DES CSN ALS "ALTERNATIVER LID".....	89

7.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Alte und neue Bezeichnungen der CSN-Untereinheiten in verschiedenen Spezies und Vergleich zum Lid.....	13
Tabelle 2: CK2-Konsensussequenzen in USP15 (724-952).....	64
Tabelle 3: Generierte Plasmide.....	103

7.5 PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen:

- Hetfeld, B. K.; Helfrich, A.; Kapelari, B.; Scheel, H.; Hofmann, K.; Guterman, A.; Glickman, M.; Schade, R.; Kloetzel, P. M. and Dubiel, W. (2005): The Zinc Finger of the CSN-Associated Deubiquitinating Enzyme USP15 Is Essential to Rescue the E3 Ligase Rbx1, *Curr Biol* 15 [13], pp. 1217-1221.
- Hetfeld, B. K. J., Bech-Otschir, D., and Dubiel W. (2005): Purification method of the COP9 signalosome from human erythrocytes, *Methods in Enzymology, "Ubiquitin And Protein Degradation, Part A"* 398 pp. 481-491, Elsevier, Inc., San Diego.
- Huang, X., B. K. Hetfeld, et al. (2005). "Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction." *Febs J* 272(15): 3909-17.
- Wee, S.; Hetfeld, B.; Dubiel, W. and Wolf, D. A. (2002): Conservation of the COP9/signalosome in budding yeast, *BMC Genet* 3 [1], p. 15

Posterpräsentationen:

- The Ubiquitin-Family (Cold Spring Harbor, April 2005): Characteristics of the Human COP9 signalosome associated deubiquitinating enzyme USP15
- ZOMES III (Berlin, Mai 2004): Characterization of the human COP9 signalosome associated deubiquitinating enzyme USP15

Vorträge:

- Mini-Symposium (Berlin, November 2003): Deubiquitinating activity of the COP9 signalosome
- Gast-Vortrag (Magdeburg, November 2004): CSN-mediated deubiquitination and its possible role in the ubiquitin system
- Gedenksymposium zu Ehren von Prof. Dr. Dr. Rapoport (Berlin, Dezember 2004): The COP9 signalosome-mediated deubiquitination and its possible role in the ubiquitin system
- Chirurgie-Symposium (Berlin, Dezember 2004): Die COP9 Signalosom-vermittelte Deubiquitinierung und ihre Rolle beim zellulären Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.