

Aktivität Ubiquitin-konjugierender Enzyme an den RING-Ligasen des ERAD-Systems

Dissertation
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

Diplom-Biologin Katrin Bagola

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Sommer
2. Prof. Dr. Udo Heinemann
3. Prof. Dr. Martin Scheffner

Tag der mündlichen Prüfung: 29. März 2012

ZUSAMMENFASSUNG	7
ABSTRACT.....	8
1 Einleitung.....	9
1.1 Proteinhomöostase	9
1.2 Wege des Proteinabbaus.....	9
1.3 Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin	10
1.4 Mono- oder Polyubiquitinierung	13
1.5 E4-Enzyme	14
1.6 Deubiquitinierende Enzyme	14
1.7 Funktionen verschiedener Polyubiquitinierungen.....	15
1.8 Ubiquitin-bindende Domänen.....	15
1.9 Ubiquitin-ähnliche Domänen	17
1.10 Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Proteindegradation (ERAD)	17
1.11 RING-Ligasen in ERAD.....	17
1.12 In ERAD involvierte Ubiquitin-konjugierende Enzyme.....	19
1.13 Transfer der ubiquitinierten Proteine zum 26S Proteasom.....	21
1.14 ERAD-Substrate	22
1.15 Erkennung fehlerhaft gefalteter Proteine im ER.....	23
1.16 UPR	24
1.17 Protein-Dislokation.....	25
1.18 Zielsetzung dieser Arbeit.....	26
2 Ergebnisse.....	27
2.1 <i>In vitro</i> Ubiquitinierung	27
2.2 Cue1 verstärkt die Ubc7-abhängige Synthese von Ubiquitinketten in Interaktion mit den Ubiquitinligasen	29

Inhaltsverzeichnis

2.3 Die saure Schleife in Ubc7 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung eines Thioesters mit Ubiquitin	33
2.4 Die Synthese von Ubiquitinketten wird durch Deletion der sauren Schleife verhindert.....	35
2.5 Veränderungen in der sauren Schleife von Ubc7 führen zu Substratstabilisierung <i>in vivo</i>	37
2.6 Die saure Schleife beeinflusst die Interaktion von Ubc7 mit den ERAD-Ligasen und die Rekrutierung ligaseassoziierter Faktoren.....	41
2.7 Wirkung von Cue1 und der Cue1-CUE-Domäne auf die Ubiquitinierungsreaktion von Ubc7 in Interaktion mit den Ligasen	44
2.8 Cue1 bindet K48- und K63-verknüpftes Polyubiquitin in Abhängigkeit seiner CUE-Domäne	48
2.9 Die CUE-Domäne schützt Polyubiquitinketten partiell vor Prozessierung durch ein deubiquitinierendes Enzym.....	51
2.10 Einfluss der CUE-Domäne auf die Protein-Protein-Wechselwirkungen an den Ligasekomplexen.....	53
2.11 Die Deletion der CUE-Domäne führt zur Stabilisierung membrangebundener Substratproteine	56
2.12 Die Ubiquitinmoleküle einer durch Ubc7 gebildeten Ubiquitinkette sind in einer K48-abhängigen Weise miteinander verknüpft.....	59
2.13 Versuche einer <i>in vitro</i> Substratubiquitinierung	62
2.14 Ubc6 verknüpft Ubiquitinmoleküle über das Lysin an Position 11	66
2.15 Ubc6 und Ubc7 binden unabhängig voneinander an Doa10.....	69
2.16 Ubc6 und Ubc7 sind an der Synthese der substratkonjugierten Ubiquitinketten beteiligt	73
2.17 Der Abbau von Ubc6 erfordert K27-verknüpfte Ubiquitinketten.....	75
2.18 Der Abbau von Substratproteinen an der Doa10-Ligase ist von einer K11- und K27- Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle unabhängig	78

3 Diskussion	83
3.1 Ubc7 zeigt eine <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsaktivität in Wechselwirkung mit Cue1 oder den ERAD-Ligasen.....	83
3.2 Die saure Schleife in Ubc7 ist für eine Ubiquitinkettenbildung notwendig und beeinflusst die E2-E3-Interaktion.....	84
3.3 Eine zusätzliche RING-unabhängige E2-E3-Interaktion erhöht die Effektivität der Polyubiquitinierung	86
3.4 Sequenzielle Ubiquitinierung oder <i>en bloc</i> Transfer von Ubiquitinketten	88
3.5 Die Cue1-CUE-Domäne bindet Ubiquitin und wirkt bei der <i>in vitro</i> Synthese von Polyubiquitin durch Ubc7 kettenverlängernd	89
3.6 Die Funktion der Cue1-CUE-Domäne ist <i>in vivo</i> nur für den Abbau einiger Substratproteine bedeutsam.....	90
3.7 Ubc6 synthetisiert K11-verknüpftes Oligoubiquitin unabhängig von der Doa10-RING-Domäne.....	91
3.8 Ubc6 hat keinen Einfluss auf die Ubc7-abhängige Substratubiquitinierung	93
3.9 Ubiquitinierung verschiedener Substratproteine	94
3.10 Substratubiquitinierung im ERAD-System – ein Modell	96
4 Material und Methoden	97
4.1 PCR	97
4.2 Klonierung und DNA-Aufreinigung	97
4.3 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	97
4.4 Transformation von <i>E. coli</i>	97
4.5 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	98
4.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	98
4.7 Aufreinigung von His ₆ -epitopmarkierten Fusionsproteinen	99
4.8 Bestimmung der Proteinkonzentration	99
4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	99

Inhaltsverzeichnis

4.10	Western-Blotting / Immunoblotting	100
4.11	Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Gelen	100
4.12	<i>In vitro</i> Ubiquitinierung	101
4.13	<i>In vitro</i> Bindung von Ubiquitinketten.....	101
4.14	<i>In vitro</i> Deubiquitinierung	101
4.15	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	102
4.16	Hefetransformation.....	102
4.17	Verpaarung und Sporulation von Hefezellen mit anschließender Tetradenanalyse	102
4.18	Pulse-Chase-Experiment	103
4.19	Cycloheximid-Abbau-Experiment.....	104
4.20	Immunpräzipitation von 13xmyc-Doa10- bzw. 13xmyc-Doa10 C(93)S	104
4.21	Immunpräzipitation von 6xHA-Hrd3	104
4.22	Immunpräzipitation von ubiquitiniertem Deg1-βGal.....	105
4.23	Verwendete Antikörper	106
4.24	Hefestämme.....	107
4.25	Plasmid-DNA	108
4.26	Oligonukleotide	110
	Literaturverzeichnis	112
	Abkürzungsverzeichnis	118
	Publikationen und Vorträge.....	120
	Selbständigkeitserklärung.....	121
	Danksagung.....	122

ZUSAMMENFASSUNG

Fehlerhafte sekretorische Proteine werden über einen speziellen Abbauweg, die ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD), mit Lysin48-verknüpften Ubiquitinketten polyubiquitiniert und dem proteolytischen Abbau am 26S Proteasom zugeführt.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bilden die beiden ER-membranständigen RING-Ubiquitinligasen Hrd1 und Doa10 zentrale Komponenten im Ubiquitinierungsprozess. Das lösliche zytosolische Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7, welches mit beiden Ligasen bei der Polyubiquitinierung von Substratproteinen zusammenwirkt, wird über den membranverankerten Co-Faktor Cue1 an die ER-Membran rekrutiert.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse belegen zwei weitere Funktionen für Cue1 im Ubiquitinierungsprozess: Die Bindung von Ubc7 an einen carboxyterminalen Bereich in Cue1 führt zur Stimulation der Ubiquitinierungsaktivität von Ubc7 mit den RING-Ligasen. Darüber hinaus bewirkt die Ubiquitin-bindende CUE-Domäne in Cue1 eine Steigerung der Länge der Ubiquitinketten und deren Syntheserate, was zum effektiven Abbau einiger ER-membrangebundener Substratproteine beiträgt. Die durch Ubc7 synthetisierten Lysin48-verknüpften Ubiquitinketten werden in Abhängigkeit eines schleifenförmigen sauren Bereichs in Ubc7 gebildet. Entfernen dieses Bereichs resultiert im Abbruch der Ubiquitinierung nach Konjugation eines Monoubiquitins auf dem Substrat.

An der Hrd1-Ligase werden durch Ubc7 polyubiquitinierte Proteine umgehend zum Proteasom transferiert. Für den Doa10-abhängigen Substratabbau ist die Funktion eines weiteren Ubiquitin-konjugierenden Enzyms, Ubc6, notwendig. Die hier gezeigten Daten weisen auf eine Ubc6-abhängige Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen in einer Lysin11-abhängigen Weise hin. Eine Inhibition der Synthese Lysin11-verknüpfter Ubiquitinketten hatte jedoch keinen Effekt auf den Abbau von Substratproteinen. Stattdessen wurde der Abbau von Ubc6 selbst durch Unterbindung der Bildung Lysin27-verknüpfter Ubiquitinketten verhindert.

Schlagworte: Ubiquitin, sekretorische Proteine, ERAD, UPS, UBD

ABSTRACT

Aberrant secretory proteins are removed from the cell in a process termed „endoplasmic reticulum-associated protein degradation“ (ERAD), as it screens the endoplasmic reticulum for unwanted polypeptides and triggers their elimination via the 26S proteasome. To this end, client proteins of the ERAD pathway are polyubiquitinated with lysine48-linked ubiquitin chains at the ER membrane.

Two ER membrane-integrated RING ubiquitin ligases, Hrd1 and Doa10, constitute central components of the ubiquitination machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. To polyubiquitinate substrate proteins, both ligases interact with the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc7. Since Ubc7 itself is a soluble cytosolic protein, it is recruited to the ER-membrane by its anchoring factor Cue1.

Results in this study reveal two additional functions of Cue1 in the ubiquitination reaction: First, binding of Ubc7 to the Cue1-carboxyterminus stimulates the ubiquitin chain formation by Ubc7 and the ligases. Second, the CUE domain within Cue1 increases the chain length and accelerates the synthesis of the polyubiquitin chain, which results in efficient degradation of certain substrate proteins. Formation of lysine48-linked ubiquitin chains by Ubc7 depends on an acidic loop within Ubc7. Deletion of this structure leads to inhibition of ubiquitin chain elongation after the initial substrate monoubiquitination.

Client proteins, ubiquitinated by Ubc7 and Hrd1, are immediately transferred to the proteasome. For Doa10-dependent substrate degradation, the activity of another ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc6, is required. Data shown here indicate a function of Ubc6 in the formation of lysine11-linked polyubiquitin, since mutation of this lysine residue resulted in the prevention of ubiquitin chain synthesis. However, expression of this ubiquitin mutant had no effect on substrate degradation. Moreover, the proteolysis of Ubc6 itself is inhibited by prevention of lysin27-linked polyubiquitin chain formation.

Keywords: ubiquitin, secretory proteins, ERAD, UPS, UBD

1 Einleitung

1.1 Proteinhomöostase

Proteine gehören in lebenden Organismen zu den vielseitigsten Makromolekülen. Aufgrund der Verschiedenheit und Flexibilität ihrer Formen erfüllen sie eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Funktionen in einzelnen Zellen bis hin zu komplexen Lebewesen. Neben Struktur- und Transportproteinen spielt die Gruppe der Enzyme eine entscheidende Rolle in nahezu allen zellulären Vorgängen, bei denen Prozesse katalysiert werden müssen. Hierzu zählen sowohl die Kontrolle des Stoff- und Energiehaushaltes als auch die Regulation des Zellzyklus. Viele der Proteinfunktionen werden für sehr spezielle und oftmals zeitlich streng begrenzte Aufgaben benötigt, weshalb die Menge sowie die Lebensdauer verschiedener Proteine an ihre jeweilige Funktion in den Zellzyklusphasen und im Hinblick auf verschiedene Lebensbedingungen angepasst werden müssen. Eine erforderliche höhere Menge eines bestimmten aktiven Proteins kann zum Beispiel durch Neusynthese oder durch Freisetzung des Proteins aus einem inaktivierten Zustand erfolgen. Analog dazu werden gerade nicht benötigte Proteine inaktiviert oder abgebaut. Darüber hinaus weisen einige wissenschaftliche Untersuchungen darauf hin, dass etwa ein Drittel oder gar die Hälfte der an den zytosolischen Ribosomen neu synthetisierten Proteine fehlerhaft sind und zeitnah wieder entfernt werden. Dies verhindert zum einen, dass Proteine mit veränderter Funktion schädigend auf zelluläre Prozesse einwirken können und ermöglicht zum anderen das Recycling der in den betroffenen Proteinen verknüpften Aminosäuren.

1.2 Wege des Proteinabbaus

Der Abbau von Proteinen erfolgt über Proteasen, welche die Peptidbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren aufspalten. Um eine unkontrollierte Proteindegradation zu verhindern, befinden sich viele Proteasen in separaten membranumschlossenen Zellkompartimenten, den Lysosomen. Hier werden vorrangig Proteine der Plasmamembran abgebaut, die im „multivesicular body“ (MVB) -Abbauweg über endozytotische Vesikel (Endosomen) internalisiert werden und schließlich mit den Lysosomen fusionieren. Aber auch größere zytosolische Zellbestandteile und Organellen werden lysosomal abgebaut. Hierzu bedient sich die Zelle der Autophagie. Dabei werden Bereiche des Zytosols vollständig in Vesikel eingeschlossen. Diese

Einleitung

fusionieren anschließend mit Lysosomen, wodurch das autophagozytierte Material mittels der lysosomalen Proteasen gespalten wird.

Der größere Teil der zytosolischen Proteine wird jedoch durch die im Zytosol befindlichen 26S Proteasomen abgebaut. Die in diesen zylindrischen Komplexen vorhandenen Proteasen sind zwar nicht durch eine Membran von ihren Substratmolekülen getrennt, doch der Zugang zum proteolytischen Zentrum der Proteasomen ist eingeschränkt und reguliert. 26S Proteasomen sind ungewöhnlich große Multiproteinkomplexe mit einer Masse von etwa 2,5 MDa. Der 20S Kernkomplex eines Proteasoms wird aus 4 aufeinanderliegenden heptameren Ringen gebildet, wobei die beiden inneren Ringe, von denen jeweils die β_1 , β_2 und β_5 -Untereinheit hydrolytische Aktivität besitzen (Caspase-, Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Aktivität), das proteolytische Zentrum des 26S Proteasoms formen [1]. An beiden Enden des 20S Kernkomplexes können 19S regulatorische Komplexe angelagert sein. Diese unterteilen sich weiterhin in eine sogenannte Basis und einen Deckel. Die in der Basis enthaltenen sechs verschiedenen AAA-ATPase-Untereinheiten (Rpt1-6) sind für die Entfaltung eines Substratproteins erforderlich und öffnen den äußeren α -Ring des 20S Kernkomplexes, der den Zugang zu den Proteaseuntereinheiten reguliert. Proteine des Deckels sind u. a. für die Erkennung und Bindung zum Abbau bestimmter, ubiquitinerter Substratproteine und deren Deubiquitinierung verantwortlich.

1.3 Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin

Ubiquitinierung von Proteinen ist neben Glykosylierung und Phosphorylierung eine der wichtigsten posttranslationalen Proteinmodifikationen und stellt den zentralen Aspekt dieser Arbeit dar. Ubiquitin ist ein in den Zellen ubiquitär vertretenes Polypeptid von 76 Aminosäuren. Es weist eine hohe evolutionäre Konservierung von einfachen Eukaryonten bis hin zu Säugern auf. Die Modifikation eines Proteins durch Anheftung des Ubiquitins vollzieht sich meist an Lysinresten des Proteins, kann aber, in einigen Fällen, auch an Serin- oder Threonin-Resten sowie am Aminoterminus (N-Terminus) erfolgen. Protein-Ubiquitinierung erfordert eine Kaskade von enzymatischen Reaktionen. Zunächst wird das Ubiquitinmolekül von einem Ubiquitinaktivierenden Enzym (E1) unter ATP-Verbrauch über eine Thioester-Verknüpfung an das katalytisch aktive Cystein des E1-Enzyms gebunden. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) ist bislang nur ein einziges Ubiquitinaktivierendes Enzym bekannt, Uba1, während für humane Zellen ein weiteres E1 für Ubiquitin beschrieben wurde.

Einleitung

Die Interaktion des mit Ubiquitin beladenen E1 und einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) bewirkt die Übertragung des Ubiquitins auf das katalytisch aktive Cystein des E2-Enzyms, welches wiederum eine Thioester-Verbindung mit dem Ubiquitin eingeht. Hierbei reagiert jeweils der Carboxyterminus (C-Terminus) des Ubiquitins mit der Thiolgruppe des Cysteinrestes, wodurch unter Wasserabspaltung ein Thioester entsteht (Abb. 1). Die Gruppe der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme umfasst in *S. cerevisiae* 13 Proteine. E2s besitzen eine konservierte UBC (ubiquitin-conjugating)-Domäne, die von vier α -Helices und einem aus vier Strängen bestehenden anti-parallelen β -Faltblatt gebildet wird. Das Ubiquitin-bindende katalytisch aktive Cystein ist in einer flachen Kerbe zwischen α -Helix 2 und 3 lokalisiert [2] .

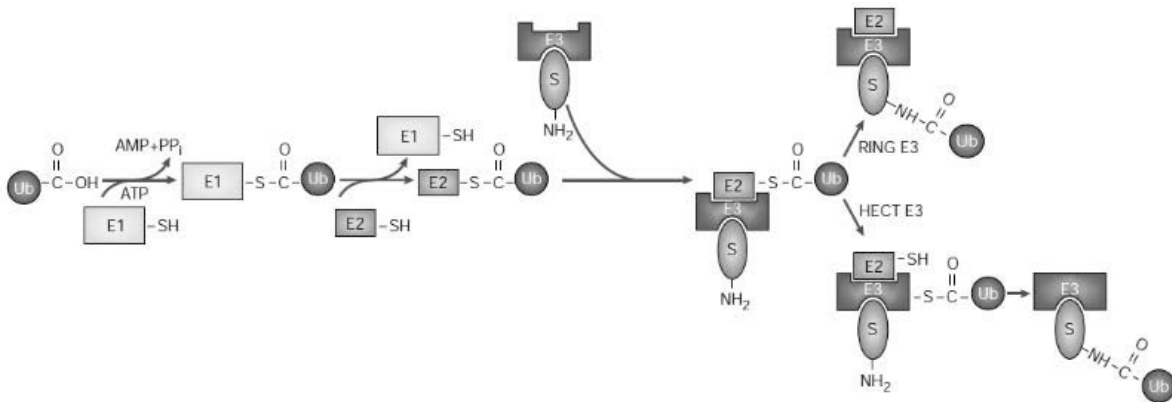


Abbildung 1: Schematische Darstellung der enzymatischen Schritte zur Ubiquitinierung eines Substratproteins. Ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) bindet unter ATP-Verbrauch das Ubiquitin-molekül (Ub). Es folgt die Übertragung des Ubiquitins auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2). Ein durch die Ubiquitinligase (E3) gebundenes Substratprotein (S) wird nun durch Interaktion von E2 und E3 kovalent mit einem Ubiquitin modifiziert. Aus „Themes and Variations of Ubiquitylation“, Allan M. Weissman, 2001, [3] .

Der Transfer des Ubiquitins vom E2 auf ein Zielprotein ist in der Regel von einem weiteren Enzym, der Ubiquitin Ligase (E3), abhängig. Man unterscheidet zwei Klassen von E3s: Die HECT (Homologous to E6AP Carboxy-Terminus)- und die RING (Really Interesting New Gene 1) –Enzyme [4] . HECT-Ubiquitin-Ligasen besitzen selbst ein katalytisch aktives Cystein, das es ihnen erlaubt, das Ubiquitin von einem E2-Enzym zu übernehmen und auf ein gebundenes Protein zu transferieren. Die Gruppe der RING-E3-Enzyme besitzt kein einzelnes aktives Cystein zur Bildung eines Thioesters mit Ubiquitin. Hingegen weisen das Vorhandensein acht konservierter Cystein- und Histidinreste im etwa 40-60 Aminosäuren umfassenden RING-Finger der Ligasen sowie ihre Fähigkeit zwei Zink-Ionen zu komplexieren, Ähnlichkeiten zu Zink-Finger-Motiven anderer Proteine auf, auch wenn sich die Strukturen der Motive

Einleitung

voneinander unterscheiden. Für die Übertragung des Ubiquitins auf das Zielprotein ist die spezifische Bindung geeigneter Substratproteine durch die Ligasen oder einer ihrer assoziierten Co-Faktoren zwingend erforderlich. RING-Ligasen binden die mit ihnen interagierenden Ubiquitin-konjugierenden-Enzyme über die RING-Domäne und vermitteln den Transfer des vom E2-Enzym gebundenen Ubiquitin auf das gebundene Substrat, ohne selbst eine direkte Bindung mit Ubiquitin herzustellen. Die Substraterkennung durch die Ligase geschieht nicht über das RING-Motiv, sondern meist über einen strukturell separaten Bereich des E3-Enzyms. Eine Bindung von E2 und Substratprotein kann wie bei „single-subunit“-RING-E3s an ein und demselben Protein erfolgen. Im Gegensatz dazu findet bei „multi-subunit“-RING E3s, wie z. B. bei Cullin-Ligasen, die Bindung an verschiedenen Proteinuntereinheiten eines Ligasekomplexes statt. Trotz der im Allgemeinen schwachen Interaktion von E2s mit E3s hat die RING-Domäne wahrscheinlich eine entscheidende Funktion bei der korrekten Positionierung des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms zum Zielprotein. Es gibt aber auch Belege dafür, dass RING-E3s feine strukturelle Konformationsänderungen in den E2-Enzymen hervorrufen können, die eine Übertragung des Ubiquitins begünstigen [5,6]. Des Weiteren birgt die Fähigkeit vieler RING-E3-Enzyme sich selbst zu ubiquitinieren Potenzial für die Modulation der Ligaseaktivität oder die Rekrutierung weiterer assoziierter Faktoren. Die Kaskade der enzymatischen Schritte, die zur Ubiquitinierung eines ausgewählten Proteins führen, ermöglicht eine beachtliche Substratspezifität. Ist für die Aktivierung des Ubiquitins in Hefe nur ein E1-Enzym verantwortlich, so kann die Übertragung auf mehrere verschiedene E2-Enzyme erfolgen. Diese interagieren wiederum jeweils spezifisch mit ein oder mehreren E3-Enzymen. Ebenfalls kann die Bindung von Substratproteinen an die Ubiquitinligasen durch ligaseassoziierte Faktoren reguliert werden.

In dieser Arbeit soll die Interaktion von Ubiquitinligasen mit ihren Ubiquitin-konjugierenden Enzymen sowie die stimulierende Wirkung der E3s auf die Substratubiquitinierung näher betrachtet werden. Auch Unterschiede in der Ubiquitinierung verschiedener Substratproteine werden hierbei untersucht. Die Ubiquitinierung der meisten Proteine findet durch Bildung einer Peptidbindung zwischen der Carboxygruppe des C-terminalen Glycins des Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Zielprotein statt. Die Auswahl eines bestimmten Lysins ist dabei nicht in jedem Fall zwingend erforderlich. Für einige ubiquitinierte Proteine ist die Position des modifizierten Lysinrestes nicht für deren Schicksal entscheidend.

1.4 Mono- oder Polyubiquitinierung

Proteine können nur an einem aber auch an mehreren Lysinen ubiquitiniert sein. Man spricht dementsprechend von Mono- bzw. von multipler Monoubiquitinierung. Eine solche Proteinmodifikation ändert die Funktion oder das Schicksal des betroffenen Proteins. Monoubiquitinierung kann beispielsweise das Signal für eine Kinase zur Phosphorylierung des Proteins sein. In einem anderen Fall ist die Monoubiquitinierung eines in die Plasmamembran integrierten Proteins das Signal für dessen endozytotische Internalisierung und Abbau über den MVB-Abbauweg [7]. Zudem kann die Monoubiquitinierung von Histonen die Organisation der DNA und somit die Transkription verschiedener Gene beeinflussen [8].

An einigen E2-E3-Komplexen kommt es nach einer initialen Ubiquitinierung eines Substratproteins zur Verknüpfung weiterer Ubiquitinmoleküle auf dem bereits konjugierten Ubiquitinmolekül. Verschiedene Ubiquitin-konjugierende Enzyme erzeugen oft sehr spezielle Ubiquitin-Ubiquitin-Konjugationen durch Verknüpfung eines Ubiquitins auf ein bestimmtes der sieben in Ubiquitin enthaltenen Lysinreste (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63). Wiederholte Konjugation von Ubiquitinmolekülen führt zur Bildung einer Ubiquitinkette. Auf diese Weise entstehen in *S. cerevisiae* durch Wechselwirkung des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Cdc34 mit dem SCF-Cullin-RING-Ligasekomplex vorrangig K48-verknüpfte Ubiquitinketten [9]. Der heterodimere E2-Komplex aus Mms2 und Ubc13 katalysiert bevorzugt die Bildung von K63-Polyubiquitin [10] und das humane E2 UbcH10 wirkt in menschlichen Zellen mit dem APC (Anaphase Promoting Complex) bei der K11-Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen zusammen [11]. Es kann auch zur Bildung einer gemischten Kette kommen, in der die Ubiquitinmoleküle an unterschiedlichen Lysinresten miteinander verbunden sind. Weiterhin besteht die Möglichkeit zu einer verzweigten Polyubiquitinierung, wobei Ubiquitinmoleküle einer Kette an zwei oder mehr Lysinen gleichzeitig modifiziert werden. Eine „Arbeitsteilung“ zweier verschiedener Ubiquitin-konjugierenden Enzyme am APC-Komplex in der Hefe konnte bereits nachgewiesen werden. Hier erfolgt die Monoubiquitinierung eines Substratproteins durch Ubc4. Erst diese initiale Modifikation ermöglicht es, Ubc1 an den Komplex zu binden und die Ubiquitinierung durch Anheftung K48-verknüpfter Ubiquitinmoleküle zu verlängern.

Einleitung

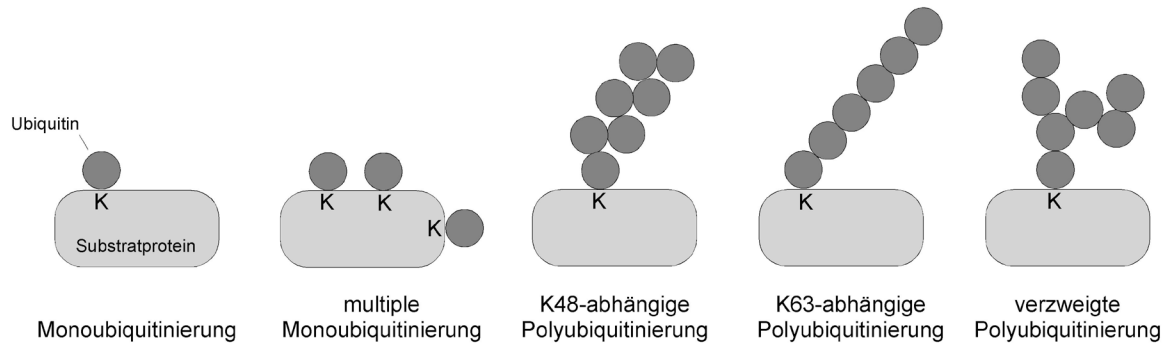


Abbildung 2: Verschiedene Formen der Ubiquitinierung von Proteinen über einen Lysinrest. Neben einfacher und mehrfacher Modifikation eines Substratproteins mit Monoubiquitin, können auch unterschiedliche Polyubiquitinketten auf dem Substrat konjugiert werden.

1.5 E4-Enzyme

Neben den für die Ubiquitinierung erforderlichen Enzymen E1, E2 und E3 ist eine weitere Enzymgruppe beschrieben, die ebenfalls an der Polyubiquitinierung von Substraten beteiligt ist bzw. bereits synthetisierte Ubiquitinketten modifiziert. Diese sogenannten E4-Enzyme besitzen ein zur RING-Domäne strukturell ähnliches U-Box-Motiv [12]. Dem am besten charakterisierten E4, Ufd2, wurde ursprünglich eine wichtige Funktion beim Abbau (UFD) aminoterminal ubiquitiniertes Proteine (Ubiquitin-Fusionen) zugeschrieben. Ufd2 modifiziert jedoch auch verschiedene oligoubiquitinierte Konjugate (ein bis drei verknüpfte Ubiquitinmoleküle). Ufd2 ist in der Lage, sowohl ein E2 als auch Ubiquitin-Protein-Konjugate zu binden und die vorhandenen niedermolekularen Ubiquitinketten zu verlängern [13,14]. Dabei kann die Verknüpfung der durch Ufd2 konjugierten Ubiquitinmoleküle, von der Verknüpfung der durch E2 und E3 geformten Ubiquitinkette abweichen. Niedrigmolekulare bzw. Oligoubiquitinketten können weiterhin das Ergebnis einer partiellen Deubiquitinierung einer Kette sein.

1.6 Deubiquitinierende Enzyme

Die Anzahl der deubiquitinierenden Enzyme (DUBs) in einer Zelle ist groß und ihre Funktion in verschiedenen zellulären Prozessen ebenso wichtig wie die Ubiquitinierung selbst. DUBs oder USPs (ubiquitin-specific proteases) werden nicht nur für das Recycling der Ubiquitinmoleküle von substratkonjugierten Ubiquitinketten am Proteasom benötigt. Eine starke Deubiquitinierung von polyubiquitinierten Substraten kann diese sogar vor Degradation durch das Proteasom schützen. Vor allem aber beein-

flussen DUBs die Signalwirkung von monoubiquitinierten Proteinen, da sie die Modifikation dieser Proteine mit Ubiquitin reversibel machen.

1.7 Funktionen verschiedener Polyubiquitinierungen

Für substratkonjugierte, unverzweigte Ubiquitinketten wurde bisher eine Vielzahl von Funktionen beschrieben, die nahezu alle zellulären Prozesse beeinflusst. Wie bereits erwähnt wurde, ist das vorrangige Schicksal von Proteinen, auf denen K48-verknüpfte Ubiquitinketten ligiert wurden, deren Abbau durch das 26S Proteasom [15]. Dabei spielt die Länge der Ubiquitinkette eine nicht unwesentliche Rolle, da die Affinität freier Tetraubiquitinketten für das Proteasom etwa 100-fach höher ist als die Affinität von Diubiquitin [16]. Doch auch K63-polyubiquitinierte Substrate wurden als proteasomale Substrate identifiziert [17,18], und eine Inhibierung des Proteasoms führte zur Anreicherung sowohl von K48- als auch von K63-verknüpften polyubiquitinierten Proteinkonjugaten. Darüberhinaus liefern neuere Untersuchungen Belege über eine Funktion von konjugierten K11-verknüpften Ubiquitinketten bei der Zellzyklusregulation durch Förderung der proteasomalen Proteindegradation [11,19]. Die Gesamtheit der Prozesse, bei denen die Ubiquitinierung eines Substratproteins schließlich zum Abbau dieses Proteins am 26S Proteasom führt, wird als Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) bezeichnet.

K63-verknüpfte Polyubiquitinkonjugate haben aber auch Funktionen bei der Regulation der Lokalisierung oder Aktivität ihrer Trägerproteine, oder sie vermitteln selektive Autophagie von depolarisierten Mitochondrien [20]. K29-verknüpfte Ketten hingegen spielen eine wichtige Rolle im UFD (ubiquitin-fusion-degradation) -Signalweg, und selbst DNA-Reparatur-Mechanismen können über eine Proteinmodifikation mit K6-verknüpften Ubiquitinketten reguliert werden. Die Art der Verknüpfung von Ubiquitinketten innerhalb einer Ubiquitinkette spielt bei den Untersuchungen in dieser Arbeit eine wichtige Rolle, da bei Betrachtung verschiedener E2s an einer Ligase unterschiedlich verknüpfte Ubiquitinketten mit differenzierten Auswirkungen auf das Substratprotein auftreten können.

1.8 Ubiquitin-bindende Domänen

Die unterschiedlichen Reaktionen auf eine Proteinubiquitinierung werden durch Ubiquitin-bindende Motive ermöglicht, die nicht-kovalent mit Ubiquitin interagieren. So existieren zahlreiche verschiedene Ubiquitin-bindende Domänen [21], die in einer großen Anzahl von Proteinen vorliegen und Ubiquitin mit unterschiedlicher Affinität

Einleitung

binden. Für nahezu alle Ubiquitin-bindenden Motive ist die Interaktion mit einem bestimmten hydrophoben Bereich, besonders mit dem Isoleucin an Position 44 (Ile44) des Ubiquitinmoleküls, erforderlich [22]. In der großen Gruppe der α -helikalen UBDs formen UBA- (ubiquitin- associated) und CUE-Motive (coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation) strukturell ähnliche, kompakte ubiquitinbindende Bereiche aus jeweils drei α -Helices [23]. Beide Motive haben die Fähigkeit Polyubiquitin zu binden. Auch Monoubiquitin wird von einigen Mitgliedern beider Klassen gebunden, wobei die Affinität der UBA- oder CUE-Domäne zum Ubiquitinmolekül hier sehr gering ist. Beide Domänen umfassen etwa 40 Aminosäuren, unterscheiden sich jedoch in der Sequenzlänge der einzelnen Helices sowie in den stark konservierten Aminosäuren. Ist für die Funktion der UBA-Domänen ein MGF-Motiv (Methionin-Glycin-Phenylalanin), mit besonderer Wichtigkeit des Glycin-Restes, notwendig, so erfordert die Bindung von Ubiquitin an eine CUE-Domäne ein MFP (Methionin-Phenylalanin-Prolin) -Motiv mit hochkonserviertem Prolin sowie ein am C-Terminus der CUE-Domäne gelegenes Di-Leucin [24,25].

Sowohl für CUE-Domänen als auch für UIM-Motive konnte gezeigt werden, dass Proteine, die diese Domänen aufweisen, oft selbst monoubiquitiniert werden und die Anwesenheit der UBDs eine Voraussetzung für diese Monoubiquitinierung ist [26,27]. Dabei ist eine E3-unabhängige E2-Rekrutierung und *cis*-Ligaseaktivität durch die Ubiquitin-bindende Domäne möglich. Darüberhinaus kann die Bindung der UBD an das *cis*-Ubiquitin zu einer Konformationsänderung des Proteins führen [28]. Die Ubiquitin-bindenden Eigenschaften einer speziellen CUE-Domäne und der daraus resultierenden Wirkung auf die Ubiquitinierungsreaktion eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms sollen in dieser Arbeit näher betrachtet werden. Die Bindung mehrerer Ubiquitinmoleküle einer Ubiquitinkette ist durch die Kombination unterschiedlicher, oder als Tandem- bzw. Triplett-Wiederholungen auftretender UBDs innerhalb eines Proteins realisierbar. Dabei kann die Art der Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle untereinander, welche sich in der Struktur der Kette widerspiegelt, durchaus für deren Bindung an die UBDs entscheidend sein [29]. Verschieden verknüpfte Ubiquitinketten können aber auch an einzeln stehende UBDs mit unterschiedlicher Affinität binden [30,31,32]. Dies ist zum Beispiel bei der Erkennung ubiquitiniertes Proteine am 26S Proteasom von Vorteil, da nicht alle polyubiquitinierten Substrate, sozusagen „wahllos“, durch Proteolyse abgebaut werden sollen. In einigen Fällen, wie bei der CUE-Domäne von Vps9 oder der UBA-Domäne von Dsk2,

führt die Homo-Dimerisierung der UBDs zweier Vps9- bzw. Dsk2-Moleküle zu einer erhöhten Bindungsaffinität entweder für Monoubiquitin (Vps9) oder Polyubiquitin (Dsk2) [24,33] .

1.9 Ubiquitin-ähnliche Domänen

Ubiquitin-bindende Domänen können jedoch nicht nur mit Ubiquitin selbst interagieren sondern auch mit Ubiquitin-ähnlichen Proteindomänen. Diese Motive, UBL (ubiquitin-like) oder UBX (ubiquitin regulatory X), besitzen die gleiche Tertiärstruktur wie Ubiquitin, obwohl die Aminosäuresequenz kaum Ähnlichkeiten aufweisen. Viele der Proteine, welche eine UBX- oder UBX-ähnliche Domäne enthalten, sind mit der AAA-ATPase Cdc48 (p97 oder VCP in Säugern) assoziiert. Generell funktionieren Proteine mit UBL- und UBX-Domänen, die häufig zusätzliche Ubiquitin-bindende Domänen besitzen, oftmals als Adapterproteine für ubiquitinierte Substrate, wobei die zelluläre Reaktion auf ein ubiquitiniertes Substrat durch die Bindung an bestimmte Adapterproteine variabel gestaltet bzw. reguliert werden kann.

1.10 Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Proteindegradation (ERAD)

Wie bereits beschrieben, ist Proteinubiquitinierung eine wichtige Voraussetzung für die Erkennung und den Abbau von Substratproteinen durch das 26S Proteasom. Viele der E2-E3-Komplexe befinden sich im Zytosol oder dem Zellkern, um lösliche Proteine für den Abbau zu markieren. Es gibt jedoch auch einen Mechanismus, der membrangebundene Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sowie sekretorische Proteine für den proteasomalen Abbau ubiquitiniert: Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Proteindegradation (ERAD). Die Kernbestandteile des ERAD-Signalweges in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind zwei ER-membranständige RING-Ubiquitinligasen, Hrd1 und Doa10, die jeweils in Interaktion mit diversen assoziierten Faktoren größere Ubiquitinierungskomplexe formen. Die Funktion beider Ligasen und deren Wechselwirkung mit den jeweils assoziierten E2s sowie weiterer interagierender Faktoren ist Gegenstand der im Ergebnisteil dargestellten Versuche.

1.11 RING-Ligasen in ERAD

Hrd1 (Hmg-CoA reductase degradation 1), oft auch als Der3 bezeichnet, ist eine RING-Ligase, welche durch sechs Transmembranbereiche in die ER-Membran inseriert ist. Der zytosolische carboxyterminale Bereich des 551 Aminosäuren großen Proteins enthält die RING-Domäne [34,35] . Hrd1 bildet einen stabilen Komplex mit

Einleitung

Hrd3, einem einfach die Membran durchspannenden Protein mit großer ER-luminaler Domäne. In Abwesenheit von Hrd3 ist Hrd1 instabil, da es sich unter diesen Bedingungen, unter Beteiligung assoziierter E2-Enzyme, selbst ubiquitiniert und infolgedessen abgebaut wird. Auf zytosolischer Seite der ER-Membran interagiert Hrd1 nicht nur mit Ubiquitin-konjugierenden Enzymen, sondern auch mit Usa1. Dieses Protein besitzt zwei Transmembranbereiche, wobei N- und C-Terminus im Zytosol lokalisiert sind. Der N-terminale Bereich von Usa1 enthält eine UBL-Domäne und bewirkt die Oligomerisierung des Hrd1. Es konnte gezeigt werden, dass eine Oligomerbildung des Hrd1 speziell für den Abbau von ER-membrangebundenen Substratproteinen notwendig ist [36]. Der C-Terminus des Usa1 bewirkt eine Wechselwirkung mit dem ebenfalls in die ER-Membran integrierten Der1 [37]. Die Assoziation von Der1 zu Hrd1 ist für die Fähigkeit der Ligase, ER-luminale Proteine für den Abbau zu ubiquitinieren, erforderlich [38,39]. Aufgrund der zahlreichen assoziierten Faktoren, welche entweder selbst Substrate binden oder die Substratbindung regulieren, ist es wahrscheinlich nicht korrekt, Hrd1 als klassische „single-subunit“ RING-Ligase zu bezeichnen, obwohl sie vom Aufbau der allgemein bekannten „multi-subunit“-Cullin-Ligasekomplexe abweicht.

Im Gegensatz zu Hrd1, ist über interagierende Faktoren an der Doa10-Ligase, neben den E2-Enzymen, nur wenig bekannt. Doa10 (*SSM4*), ebenfalls eine RING-E3-Ligase, weist 14 Transmembranbereiche sowie eine am N-Terminus des Proteins gelegene ungewöhnliche RING-CH-Domäne auf [40,41]. Doa10 befindet sich nicht nur an der Membran des Endoplasmatischen Retikulum, sondern auch in der inneren Membran der Kernhülle, wo es für Ubiquitinierung von nukleären Proteinen verantwortlich ist [42]. Die Entdeckung von Doa10 geht auf seine Funktion beim Abbau des löslichen zytosolischen Mat alpha-Faktors zurück (Degradation of alpha factor). Mat alpha verfügt an seinem N-terminus über eine 67 Aminosäuren umfassende α -Helix, die wahrscheinlich der Erkennung des alpha-Faktors durch den Ligasekomplex dient und den Abbau von Mat alpha einleitet. Eine Fusion dieses Degradationssignals oder Degrons (Deg1) an andere Proteine bewirkt ebenfalls deren Doa10-abhängigen Abbau. Hingegen werden viele andere lösliche zytosolische und nukleäre Proteine durch die ebenfalls löslichen Ubiquitin-Ligasen Ubr1 oder San1 für die Degradation am Proteasom ubiquitiniert.

1.12 In ERAD involvierte Ubiquitin-konjugierende Enzyme

Sowohl Hrd1 als auch Doa10 interagieren mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc7. Dieses eigentlich zytosolische E2 wird über Bindung durch das integrale ER-Membranprotein Cue1 (coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation) selbst an die ER-Membran rekrutiert und somit in räumliche Nähe zu den E3-Ligasekomplexen gebracht. In Abwesenheit von Cue1 verbleibt Ubc7 im Zytosol und erfährt aufgrund der fehlenden Stabilisierung durch Cue1 eine Autoubiquitinierung auf seinem katalytisch aktiven Cystein. An dieser Reaktion, die zum proteasomalen Abbau von Ubc7 führt, ist die zytosolische Ufd4 HECT-Ligase beteiligt [43]. Ubc7 gehört zur Klasse I der E2s da es fast ausschließlich aus der etwa 150 Aminosäuren langen Kern-Domäne aufgebaut ist [44]. Charakteristisch für Ubc7 ist eine schleifenförmige Insertion von 13 Aminosäuren C-terminal des katalytisch aktiven Cysteins, die sonst nur noch in dem E2 Cdc34 auftritt, sowie eine einzelne Aminosäureinsertion zwischen zwei Strängen des antiparallelen β -Faltblattes. Es wird vermutet, dass diese hypervariablen Regionen zu einer spezifischen Interaktion des Ubc7 mit den ERAD-Ligasen beitragen und möglicherweise an der Bildung bestimmter Polyubiquitin-Verknüpfungen beteiligt sind. Die Funktion des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc7 ist bei der Ubiquitinierung von ERAD-Substratproteinen von enormer Wichtigkeit, da es als einziges E2 an beiden Ligasen aktiv ist. Deshalb soll in dieser Arbeit die Interaktion von Ubc7 mit den Ligasen durch *in vivo*- und *in vitro*- Versuche näher charakterisiert werden. Dabei soll die für Ubc7 charakteristische schleifenförmige Insertion besonders betrachtet werden, da sie möglicherweise einen Einfluss auf die Interaktion mit den Ligasen und somit auf die Ubiquitinierungsaktivität hat.

Einleitung

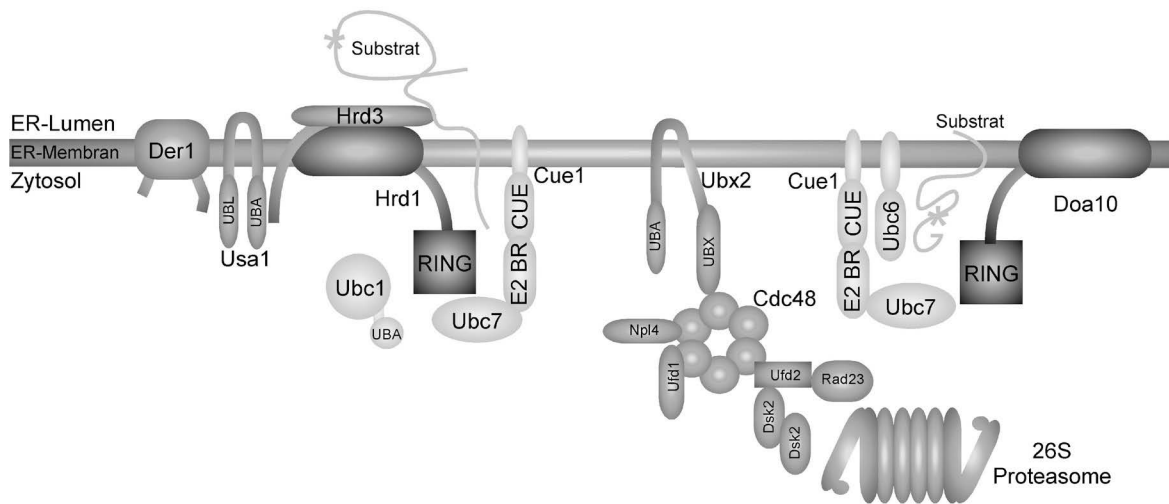


Abbildung 3: Schematische Darstellung ER-assoziierten Proteindegradation (ERAD). Die RING-Ligasen Hrd1 und Doa10 binden die Substratproteine selbst oder über assoziierte Faktoren. Die Ubiquitinierung der Substrate erfolgt durch die Wechselwirkung von Cue1/Ubc7 sowie Ubc1 oder Ubc6 mit den Ligasen. ER-Membranrekrutierung der Transportkette des Substrats zum Proteasom durch Ubx2.

Die Bindung von Ubc7 an seinen Co-Faktor Cue1 erfolgt über eine carboxyterminale Binderegion in Cue1. Neben dem N-terminalen Transmembranbereich verfügt Cue1 über eine CUE-Domäne. Könnte für CUE-Domänen verschiedener Proteine eine hohe Affinität für Mono- oder Polyubiquitin nachgewiesen werden, so besitzt die CUE-Domäne in Cue1 nicht die Fähigkeit zur Monoubiquitin-Bindung und auch die schwache Polyubiquitinbindung blieb mehrere Jahre unentdeckt [45]. Cue1 ist im Komplex mit Ubc7 mit beiden ERAD-Ligasen assoziiert. Es ist bisher aber nicht genau geklärt, ob Cue1 über eine eigene Bindestelle an den Ligasen verfügt, oder ob eine Assoziation von Cue1 mit den Ligasen über die Ubc7-Wechselwirkung mit Hrd1 oder Doa10 vermittelt wird. Die Rolle des Ubc7-bindenden Cue1-Proteins, und speziell der in Cue1 enthaltenen CUE-Domäne im Ubiquitinierungsprozess wurde bisher wenig untersucht. Aus diesem Grund soll mit Hilfe der im Ergebnisteil dieser Arbeit beschriebenen Versuche geklärt werden, ob sich neben der Rekrutierung des Ubc7 an die ER-Membran noch eine weitere Funktion für Cue1 in ERAD beschreiben lässt und ob die CUE-Domäne eventuell für die Substratubiquitinierung oder den Substrat-Transfer an nachfolgende Transportproteine notwendig ist.

An der Substratubiquitinierung durch Hrd1 ist möglicherweise neben Ubc7 auch Ubc1 beteiligt. Obwohl es an der ER-Membran detektierbar ist, wurde der ER-membranrekrutierende Faktor für dieses löslichen E2 bislang nicht gefunden. Ubc1

Einleitung

spielt eine wichtige Rolle bei der Verlängerung von substratkonjugierten Ubiquitinketten am APC-Komplex, hat aber auch einen geringen Einfluss auf den Abbau von Hrd1-abhängigen Substratproteinen [34,46] . Ein Nachweis für eine physikalische Interaktion von Ubc1 mit Hrd1 steht aber aus.

Auch Doa10 interagiert mit einem zweiten Ubiquitin-konjugierenden Enzym, Ubc6, welches selbst über einen C-terminalen Bereich in die ER-Membran inseriert. Die Ubiquitinierung von Substratproteinen an der Doa10-Ligase ist von der katalytischen Aktivität beider assoziierter E2s, Ubc6 und Ubc7, abhängig [47,48,49] . Inaktivität eines der beiden Enzyme bedeutet eine Stabilisierung des Substrats, die der einer *ubc6/ubc7*-Doppelmutante bzw. einer *doa10-RING*-Mutante gleicht. Ubc6 ist ein kurzlebiges Protein und wird selbst als Doa10-abhängiges Substrat abgebaut. Hieraus ergibt sich eine weitere Fragestellung, die in dieser Arbeit behandelt werden soll: Während die Ubiquitinierung der Substratproteine an der Hrd1-Ligase fast allein durch Ubc7 durchgeführt wird, ist für die Ubiquitinierungsreaktion an der Doa10-Ligase und den nachfolgenden Substratabbau ein zweites E2, Ubc6, unbedingt notwendig. Wie unterscheidet sich die Substratubiquitinierung durch das Ubc7/Cue1-Heterodimer an Hrd1 von jener an Doa10? Wie interagieren die beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc6 und Ubc7 an Doa10 und welchen Einfluss hat jeweils die einzelne Aktivität der beiden Enzyme auf den Doa10-abhängigen Substratabbau?

1.13 Transfer der ubiquitinierten Proteine zum 26S Proteasom

Die erfolgreiche Ubiquitinierung der Substratproteine aktiviert und rekrutiert weitere sowohl membrangebundene als auch lösliche Faktoren, die an der Freisetzung der Substrate aus der ER-Membran bzw. dem membrangebundenen Ubiquitinierungskomplex beteiligt sind. Das integrale ER-Membranprotein Ubx2 ist mit beiden ERAD-Ligasen assoziiert und rekrutiert über seine C-terminale UBX-Domäne den zytosolischen Cdc48-Komplex an die Ligasen [50,51] . Das molekulare Chaperon Cdc48 (p97 in Säugerzellen) ist ein hoch konserviertes Mitglied einer Gruppe von AAA-ATPasen (ATPase associated with diverse cellular activities) und formt einen homohexameren Komplex mit zylindrischer Struktur. Die Bindung von verschiedenen ubiquitinierten Proteinen oder Proteinen mit Ubiquitin-ähnlichen Domänen kann durch Cdc48 selbst oder aber durch die mit der N-terminalen Domäne von Cdc48 assoziierten Adapterproteine, in ERAD meist Npl4 und Ufd1, erfolgen [52,53] . Es wird nach wie vor spekuliert, ob Cdc48 durch seine ATP-abhängige Konformationsänderung eine Kraft generiert, die ein „Herausziehen“ der Substrate aus der Memb-

Einleitung

ran oder aus dem Ligasekomplex bewirkt. Viel wahrscheinlicher ist jedoch die „Segregase-“, oder „Unfoldase-“, Aktivität, d. h. eine durch Cdc48 bewirkte strukturelle Veränderung bzw. Entfaltung des Substrats oder der membran-gebundenen Ligasekomponenten, die eine Ablösung des Substrats von der Membran erlaubt [54,55] .

Ein weiteres mit Cdc48 interagierendes Protein ist das bereits beschriebene E4, Ufd2, welches die Ubiquitinierung bereits oligoubiquitiniertes Substratproteine modifiziert. Darüber hinaus interagiert Ufd2 wiederum mit weiteren Proteinen, z.B. Rad23 und Dsk2, die mit Hilfe ihrer UBA Domäne ubiquitinierte Substrate binden und transportieren können. Rad23 bindet über seine Ubiquitin-ähnliche Domäne direkt an das 26S Proteasom. Auf einem parallelen Weg kann die durch ein Dsk2-Homodimer gebundene substratkonjugierte Ubiquitinkette gleichzeitig mit dem UIM-Motiv der proteasomalen Untereinheit Rpn10 wechselwirken. In beiden Fällen kann auf diese Weise das Substratprotein dem Abbau durch das Proteasom zugeführt werden [56] . Aufgrund der Ubiquitin-bindenden Eigenschaft des Rpn10 im Deckel und der ATPase Aktivität an der Basis des 19S regulatorischen Komplexes wird zudem eine direktere Rolle des Proteasoms bei der Bindung ubiquitiniertes Substrate unter Umgehung der Ufd2-Funktion oder sogar der Cdc48-Funktion diskutiert.

1.14 ERAD-Substrate

Neben generell kurzlebigen Proteinen und Proteinen, die ein definiertes Degradationssignal aufweisen, werden über den ERAD-Abbauweg zumeist Proteine mit fehlerhafter, nicht-nativer Konformation degradiert. Die Gründe für Proteinefehlfaltungen sind verschieden. Zum einen können genetisch kodierte Mutationen eine veränderte Struktur des synthetisierten Proteins hervorrufen. Ebenso führt der Verlust einer Untereinheit eines Proteinkomplexes oftmals zur Fehlfaltung der verbleibenden „Waisen“-Untereinheiten. Doch auch externe Faktoren, wie z.B. Hitzeeinwirkung, können strukturelle Veränderungen bei einem Protein auslösen. Fehlerhaft gefaltete Proteine können eine veränderte Funktion in den Zellen ausüben oder zytotoxisch wirken. Auch die Aggregation fehlerhafter Proteine hat zellschädigendes Potential. Besondere Stressbedingungen wirken hauptsächlich auf die Faltungsvorgänge an Proteinen im ER [57] . Eine Anhäufung fehlerhaft gefalteter Proteine im ER findet z.B. bei oxidativem Stress, Mangel an Glukose oder nach viraler Infektion der Zelle statt [58] . In allen Fällen sind reife Proteine nicht mehr in der Lage ihre native Konformation zu erlangen. Sie werden über spezielle Protein-Qualitäts-Kontrollmechanismen erkannt und an die entsprechende Ligase zur Ubiquitinierung vermittelt. Allerdings gibt

Einleitung

es definierte Unterschiede in der Art der Substratproteine und der Position ihrer zum Abbau führenden Degradationssignale oder Faltungsfehler. So lassen sich die ERAD-abhängigen Substratproteine in 3 größere Klassen oder Abbauege einteilen: ERAD-C, ERAD-M und ERAD-L [37] .

ERAD-C dient dem Abbau löslicher zytosolischer Proteine oder aber ER-membrangebundener Proteine, die einen Defekt oder ein Abbausignal auf der zytosolischen Seite der ER-Membran aufweisen. Solche Substrate werden Doa10-abhängig ubiquitiniert. Genaue Erkenntnisse über die Erkennung der fehlerhaften oder kurzlebigen Proteine durch die Doa10-Ligase gibt es bislang aber nicht. Es ist möglich, dass Doa10 die Substrate direkt bindet, z.B. an einem größeren zytosolischen Bereich zwischen den Transmembranbereichen 2 und 3 oder 8 und 9 von Doa10. Eine indirekte Bindung der Substrate über Adapterproteine oder zytosolische Hsp70- oder Hp90-Chaperone ist ebenfalls denkbar. Über ERAD-M erfolgt der Abbau integrale ER-Membranproteine, die Defekte innerhalb ihrer Transmembranbereiche oder auf der ER-luminalen Seite aufweisen. Diese Substrate werden durch E2-E3-Wechselwirkung am oligomerisierten Hrd1-Ligase-Komplex ubiquitiniert. Auch bei diesen Proteinen ist nicht bekannt, wie ihre Erkennung und ihre Bindung an die Ligase erfolgt. Neben Hrd1 selbst könnten weitere Untereinheiten des Ligasekomplexes, z.B. Hrd3, oder Co-Faktoren für diese Aufgabe verantwortlich sein. Die Rekrutierung von bestimmten Substraten an die Hrd1-Ligase und nachfolgendem Substratabbau kann aber auch in $\Delta hrd3$ -Zellen durch Überexpression von *HRD1* erreicht werden [59] . Eine Hrd3-abhängige Substratrekrutierung wurde für die Gruppe von löslichen ER-luminalen Substraten beschrieben, die über den ERAD-L-Weg abgebaut werden. Denn bei der Erkennung und Bindung dieser Proteine auf der luminalen Seite der ER-Membran spielt das mit Hrd1 komplexierte Hrd3 eine entscheidende Rolle. Um diesen Substratrekrutierungs-Mechanismus nachzuvollziehen ist es jedoch notwendig, bestimmte Prozesse und Modifikationen an den zumeist sekretorischen Substratproteinen im ER zu betrachten.

1.15 Erkennung fehlerhaft gefalteter Proteine im ER

Die meisten Proteine, die eine Funktion in verschiedenen Zellorganellen oder an der Plasmamembran erfüllen, gelangen noch während ihrer Translation durch Translokation am Sec61-Proteinkomplex in das Endoplasmatische Retikulum. Über den sekretorischen Weg werden diese Proteine zunächst in den Golgi-Apparat und schließlich zu ihren eigentlichen Bestimmungsorten transportiert. Im ER findet die eigentliche

Einleitung

Reifung der Proteine, d. h. die Faltung, Disulfidbrückenbildung, N-Glykosylierung und Bildung von oligomeren Quartärstrukturen statt. Hierbei können Fehler auftreten, so dass ein Protein nicht seine native Konformation erreicht. Mit Hilfe des Chaperons Kar2 und der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) kann das Protein bei der Faltung unterstützt bzw. korrigiert werden. Gelingt dies in einem gewissen Zeitraum nicht, werden solche Proteine sowohl über ihre fehlerhaften Bereiche als auch zusätzlich über eine veränderte Struktur ihrer N-Glykosylierung von verschiedenen substratrekrutierenden Faktoren (Kar2, Yos9) erkannt, gebunden und an die luminaire Domäne von Hrd3 transportiert [60,61], welche eine Substratbindestelle des Hrd-Ligase-Komplexes darstellt. Nicht alle sekretorischen Proteine werden glykosyliert. Es müssen demnach weitere Mechanismen zur Erkennung falsch gefalteter Proteine nebeneinander existieren. So kann z.B. Hrd3 auch in Abwesenheit von Yos9 Substratproteine an die luminaire Seite der ER-Membran rekrutieren.

1.16 UPR

Die Protein-Qualitätskontrolle im ER dient demnach der Kontrolle des „Reifungs“-zustandes der sekretorischen Proteine und verhindert durch permanente Selektion eine Überlastung der Faltungskapazität des ER aufgrund von Faltungsintermediaten. Ist das Ausmaß der Proteinfehlfaltung jedoch zu groß oder gelingt es den am ERAD beteiligten Komponenten nicht, in ausreichendem Umfang den Abbau der defekten sekretorischen Proteine vorzubereiten, so reagiert die Zelle mit dem UPR-Signalweg, der „unfolded proteine response“ [62]. Im Gegensatz zu Zellen höherer Eukaryonten, bei denen diese Zellantwort durch 3 integrale ER-Membranproteine (IRE1, PERK und ATF6) initiiert wird, existiert in *S. cerevisiae* nur Ire1 als Vermittler der UPR. Die Dimerisierung von Ire1, nach Dissoziation des ER-luminalen Stresssensors Kar2, aktiviert die zytosolische Endoribonuklease-Funktion von Ire1, woraufhin bei der Hac1 mRNA ein Intron herausgeschnitten wird. Das synthetisierte Hac1-Protein, ein Transkriptionsfaktor, kann nun an definierte Bereiche der DNA (UPRE, UPR-response elements) bestimmter Ziel-Gene binden und deren Expression regulieren. Die Kombination der Vorgänge nach Aktivierung der UPR zielt zunächst auf den Schutz und Erhalt des Zellstoffwechsel ab, kann aber bei lang anhaltenden ungünstigen Bedingungen den Zelltod (Apoptose) induzieren [63].

1.17 Protein-Dislokation

Im Falle eines funktionierenden ERAD findet die Ubiquitinierung fehlgefalteter ER-luminaler Substratproteine sowie ihre Proteolyse am Ubiquitinierungskomplex auf der zytosolischen Seite der ER-Membran statt. Die Mechanismen, die zur Dislokation bzw. Retrotranslokation der Substratproteine vom ER-Lumen ins Zytosol führen, sind trotz intensiver Forschung weiterhin ungeklärt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Hinweise und Teilbelege darüber, welche Proteine an der Dislokation beteiligt sind. Vielleicht gibt es nicht nur den einen, sondern mehrere Prozesse, die eine Protein-Dislokation bewirken. Ein vielfach diskutierter Mechanismus ist die Rück-Passage der als fehlerhaft erkannten Proteine durch das Sec61-Translokon, welches bereits für den Import von neusynthetisierten Proteinen in das ER essentiell ist. Für eine Rolle des Sec61-Translokons bei der Dislokation spricht die Assoziation von Sec61 sowohl mit der Hrd-Ligase als auch mit einem ins ER importierten und glykosylierten ERAD-Substratprotein [64,65]. Dagegen spricht die Größe der Translokationspore, die gerade breit genug ist, um eine ungefaltete Polypeptidkette hindurchzulassen. Die im ERAD-Prozess retro-translozierten Proteine sind jedoch oft glykosyliert und nicht komplett entfaltet [66]. Des Weiteren wurde postuliert, dass sogenannte *lipid droplets* Proteine zurück ins Zytosol transportieren. *lipid droplets* sind zelluläre Kompartimente, die sich durch eine einlagige Phospholipidschicht vom Zytosol abgrenzen und zahlreiche Proteine sowie Fettsäuren und Cholesterole transportieren [67]. Die Bildung von *lipid droplets* wird durch ER-Stress, wie er z.B. bei erhöhter Proteinfaltung auftritt, stimuliert. Neueren Erkenntnissen zufolge formieren sich *lipid droplets* aber nicht wie bisher angenommen aus der ER-Membran, sondern einem der Membran angrenzenden Bereich [68], welches gegen den Transport ER-luminaler Proteine in diesen Kompartimenten spricht.

Für die Bildung eines Dislokationskanals kommen auch die Ligasen selbst sowie die mit ihnen assoziierten Co-Faktoren in Frage. Die zahlreichen Transmembranbereiche in Hrd1, Der1 und Usa1 könnten einen Kanal bilden, der den Transport von ER-luminalen Substratproteinen ins Zytosol erlaubt. Dies hätte den entscheidenden Vorteil, dass die Substraterkennung und -bindung durch das Hrd1-assoziierte Hrd3 auf der ER-luminalen Seite direkt mit der Ubiquitinierung der Proteine auf zytosolischer Seite gekoppelt wäre. Für die Retrotranslokation von Substratproteinen via Sec61 oder *lipid droplets* müsste eine zusätzliche Substraterkennung im Zytosol stattfinden, welche die Proteine der Ubiquitinierung durch die Ligasen zuführt.

Einleitung

Ubiquitinierung ist jedoch nicht nur eine Folge der Dislokation von Substratproteinen, sondern auch eine Voraussetzung dafür, da eine Inhibierung des Ubiquitinierungsprozesses den Rücktransport ER-luminaler Proteine ins Zytosol verhindert.

1.18 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie beschrieben, ist die Ubiquitinierung von ERAD-Substratproteinen durch Ubc7 in Wechselwirkung der Hrd1-Ligase ein zentraler Prozess im Abbauweg von ERAD-M und ERAD-L-Substraten. Diese Arbeit soll sowohl durch *in vivo* Interaktionsstudien und Versuchen zum Substratabbau als auch durch *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen der Charakterisierung dieser E2-E3-Interaktion dienen. Dabei wird auch die Funktion des Ubc7-rekrutierenden Faktors Cue1 und im speziellen die Rolle der Cue1-CUE-Domäne im Ubiquitinierungsprozess genauer untersucht. Im Gegensatz zum Hrd1-abhängigen Substratabbau ist am Abbau von Proteinen über die Doa10-Ligase neben Ubc7 auch Ubc6 unbedingt erforderlich. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Ubiquitinierungsaktivität von Ubc6 und dessen Wechselwirkungen mit Ubc7/Cue1 sowie der Doa10-Ligase, sollen zu einer genaueren Charakterisierung der Funktion dieses Ubiquitin-konjugierenden Enzyms beim Abbau von ERAD-C-Substraten beitragen.

2 Ergebnisse

2.1 *In vitro* Ubiquitinierung

Eine detaillierte Charakterisierung der zur Ubiquitinierung definierter Substrate erforderlichen Faktoren gestaltet sich *in vivo* oftmals schwierig. So lässt sich durch biochemische Analyse und Antigen-detektion nur die Länge der Ubiquitinketten und Häufigkeit der Ubiquitinierung ermitteln. Die Kinetik der Kettenbildung und die Art der Kette, das heißt die Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle einer Kette untereinander, kann auf diesem Weg nur schwer analysiert werden. Zudem beschränkt sich die Untersuchung von Ubiquitinmutanten in den Zellen fast ausschließlich auf Systeme, in denen die Mutanten neben dem endogenen Ubiquitin überexprimiert werden, da die alleinige Expression einer Ubiquitinmutante aufgrund indirekter Effekte den zu untersuchenden Aspekt verfälschen bzw. sogar zu Letalität führen kann.

Daher ist es erforderlich, die Ubiquitinkettenbildung durch die verschiedenen E2- und E3-Enzyme auch *in vitro* zu untersuchen. Hierfür wurden alle nachfolgend verwendeten Ubiquitin-konjugierenden Enzyme, Cue1 und die Ubiquitinligasen Hrd1 und Doa10 als GST- (Glutathion-S-Transferase) oder His₆-Fusionsproteine (6x Histidin) heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Da es sich bei diesen Enzymen und Co-Faktoren teilweise um integrale ER-Membranproteine handelt, mussten entsprechende Konstrukte generiert werden, bei denen nur der jeweils lösliche zytosolische Anteil des Proteins synthetisiert wurde. Die exprimierten Anteile der E3-Ligasen beinhalteten jeweils die vollständige RING-Domäne sowie benachbarte Proteinbereiche bis zur nächsten Transmembranregion. Des Weiteren wurde von allen GST-Fusionsproteinen, soweit nicht anders angegeben, das relativ große GST-Epitop nachträglich entfernt, um eine Störung der Proteininteraktionen zu vermeiden. Die aufgereinigten und in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-Gel) der Größe nach aufgetrennten, Coomassie-gefärbten Proteine sind in Abbildung 4 dargestellt.

In früheren *in vivo* Immunpräzipitationen, bei denen Doa10 oder Hrd1 gefällt wurde, konnte bereits eine die Interaktion von Cue1/Ubc7 mit den Ligasen gezeigt werden. Weitere Hinweise für eine Funktion von Ubc7 an den Ligasen ergaben sich aus der Beobachtung, dass die Deletion von *ubc7* zur Stabilisierung von Hrd1- und Doa10-abhängigen Substratproteinen führt. Mit dem Ziel, die Funktion von Ubc7 in diesem

Ergebnisse

Prozess genau zu beschreiben, wurde ein System etabliert, mit dem die Ubc7-abhängige Ubiquitinierung *in vitro* rekapituliert werden kann.

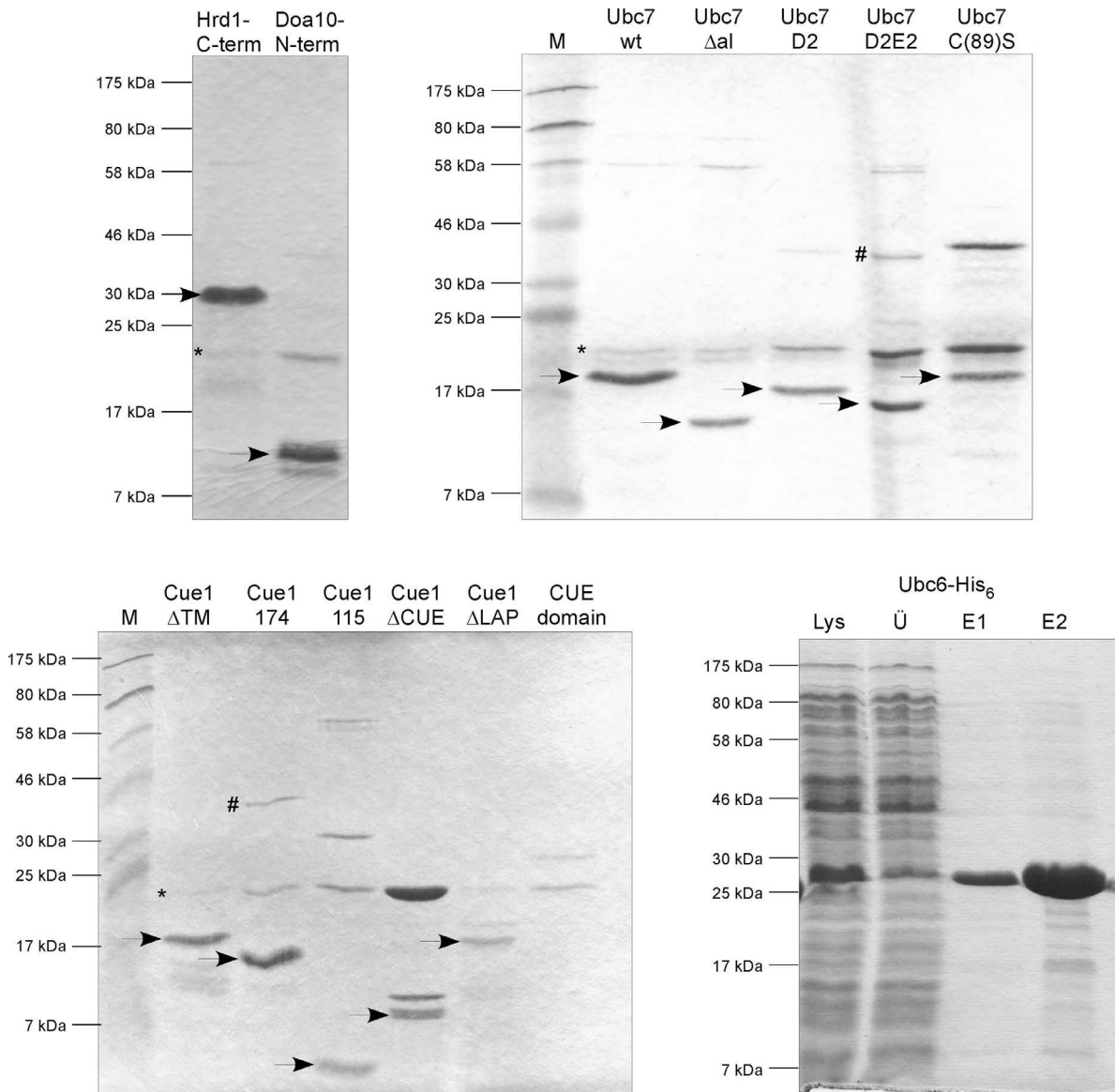


Abbildung 4: Aufreinigung verschiedener ERAD-Komponenten nach heterologer Expression in *Escherichia coli*. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Signale repräsentieren die für die *in vitro*-Versuche verwendeten Proteine nach Abspaltung des für die Aufreinigung benötigten GST-Epitops. * markiert freies GST, welches nicht vollständig durch Glutathion SepharoseTM gebunden wurde. # steht beispielhaft für ungespaltene GST-Protein-Fusionen, die ebenfalls nicht gefällt werden konnten. Das als His₆-Fusion exprimierte und in die Experimente eingesetzte Ubc6 wurde über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt.

Die Reaktionsansätze für eine *in vitro* Ubiquitinierung beinhalteten jeweils eine bestimmte Menge ATP, käuflich erworbenes Ubiquitin-aktivierendes Enzym (Uba1, Boston Biochem) und N-terminal Flag-epitopmarkiertes Ubiquitin (Boston Biochem) in einem Tris-HCl-Reaktionspuffer (pH 7,5, siehe Material und Methoden). Der Frage-

stellung entsprechend wurden definierte Mengen verschiedener, aufgereinigter Ubiquitin-konjugierender Enzyme sowie Ubiquitin-Ligasen und Co-Faktoren zugefügt und bei 30 °C für 12 min (soweit nicht anders angegeben) inkubiert.

2.2 Cue1 verstärkt die Ubc7-abhängige Synthese von Ubiquitinketten in Interaktion mit den Ubiquitinligasen

In einer ersten Reaktion wurde das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7 wahlweise allein, in Anwesenheit seines Co-Faktors Cue1, oder in Kombination mit der Ubiquitinligase Hrd1 inkubiert (Abb. 5A). Im α -Flag (Ubiquitin)-Immunblot ist das freie Monoubiquitin deutlich erkennbar, das mit einer errechneten Größe von 9 kDa hier etwas unterhalb des 6,5 kDa Proteingrößenstandards detektiert wird. Des Weiteren ist in allen Proben ein Signal für Diubiquitin sichtbar, welches wohl bereits als verknüpftes Molekül im käuflich erworbenen Flag-epitopmarkierten Ubiquitin vorlag. Dennoch ist die Menge an Diubiquitin in der Reaktion mit Ubc7 allein deutlich erhöht. Dies zeigt an, dass Ubc7 auch in Abwesenheit einer Ubiquitinligase in der Lage ist, zwei Ubiquitinmoleküle zu konjugieren. In dieser Reaktion erscheint auch ein Signal mit geschätzter Größe eines Triubiquitin (*). Wie sich aber in späteren Versuchen zeigte, verläuft das Signal des freien Triubiquitins im Immunblot etwa auf der selben Höhe wie das einer Thioester-Verknüpfung des Ubc7 mit Ubiquitin bzw. einer Monoubiquitinierung des Ubc7. Daher lässt sich in dieser Reaktion nicht eindeutig klären, ob es sich bei dem Signal um ein mit Ubiquitin beladenes bzw. konjugiertes Ubc7 oder um eine bereits durch Ubc7 geformte Kette aus drei Ubiquitinmolekülen handelt, obwohl im α -Ubc7-Immunblot kein Signal für eine Ubc7-Ubiquitin-Verknüpfung sichtbar ist. Dies könnte jedoch auch auf eine verringerte Detektion einer solchen Ubc7-Subspezies durch den verwendeten Antikörper zurückzuführen sein. Auto-Ubiquitinierungen von E2 oder E3-Enzymen sind ein bereits häufig dokumentiertes Phänomen und in den hier beschriebenen *in vitro* Reaktionen wahrscheinlich auf die nicht physiologischen Proteinkonzentrationen und Reaktionsbedingungen zurückzuführen.

Ergebnisse

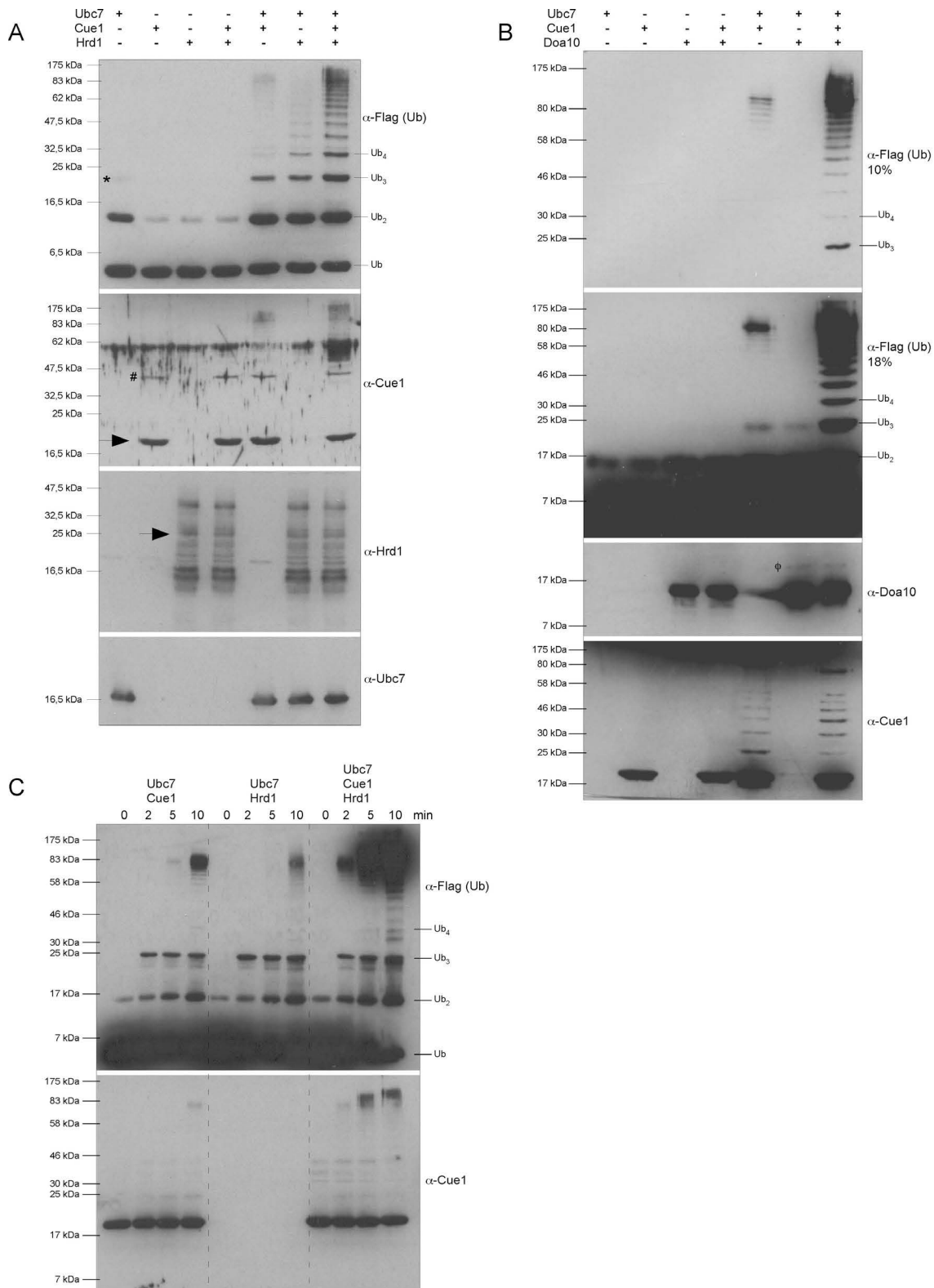


Abbildung 5: *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen mit Ubc7, Cue1, Hrd1 oder Doa10. A-C: Die angegebenen Proteine wurden mit Flag-Ubiquitin und Ubiquitin-aktivierendem Enzym in einem ATP-haltigen Reaktionspuffer bei 30°C inkubiert. A,C: Inkubation für 12 min. Pfeile zeigen auf die unmodifizierten, in die Reaktion eingesetzten Proteine. # markiert ein mögliches, artifizielles, Cue1-Dimer. * weist auf das Signal einer Ubc7-Thioesterbindung mit Ubiquitin bzw. auf ein freies Triubiquitin hin. ♦ kennzeichnet eine mögliche Ubiquitinierung des Doa10 durch Ubc7. B: Ubiquitinierungsreaktionen in Abhängigkeit der Zeit.

Ergebnisse

Wurden in dem *in vitro* System nur der lösliche Teil von Cue1, der zytosolischen C-terminus von Hrd1 oder beiden Faktoren gemeinsam untersucht, so konnte keine Verknüpfung von Ubiquitin detektiert werden. Beide Proteine scheinen also, zumindest *in vitro*, keine eigene Ubiquitin-konjugierende Aktivität zu besitzen. Enthält das System zusätzlich zu Ubc7 auch noch Cue1, so führt dies offenbar zu einer Stimulation der konjugierenden Aktivität des Ubc7, da unter diesen Bedingungen Polyubiquitinketten nachgewiesen werden können. Diese scheinen zum Teil als freie Ubiquitinketten, also untereinander konjugierte Ubiquitinmoleküle, vorzuliegen. Ein Teil der Ketten ist aber auch mit Cue1 verknüpft, was aus dem α -Cue1-Immunblot hervorgeht. Theoretisch könnte es sich hier auch um eine multiple Monoubiquitinierung des Cue1 handeln, dies erscheint jedoch aufgrund der erkennbar hohen Anzahl der verknüpften Ubiquitinmoleküle unwahrscheinlich. Die mit # gekennzeichneten Signale im α -Cue1-Immunblot markieren ein mögliches Cue1-Dimer. Aggregation von Cue1 oder dessen Dimerisierung wurde bereits früher in unserem Labor beobachtet und wird durch hohe Proteinkonzentrationen sowie Veränderungen in Cue1 begünstigt. Da *in vivo* bislang keine Ubiquitinketten auf Cue1 nachgewiesen werden konnten, ist es möglich, dass die Ubiquitinkonjugationen auf Cue1 ein artifizielles Ergebnis der *in vitro* Reaktion sind. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass den Reaktionen kein geeignetes Substratprotein als Ubiquitinakzeptor zugegeben wurde. Es ist daher wahrscheinlich, dass unter diesen Bedingungen Cue1 als Akzeptor dient und somit gleichzeitig als Förderer der Polyubiquitin-Kettenbildung und als Substratprotein fungiert.

Wird die Polyubiquitinierungsaktivität von Ubc7 in Anwesenheit des zytosolischen Anteils von Hrd1 untersucht, lassen sich ebenfalls Ubiquitinketten detektieren, deren Intensität mit dem Polyubiquitinsignal des zuletzt beschriebenen Reaktionsansatzes vergleichbar ist. Allerdings unterscheiden sich die beiden Reaktionsansätze im Vorkommen von nieder- und höhermolekularen Ubiquitinketten. Die Reaktion von Ubc7 mit Hrd1 scheint außerdem nur freie Ubiquitinketten zu erzeugen, da weder Ubc7- noch Hrd1-Ubiquitinkonjugate im Immunblot detektiert wurden. Sowohl Cue1 als auch Hrd1 haben also eine stimulierende Wirkung auf die Ubc7-Aktivität und man könnte einen additiven Effekt beider Proteine bei der Polyubiquitinsynthese erwarten. Tatsächlich wird die Ubiquitinkettenbildung durch Ubc7 in Anwesenheit von Cue1 und Hrd1 nochmals verstärkt, jedoch geht diese Wirkung über eine einfache Addition der vorher beschriebenen Effekte hinaus. Im Immunblot gegen das epitopmarkierte

Ergebnisse

Ubiquitin ist eine um ein Vielfaches erhöhte Polyubiquitinierungsaktivität erkennbar, wobei besonders die Anzahl der höhermolekularen Ubiquitinkonjugate zugenommen hat.

Auch die mit Cue1 verknüpften Ubiquitinketten wurden vermehrt gebildet und weisen eine Zunahme der Kettenlänge auf. Wiederum konnten keine Ubiquitinierungen von Hrd1 oder Ubc7 selbst nachgewiesen werden. Noch deutlicher zeigt sich die verstärkende Wirkung von Hrd1 und Cue1 auf die Polyubiquitinkettenbildung, wenn die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet wird. Abbildung 5B zeigt Reaktionen von Ubc7 mit entweder Cue1, Hrd1 oder der Kombination beider Proteine. Zum Zeitpunkt 0, direkt nach Zugabe des Ubc7 zum vorbereiteten Reaktionsansatz ist in allen drei Proben im α -Flag-Immunblot lediglich das Signal für das eingesetzte epitopmarkierte Ubiquitin (Monoubiquitin und prä-assembliertes Diubiquitin) nachweisbar. Während in den Reaktionsansätzen, die Ubc7 mit Cue1 oder Hrd1 allein enthalten, erst nach 10 min Ubiquitinketten detektierbar sind, lässt sich bei den Reaktionen mit Cue1 und Hrd1 gemeinsam ein Signal vergleichbarer Stärke bereits nach 2 min beobachten. Nach 10 min Reaktionszeit hat die Ubiquitinkettenbildung dieses Reaktionsansatzes die Polyubiquitinierung der Einzelreaktionen um ein Vielfaches übertroffen. Das Zusammenwirken von Cue1 und Hrd1 mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc7 bewirkt also nicht nur eine Steigerung der Kettenanzahl, sondern auch eine wesentlich schnellere und effektivere Kettenbildung. Dies ist durchaus sinnvoll, wenn man bedenkt, dass eine ausreichende Ubiquitinierung eines Substratproteins vor dessen Dissoziation von der Ubiquitinligase erfolgen muss, damit es dem proteolytischen Abbau am 26S Proteasom zugeführt werden kann.

Eine ähnliche Stimulation der Ubiquitinierungsaktivität von Ubc7 wird durch Reaktion von Ubc7 mit Cue1 und der E3-Ligase Doa10 erreicht (Abb. 5C). Die Bildung freier Polyubiquitinketten durch Ubc7 und Doa10 allein ist zwar im Vergleich zur Reaktion mit Hrd1 deutlich reduziert, aber auch hier verstärkt die Zugabe von Cue1 die Ubiquitinierungsaktivität um ein Vielfaches. Insgesamt scheinen Ubiquitinierungsreaktionen von Ubc7 und Cue1 mit dem Hrd1-Konstrukt effektiver zu verlaufen als mit dem Doa10-Konstrukt. Dies wird im direkten Vergleich der Ligasen durch eine größere Anzahl an Ubiquitinketten und längere Ubiquitinketten in der Reaktion mit Hrd1 erkennbar (Abbildung nicht dargestellt). Zum einen könnte dies auf einen generellen Unterschied in der Interaktion des Ubc7 mit den beiden Ligasen hindeuten. Es ist aber auch zu beachten, dass das in den *in vitro* Reaktionen verwendete lösliche

Hrd1-Konstrukt mit 226 Aminosäuren entscheidend größer ist als das Doa10-Konstrukt (125 Aminosäuren) und somit zusätzliche, die Ubiquitinierung verstärkende, Eigenschaften aufweisen könnte.

2.3 Die saure Schleife in Ubc7 hat keinen Einfluss auf die Ausbildung eines Thioesters mit Ubiquitin

Ubc7 hat eine wichtige Bedeutung für ERAD, da es mit beiden Ubiquitinligasen, Hrd1 und Doa10, interagiert. Ubc7 weist aber auch auf struktureller Ebene eine Besonderheit auf, welche es von den anderen Ubiquitin-konjugierenden Enzymen unterscheidet. Neben Cdc34 ist Ubc7 das einzige in *S. cerevisiae* bekannte E2-Enzym, das einen stark sauren Bereich carboxyterminal der UBC-Domäne besitzt (Abb. 6A). Für Cdc34 und für das humane Homolog von Ubc7, UBE2G2, konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Bereich eine wichtige Funktion für den Transfer eines Ubiquitinmoleküls vom E2 auf ein bereits (mono-) ubiquitiniertes Substratprotein hat, während die initiale Ubiquitinierung des Substrats von einer Mutation innerhalb der sauren Schleife nicht beeinflusst war [9,69]. In Ubc7 bildet der saure Bereich eine Schleifenstruktur, die aus der sonst relativ globulären Struktur des Proteins herausragt (Abb. 6B). Sie befindet sich laut Kristallstruktur [44] in direkter Nachbarschaft zum katalytisch aktiven Cystein (C89). Um eine mögliche Funktion der sauren Schleife für Ubc7 zu untersuchen, wurden Ubc7-Varianten hergestellt, bei denen entweder einzelne saure Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden [*D2*: DD(98,99)AA; *E2*: EE(107,108)AA; *D2E2*: DDEE(98,99,107,108)AAAA; gestrichelte Umrandung] oder der gesamte saure Bereich deletiert war [Δ al (Δ acidic loop)= Δ 97-108; durchgehende Umrandung] (Abb. 6A).

Zunächst musste überprüft werden, ob die generierten Ubc7-Varianten noch in der Lage sind, Ubiquitin über eine Thioesterbindung am katalytisch aktiven Cystein, C(89), zu binden, denn dies ist Voraussetzung für eine spätere Übertragung des Ubiquitins auf ein geeignetes Substratprotein. Im α -Flag (Ub) -Immunblot der Abbildung 6C ist nach Behandlung der Proben mit Dithiothreitol (DTT) -freiem Probenpuffer sowohl für den Ubc7-Wildtyp als auch für die Ubc7-Varianten mit Veränderungen in der sauren Schleife eine Ubiquitin-Verknüpfung erkennbar (*), die in Abhängigkeit der katalytischen Aktivität des Ubc7 gebildet wurde. In Proben, die mit der katalytisch inaktiven Ubc7-Variante versehen waren bzw. kein Ubiquitin oder kein Ubiquitin-aktivierendes Enzym enthielten, konnte diese Verknüpfung nicht nachgewiesen werden. Dass es sich hierbei tatsächlich um eine Thioesterbindung zwischen Ubc7 und

Ergebnisse

Ubiquitin handelt, geht zum einen aus dem unter nicht reduzierenden Bedingungen veränderten Laufverhalten des Ubc7 im SDS-Polyacrylamidgel hervor.

A

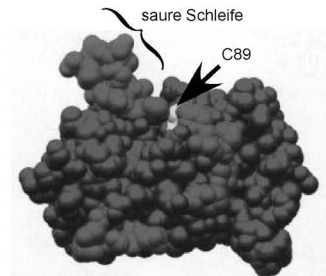
```

Ubc4  ----MSSSKRIAKELSDLE--RDPPTSCSAGPVG--DDLYHWQASIMGP--ADSPYAGGVF  51
Ubc5  ----MSSSKRIAKELSDLG--RDPASCAGPVG--DDLYHWQASIMGP--SDSPYAGGVF  51
Ubc1  ----MSRAKRIMKEIQAVK--DDPAAHITLFEVSESDIHLKGTFLGP--PGTPYEGGKF  52
Cdc34 MSSRKSTASSLLLRQYRELTDPKKAIPSFHIELEDDSNIFTWNIGVMVLNEDSIYHGGFF  60
Ubc7  MS---KTAQKRLKELQQLI--KDSPPGIVAGPKSENNIFIWDCLIQGP--PDTFYADGVF  54
Ubc6  --MATKQAHKRLTKEYKLMV---ENPPPYILARPNEINLEWHYIITGP--ADTPYKGGQY  54
      . : : : . . . . . : : . . . : * * * :

Ubc4  FLSIHFPDTPYFPKPKISFTTKIYHPNIN-ANGNICLDILK-----DQWSPA  97
Ubc5  FLSIHFPDTPYFPKPKVNFSTTKIYHPNIN-SSGNICLDILK-----DQWSPA  97
Ubc1  VVDIEVMEYFPKPKMFDTKVYHPNISSVTGAICLDILK-----NAWSPV  99
Cdc34 KAQMRFPEDFPFSPQFRFTPAIYHPNVY-RDGRICISILHQSGD--PMTDEPDAETWSPV  118
Ubc7  NAKLEFPKDYPLSPKLTFTPSILHPNIY-PNGEVCISILHSPGDDPNMYELAEERWSPV  113
Ubc6  HGTLTFPSDYPYKPPAIRMITPNGRFKPN---TRLCLMSDYHP-----DTWNPQ  101
      : * : * : * * . : . : : : : : : * : * :

Ubc4  LTLSKVLISICSLTANPDDPLVPEIAHIYKTDPRKYEATAREWTKKYAV-----  148
Ubc5  LTLSKVLISICSLTANPDDPLVPEIAQIYKTDKAKYEATAKEWTKKYAV-----  148
Ubc1  ITLKSALISLQALLQSPEPNDPQDAEVAQHLYLRDRESFNKTAALWTRLYAETSNGQKGN  159
Cdc34 QTVESVLISIVSLLLEDPNINSPANVDAVDYRKNPEQYKQVQVMEVERSKQDIPKGFIMP  178
Ubc7  QSVEKILLSVMSMLSEPNIESGANIDACILWRDNRPEFERQVKLSILKS----LGF---  165
Ubc6  WSVSTILNGLSFMSTDEATTGSITTSDHQKTLARNISYNTFQNVRFKLIPEVVQEN  161
      : : . * : : : : . . . . .
    
```

B



C

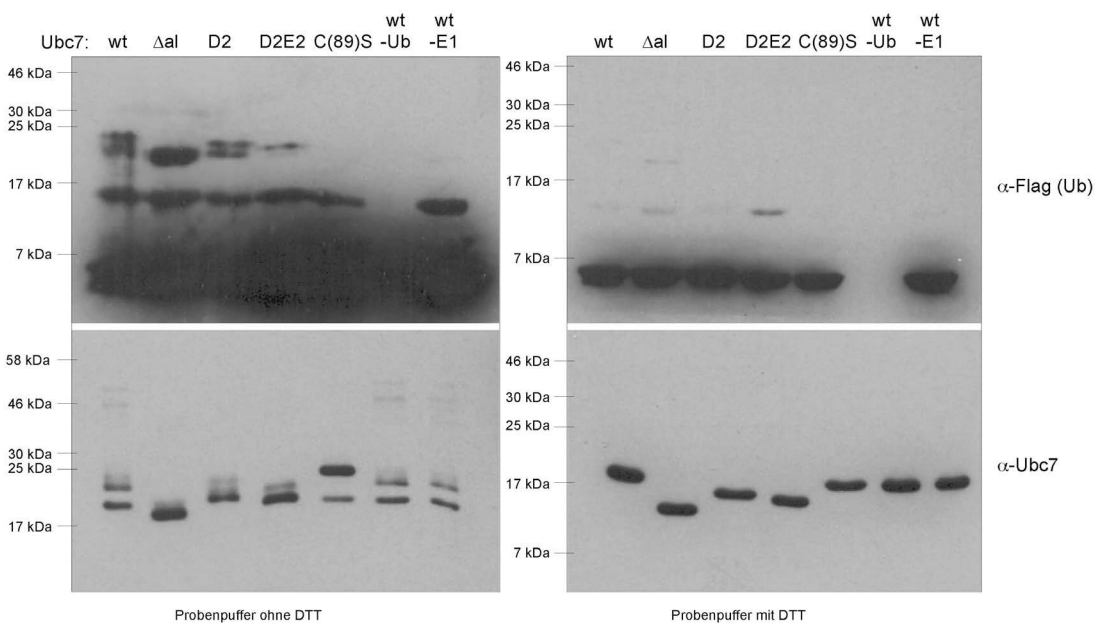


Abbildung 6: Die saure Schleife in Ubc7 - Untersuchung verschiedener Varianten bei der Thioesterbildung. A: Vergleich von Proteinsequenzen verschiedener Ubiquitin-konjugierender Enzyme aus *S.cerevisiae*. Das katalytisch aktive Cystein ist hellgrau unterlegt, der Bereich der sauren Schleife von Ubc7 ist umrandet, wobei die gestrichelten Umrandungen die mutierten Aspartat- und Glutamat-Reste anzeigen. B: Model der Oberflächenstruktur von Ubc7 (aus: William J.Cook, Biochemistry, 1997 [44]). Das katalytisch wichtige Cystein ist in hellgrau dargestellt. C: *In vitro* Thioesterbildung der Ubc7-Varianten mit Flag-Ub. Inkubation der Reaktionen für 30 min. Erhitzen der Proben in Probenpuffer mit oder ohne DTT.

Die im α -Ubc7-Immunblot sichtbaren Doppelsignale sind ebenfalls für die Ubc7-Ubiquitinverknüpfung im α -Flag (Ub) –Immunblot feststellbar. Zum anderen sind Thioesterbindungen sensitiv gegenüber reduzierenden Agenzien, wie z.B. Dithiothreitol (DTT), und daher nach Behandlung der Proben mit DTT in einem Immunblot nicht detektierbar. Dennoch kann sich, wie bereits beschrieben, durch erhöhte Proteinkonzentrationen und lange Reaktionszeiten zusätzlich eine kovalente Monoubiquitinierung auf einem Lysin innerhalb des Ubc7 bilden, deren Signal mit der Größe der Thioesterverknüpfung übereinstimmt, die allerdings nicht mehr durch DTT gelöst werden kann. Die gezielten Veränderungen im Bereich der sauren Schleife von Ubc7 beeinträchtigen also nicht die Beladung des aktiven Cysteins mit Ubiquitin. Aber sind diese Ubc7-Varianten noch in der Lage, in einer *in vitro* Reaktion mit Cue1 und Hrd1 Polyubiquitinketten zu bilden?

2.4 Die Synthese von Ubiquitinketten wird durch Deletion der sauren Schleife verhindert

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die einzelnen Ubc7-Varianten mit Aminosäureaustausch bzw. -deletion in der sauren Schleife in einem *in vitro* Reaktionsansatz mit Cue1 und Hrd1 inkubiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 7 dargestellt. Bei schwächerer Exposition des α -Flag (Ub) –Immunblots sind deutlich die durch den Ubc7-Wildtyp geformten Ketten erkennbar, wogegen bei der Reaktion mit der Ubc7 Δ al-Variante lediglich eine Ubc7-Ubiquitin-Thioester-Verknüpfung detektierbar ist. Auch nach längerer Exposition des Blots werden für die Δ al-Variante keine Polyubiquitinketten sichtbar. Die Fähigkeit Ubiquitinketten zu bilden scheint jedoch bei der D2 und D2E2-Variante von Ubc7 nicht komplett verloren zu sein, aber in Abhängigkeit der Anzahl der veränderten sauren Aminosäuren im Vergleich zum Wildtyp dramatisch reduziert.

Die veränderte Aktivität der Ubc7-Varianten bei der Konjugation von Ubiquitinmolekülen zeigt sich auch im α -Cue1 –Immunblot. Wie bereits in Abbildung 5 nachgewiesen, können durch den Ubc7-Wildtyp hochmolekulare Ubiquitinketten auf Cue1 generiert werden. Bei der Ubc7 Δ al-Variante ist zwar noch eine initiale Monoubiquitinierung von Cue1 erkennbar, die Elongation bzw. die Bildung einer Ubiquitinkette auf Cue1 ist aber nahezu vollständig verhindert. Die durch die D2- oder D2E2-Variante auf Cue1 geformten Ketten sind verstärkt im niedermolekularen Bereich zu detektieren. Dass die D2-Variante hier, im Gegensatz zum Ubiquitin-Immunblot, offensichtlich schwächere Signale als die D2E2-Variante aufweist, könnte aber auch an dem verstärkten

Ergebnisse

Vorhandensein einer höhermolekular mit Ubiquitin modifizierten Cue1-Population in dieser Reaktion liegen, wobei diese höhermolekularen Konjugationen schlechter nachweisbar sind.

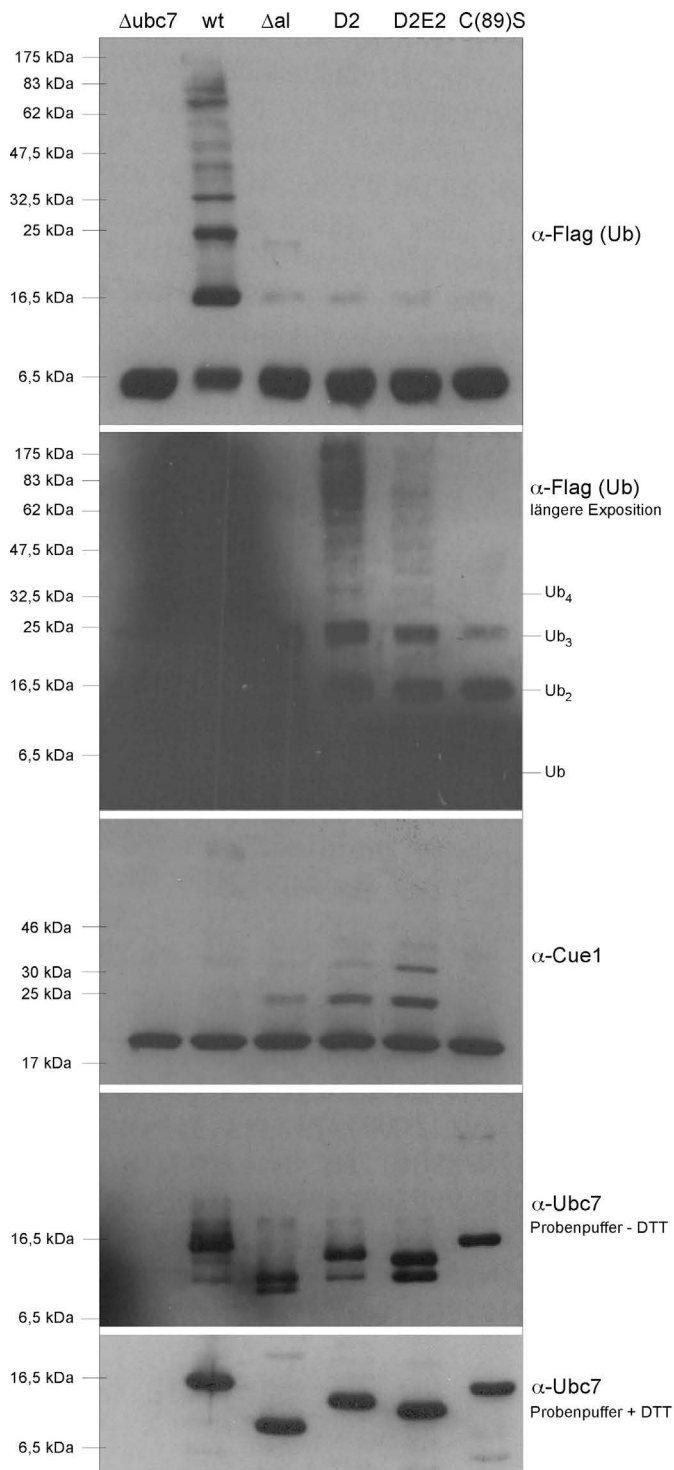


Abbildung 7: *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen der Ubc7-Varianten mit Cue1 und Hrd1. Äquivalente Mengen der angegebenen Ubc7-Varianten wurden mit Cue1 und Hrd1 für 20 min inkubiert.

Es scheint also, als könne Ubc7 nach Deletion der sauren Schleife zwar noch einen Thioesterbindung mit einem aktivierten Ubiquitin eingehen und auch in Anwesenheit von Hrd1 ein erstes Ubiquitinmolekül auf das in diesen Versuchen artifizielle Substrat Cue1 übertragen. Eine Polyubiquitinkettenbildung ist für diese $\Delta a1$ -Variante jedoch nicht festzustellen. Sollte die Länge der durch die Ubc7-Varianten geformten Ubiquitinketten in einer *in vivo* Situation nicht ausreichen, um ein Substratprotein für den proteasomalen Abbau zu markieren, so müsste das Substratprotein stabilisiert werden.

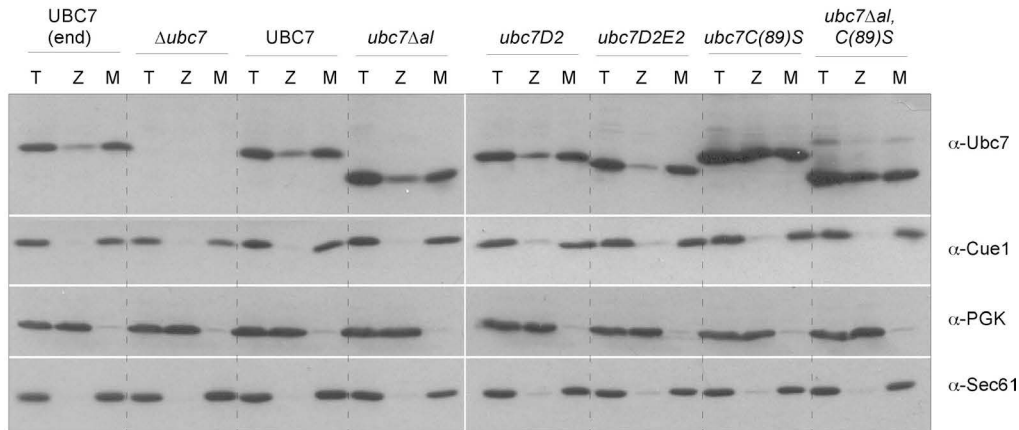
2.5 Veränderungen in der sauren Schleife von Ubc7 führen zu Substratstabilisierung *in vivo*

Um diesen Aspekt zu untersuchen, musste zunächst geklärt werden, ob entsprechende *ubc7*-Mutanten in den Zellen in gleicher Stärke wie das endogene (end) Wildtyp-*UBC7* exprimiert und die Proteine an der ER-Membran lokalisiert sind. Für diese Untersuchung wurden Hefestämme verwendet, welche die veränderten Ubc7-Varianten oder Ubc7-Wildtyp vom Lokus des *URA3* Gens exprimierten, in den zuvor die *ubc7*-Mutanten über homologe Rekombination eingefügt worden waren. Wie in Abbildung 8A gezeigt, wurden die Zellen in eine zytosolische und eine Membranfraktion getrennt. Es wird deutlich, dass die *ubc7*-Mutanten mit Veränderungen in der sauren Schleife ähnlich stark exprimiert sind wie das endogene *UBC7* und die Proteine dementsprechend in vergleichbarer Menge in der Membranfraktion nachgewiesen werden können. Die katalytisch inaktiven Ubc7-Varianten weisen eine höhere Proteinmenge im Gesamtzellextrakt auf. Da das katalytisch aktive Cystein ebenfalls für den Abbau von Ubc7 benötigt wird, sind die erhöhten Proteinmengen auf eine Stabilisierung der Proteine zurückzuführen. In Hefestämmen, in denen *cue1* deletiert und somit Ubc7 im Zytosol lokalisiert ist, wird neben der Ubc7C(89)S-Variante auch Ubc7 $\Delta a1$ stabilisiert, während der Ubc7-Wildtyp und die Ubc7D2-Variante einem raschen Abbau unterliegen (ohne Abbildung). Die saure Schleife hat demzufolge auch eine Bedeutung für die Ubiquitinierung und den Abbau von Ubc7 selbst.

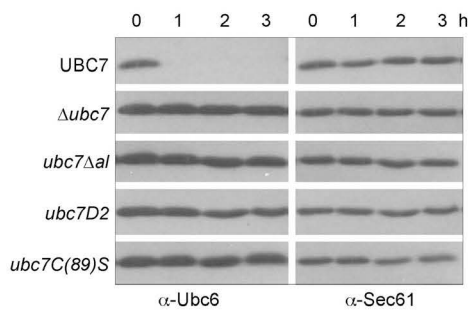
Zur Betrachtung des Abbaus von Substratproteinen wurden die Modellsubstrate Ubc6 und CPY* herangezogen. Während Ubc6 ein ER-membranverankertes, zytosolisches Protein und Substrat der Doa10-Ligase ist, wird die faltungsdefiziente und somit ER-lokalisierte G(259)R-Variante der CarboxypeptidaseY ins Zytosol retrotransloziert und über Ubiquitinierung an der Hrd1-Ligase für den Abbau markiert.

Ergebnisse

A



B



C

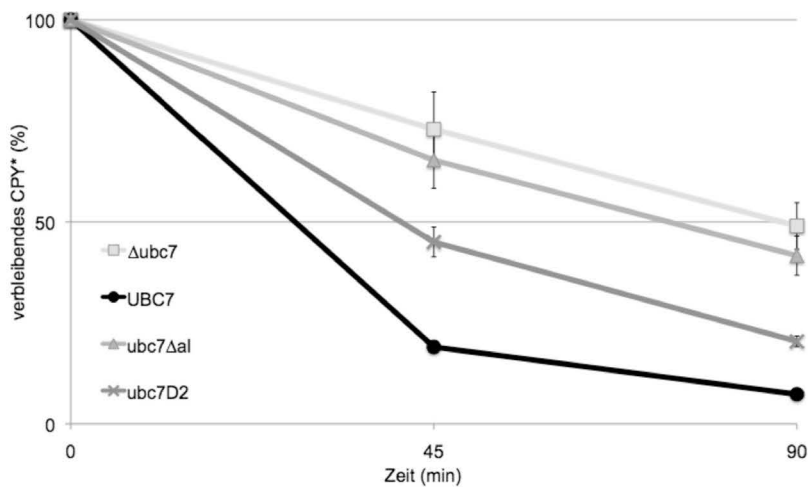


Abbildung 8: Abbau von Substratproteinen im WT und in *ubc7*-Mutanten *in vivo*. A: Fraktionierung von Hefezellen in Totallysat (T), zytosolische (Z) und Membranfraktion (M). Nachweis der Membran-gebundenen bzw. -assoziierten Proteine Sec61, Cue1 und Ubc7 sowie des löslichen zytosolischen Proteins PGK1 mittels Immunoblotting. B: Cycloheximid-Abbau-Experiment zur Untersuchung des Ubc6-Abbaus. 0,1,2,3 Stunden nach Behandlung der Zellen mit Cycloheximid wurden äquivalente Zellmengen aufgeschlossen und das Totallysat via Immunoblotting analysiert. C: Pulse-Chase Experiment zum CPY*Abbau, logarithmische Darstellung. Nach der Markierung neusynthetisierter Proteine durch Inkubation mit ^{35}S -Met/Cys-Mix für 8 min, wurden zu angegebenen Zeiten Zellen entnommen, aufgeschlossen und CPY* immunpräzipitiert. Auswertung der Präzipitate mittels SDS-PAGE und Phosphorimaging.

Ergebnisse

Für die Untersuchung von Ubc6 wurde den Hefekulturen in der Phase des logarithmischen Wachstums Cycloheximid ins Medium zugesetzt und folgend der Abbau des bereits synthetisierten Ubc6 über einen Zeitraum von 3 Stunden analysiert (Abb. 8B). Expression des *UBC7*-Wildtyps führt innerhalb der ersten Stunde zum nahezu vollständigen Abbau von Ubc6, in einem *ubc7*-defizienten Stamm hingegen verbleibt Ubc6 über den gesamten Zeitraum stabil. Eine vergleichbare Stabilisierung von Ubc6 kann auch bei der *ubc7 Δ al*-Mutante und der *ubc7C(89)S*-Mutante beobachtet werden. Allein bei Expression der *D2*-Mutante ist ein leichter Abbau des Ubc6 innerhalb des Beobachtungszeitraums erkennbar.

Die Durchführung eines Pulse-Chase-Experiments zur Untersuchung des CPY*-Abbaus lieferte quantifizierbare Daten, die in Abbildung 8C graphisch dargestellt sind. Unter Wildtyp-Bedingungen ist die Menge an CPY* 90 Minuten nach der radioaktiven Markierung des Proteins auf etwa 7 % des ursprünglich markierten CPY* gesunken, d. h. in diesem Zeitraum wurden rund 93 % des markierten Substrats proteolytisch abgebaut. In einem Stamm ohne Ubc7 ist die Stabilität des CPY* deutlich höher. Hier sind nach 90 Minuten noch 49 % des radioaktiv markierten Proteins nachweisbar. Die Expression der *ubc7 Δ al*-Mutante zeigte im Vergleich zur *ubc7*-Deletion nur einen sehr geringen Effekt. Auch in diesem Stamm wurden zum letzten Untersuchungszeitpunkt noch etwa 42 % des CPY* detektiert. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Expression der *ubc7D2*-Mutante ein signifikanter Abbau des CPY*, der jedoch nicht das Ausmaß des Abbaus unter Wildtypbedingungen erreichte. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Deletion der sauren Schleife von Ubc7 einen dramatischen Effekt auf den Abbau der untersuchten Substratproteine hat.

Sowohl Ubc6 als auch CPY* sind nach Expression der *ubc7 Δ al*-Mutante ähnlich stark stabilisiert wie in einem *ubc7*-Deletionsstamm. Die *ubc7D2*-Mutante liefert für beide Modellsubstrate einen intermediären Phänotyp. Hierbei ist der Abbau der Substratproteine zwar nicht völlig unterbunden jedoch im Vergleich zum Wildtyp deutlich verzögert bzw. eingeschränkt. Eine derartige Fehlfunktion des veränderten Ubc7 kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. Zum einen ist es denkbar, dass das von der Ubiquitinligase gebundene und vom E2 bereits monoubiquitinierte Substrat durch die saure Schleife in Ubc7 so positioniert wird, dass eine effektive Elongation zu einer Ubiquitinkette erfolgen kann. Ein solches Modell wurde bereits von Petroski et al. (2005) [9] für die Ubiquitinierung von Sic1 durch SCF und Cdc34 postuliert.

Ergebnisse

Es ist aber auch möglich, dass durch den Verlust der sauren Schleife von Ubc7 die Interaktion des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms mit der Ubiquitinligase beeinträchtigt ist. Diese Überlegung konnte jedoch entkräftet werden, da nach Co-Expression des Wildtyp-*UBC7* und verschiedenen *ubc7*-Mutanten jeweils eine Stabilisierung des hierbei beobachteten CPY* auftritt (ohne Abbildung). Diese ist zwar nicht ganz so ausgeprägt wie nach Expression der *ubc7*-Mutanten allein, jedoch zeigt dieser Versuch, dass die beiden Ubc7-Varianten offenbar um die Bindung an der Hrd1-Ligase konkurrieren. Eine nicht vorhandene Wechselwirkung von Ubc7 Δ al mit der Ligase hätte eine ungehinderte Interaktion des WT-Ubc7 mit Hrd1 und einen nicht-verzögerten Abbau des CPY* zur Folge gehabt. Das Zusammenspiel von E2s und E3s bei der Proteinubiquitinierung ist auch nach intensiver Forschung auf diesem Gebiet nicht vollständig geklärt und es bestehen hierfür verschiedene Modelle.

Im ersten Modell bindet ein mit Ubiquitin beladenes Ubiquitin-konjugierendes Enzym an die Ubiquitinligase und überträgt zunächst dieses erste Ubiquitinmolekül auf ein am E3 gebundenes Substratprotein. Anschließend dissoziiert das nun unbeladene E2-Enzym vom E3-Substrat-Komplex, um einem anderen, wiederum beladenen, konjugierenden Enzym die Bindung an die Ligase zu erlauben, und Ubiquitin an das bereit konjugierte Ubiquitinmolekül anzuheften. Dadurch wird die Ubiquitinkette verlängert. Bindung und Dissoziation des E2-Enzyms müssen dabei so schnell erfolgen, dass sich das gebundene Substrat nicht vorzeitig von der Ubiquitinligase löst, sondern auf diese Weise mit einer Ubiquitinkette aus mindestens vier Ubiquitinmolekülen versehen wird.

In einem zweiten Modell bleibt das zuerst an die Ligase rekrutierte E2 auch nach dem Transfer des ersten Ubiquitins auf das Substrat mit dem E3 verbunden. Das konjugierende Enzym kann nun in diesem gebundenen Zustand mit einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym interagieren, wodurch es erneut mit Ubiquitin beladen wird und ein weiterer Transfer auf das Substrat erfolgen kann.

Ubiquitinierung nach dem zweiten Modell verspricht einen zeitlichen Vorteil gegenüber dem ersten, Allerdings können die Bindestellen des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms für das E1 und die RING-Domäne des E3 überlappen [70], was eine gleichzeitige Interaktion mit beiden Enzymen verhindern würde. Hinweise für den Ablauf der Ubiquitinierung gemäß dem ersten Modell lieferten Kleiger et al. 2009 [71,72] für die Interaktion des Cdc34 mit dem Cullin1-SCF-Komplex. Dabei spielt die Affinität des E2s zur Ligase, und damit die Höhe der Assemblierungs- und Disassemblierungs-

rungrate, eine entscheidende Rolle für die Effizienz der Ubiquitinierung. In diesem Artikel wird ebenfalls die Möglichkeit diskutiert, dass das konjugierende Enzym nach dem Ubiquitintransfer zumindest partiell mit der Ligase verbunden bleibt, um erneut vom E1 mit Ubiquitin beladen zu werden und möglichst schnell eine weitere Interaktion mit der RING-Domäne des E3s herstellen zu können. Ob die gestörte Ubiquitinierung in der *ubc7 Δ al*-Mutante auf eine veränderte oder fehlerhafte Wechselwirkung des Ubc7-Proteins mit den Ligasen Hrd1 oder Doa10 zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe einer Immunpräzipitation der jeweiligen Ligase untersucht.

2.6 Die saure Schleife beeinflusst die Interaktion von Ubc7 mit den ERAD-Ligasen und die Rekrutierung ligaseassoziiierter Faktoren

Um den Doa10-Ligasekomplex mit den daran gebundenen Interaktionspartnern zu immobilisieren und aufzureinigen, wurden Hefestämme verwendet, in denen Doa10 aminoterminal mit einem 13-fachen myc-Epitop markiert war. Aus Abbildung 9A ist ersichtlich, dass, nach Solubilisierung der präparierten Hefemembranen mit 1 % Digitonin, die zu betrachtenden, einst membrangebunden oder membranassoziierten Proteine quantitativ aus den Membranen herausgelöst wurden. Des Weiteren waren alle Ubc7-Varianten in etwa gleicher Menge im Lysat vorhanden, was aus dem Immunblot gegen Ubc7 hervorgeht. Dieser Immunblot zeigt auch, dass in der *ubc7 Δ al*-Mutante das Ubc7-Protein ein im Vergleich zum *UBC7*-Wildtyp verändertes Bindungsverhalten an die Ligase aufweist: Während das Wildtyp-Ubc7 lediglich eine geringe Bindung an Doa10 erkennen lässt, scheint die *Ubc7 Δ al*-Variante stärker mit der Ligase assoziiert zu sein. Auch bei den Ubc7-Varianten mit Punktmutationen innerhalb der sauren Schleife, D2 und D2E2, ist im Vergleich zum Wildtyp eine leicht höhere Ligaseinteraktion sichtbar. In *ubc7 Δ al*-Zellen sind auch Cue1 und Ubc6 verstärkt mit der Ligase assoziiert. Die starke Interaktion des Cue1 mit der Ligase lässt sich durch dessen Komplexbildung mit Ubc7 bzw. den Ubc7-Varianten erklären. Ubc6 liegt in *ubc7 Δ al*-Zellen stabilisiert vor und weist daher eine erhöhte Menge sowohl in den solubilisierten Membranen als auch im Präzipitat mit Doa10 auf. Überraschenderweise interagiert auch die katalytisch inaktive C(89)S-Variante von Ubc7 mit der Ligase, obwohl sie keinen Thioester mit Ubiquitin formen kann. Demzufolge scheint die Beladung des Ubc7 mit Ubiquitin keine Voraussetzung für dessen Rekrutierung an die Doa10-Ligase zu sein.

Ergebnisse

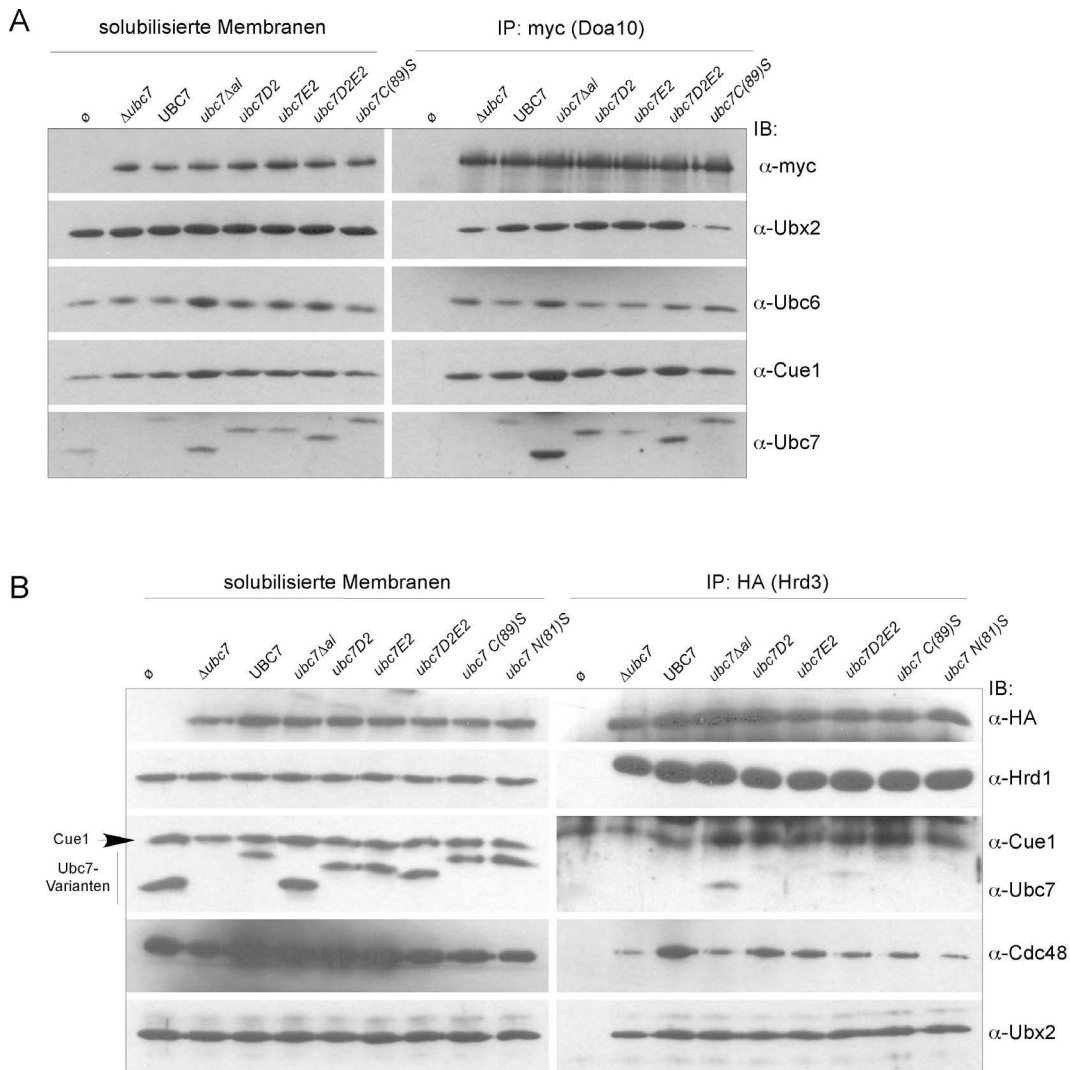


Abbildung 9: Zusammensetzung der ERAD-Ligasekomplexe in *ubc7*-Mutanten. Immunpräzipitation der myc-epitopmarkierten Ligase Doa10 (A) oder des HA-epitopmarkierten Hrd1-assoziierten Proteins Hrd3 (B) aus solubilierten Membranen äquivalenter Mengen an Hefezellen. Immunoblotting der co-präzipitierten Proteine.

Für die Betrachtung der Verhältnisse am Hrd-ligase-Komplex (Abb. 9B) wurden Hefen mit aminoterminal 3-fach HA-epitopmarkiertem Hrd3 verwendet und die mit der Hrd1-Ligase komplexierten Proteine nach Membransolubilisierung und Immunpräzipitation mittels Antikörpern detektiert. Auch hier scheint die *Ubc7 Δ al*-Variante eine stärkere Bindung mit dem Ligasekomplex einzugehen, wenn auch die Menge von *Ubc7 Δ al* in der Membran im Vergleich zu den anderen *Ubc7*-Varianten insgesamt schon etwas erhöht ist. Die Assoziation des *Ubc7*-Wildtyp mit der Ligase kann hingegen nahezu nicht detektiert werden. Die *Ubc7*-Varianten D2, E2 und D2E2 sind in nachweisbarer Menge an den Ligasekomplex gebunden. Eine Ursache für die kaum detektierbare Interaktion des *Ubc7*-Wildtyp mit der Hrd-Ligase könnte in der Kurzlebigkeit dieser Wechselwirkung liegen. Dies würde das Modell unterstützen, dass nur

Ergebnisse

ein Austausch eines unbeladenen gegen ein beladenes E2-Enzym die Prozessivität der Ubiquitinkettenbildung gewährleistet, wobei das mit Ubiquitin beladene E2 eine hohe und das unbeladene E2 eine geringe Affinität zur Ligase hätte. Die verstärkte Interaktion des Ubc7 Δ al mit der Ligase würde hiernach einer Situation entsprechen, in der ein mit Ubiquitin beladenes E2 an die Ligase rekrutiert wird, jedoch die Übertragung des Ubiquitin auf ein bereits initial ubiquitiniertes Substrat aufgrund der Mutation in der sauren Schleife des Ubc7 nicht erfolgen kann. Folglich bliebe eine starke Bindung des E2 zur Ligase erhalten.

Die Interaktion von Ubc7 Δ al mit der Ligase ist lediglich verstärkt aber nicht irreversibel. Dies zeigen Ergebnisse eines Versuches zum Abbau von Ubc6 und CPY*, bei dem in *ubc7 Δ al*-Zellen zusätzlich das Wildtyp-*UBC7* exprimiert wurde (ohne Abbildung). Für beide Substratproteine konnte unter diesen Bedingungen ein im Vergleich zum Wildtyp verlangsamer aber deutlich erkennbarer Abbau nachgewiesen werden.

Das Bindungsverhalten von Ubc7 an die Hrd1-Ligase korreliert nicht zwangsläufig positiv mit dem Substratabbau, was aus der Interaktion des Cdc48 mit der Ligase ableitbar ist. Unter Wildtyp-Bedingungen mit normaler Ubiquitinierungsaktivität wird über Ubx2 eine bestimmte Menge an Cdc48 an die Ligase rekrutiert, um die mit Ubiquitin markierten Proteine aus dem membrangebundenen Komplex herauszulösen und ins Zytosol zu entlassen. In Zellen, in denen *ubc7* deletiert und demzufolge die Anzahl ubiquitinerter Proteine deutlich reduziert ist, wird nur sehr wenig Cdc48 an den Ligasekomplex gebracht. Dies gilt auch für die *ubc7*-Mutante mit deletierter saurer Schleife, was Rückschlüsse auf eine gestörte Ubiquitinkettenbildung in diesen Zellen erlaubt. Und erneut kann für die Punktmutanten *ubc7D2* und *ubc7E2* auch in dieser Hinsicht ein intermediärer Phänotyp festgestellt werden.

Die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen belegen deutlich, dass, wie für Cdc34 beschrieben, die saure Schleife in Ubc7 eine entscheidende Rolle bei der Ubiquitinkettenbildung auf Substratproteinen spielt. Bereits die Veränderung zweier benachbarter Aspartat-Reste zu Alanin zeigt eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte *in vitro* Ubiquitinierungsaktivität. Darüber hinaus ist das Vorhandensein der sauren Schleife eine Voraussetzung für den Abbau von Proteinen, da eine unzureichende Substratubiquitinierung die Rekrutierung des Cdc48 an die Ligasekomplexe verringert und somit der Transfer der Substrate zum 26S Proteasom stark eingeschränkt ist.

2.7 Wirkung von Cue1 und der Cue1-CUE-Domäne auf die Ubiquitinierungsreaktion von Ubc7 in Interaktion mit den Ligasen

Die bislang dargestellten Ergebnisse zeigen bereits, dass die Polyubiquitinkettenbildung durch Ubc7 von mehreren Faktoren stark beeinflusst wird. Neben der katalytischen Aktivität dieses E2-Enzyms sind, wie eben beschrieben, weitere intramolekulare Strukturen für die Funktionalität des Ubc7 notwendig. Des Weiteren stimulieren die Ubiquitinligasen die Aktivität des Ubc7 und bringen dieses in räumliche Nähe zu einem geeigneten Substrat. Der mit Ubc7 komplexierte Faktor Cue1 wirkt nicht nur stabilisierend und membranrekrutierend auf Ubc7, sondern verstärkt im Zusammenspiel mit einer Ligase dessen Polyubiquitinierung um ein Vielfaches [73]. Um die Stimulation der Ubiquitinierungsaktivität des Ubc7 durch Cue1 besser verstehen zu können, soll im folgenden Abschnitt die Interaktion von Ubc7 mit Cue1 sowie die Rolle der CUE-Domäne in Cue1 näher betrachtet werden.

Bereits früher im Labor durchgeführte Experimente belegen, dass die Rekrutierung von Ubc7 an die ER-Membran in Abhängigkeit des Cue1-Carboxyterminus geschieht. Deletion der carboxyterminalen 29 Aminosäuren von Cue1 verhindert nicht nur die Interaktion des Ubc7 mit Cue1 und die Ubc7-Membranlokalisierung, sondern als Folge davon auch den Abbau von Ubc7-abhängigen Substratproteinen (ohne Abbildung). Eine „Surface Plasmon Resonance“-Messung an einem Biacore-System ergab für die Interaktion von aufgereinigtem Ubc7 und C-terminal 6xHis-epitopmarkiertem Cue1 Δ TM im „single-cycle-kinetic“-Modus eine Dissoziationskonstante (Kd) von $3,0 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (ohne Abbildung). Dieser Wert deutet auf eine gute, wenn auch keine sehr starke Affinität der beiden Proteine zueinander. Eine Beeinflussung der Ubc7-Bindung an Cue1 durch das Vorhandensein des c-terminalen 6xHis-Epitops in diesem Cue1-Konstrukt konnte bei Ubiquitinierungsversuchen nicht festgestellt werden. Da es bisher keine Erkenntnisse darüber gab, ob die stabilisierende und membranrekrutierende Funktion des Cue1 von dessen aktivierender Funktion bei der Ubiquitinkettenbildung entkoppelt werden kann, wurden zunächst carboxyterminale Verkürzungen von Cue1 auf ihre, die Polyubiquitinierung verstärkende Wirkung getestet. In einem Reaktionsansatz zur *in vitro* Ubiquitinierung liegen alle aufgereinigten Proteine stabil und löslich vor, und die Konzentration des Ubc7 ist in einem solchen Versuch um mehrere Potenzen höher als das in Abwesenheit von Cue1 im Zytosol einer Zelle fehllokalisierte Ubc7. Daher bestand die Möglichkeit,

Ergebnisse

dass in einer *in vitro Reaktion* die rekrutierende und stabilisierende Funktion von Cue1 für die Polyubiquitinierung vernachlässigbar ist.

Um dies zu untersuchen, wurden nicht-epitopmarkierte Cue1-Konstrukte ohne Transmembranbereich verwendet. Das WT-Konstrukt beinhaltet den gesamten Carboxyterminus, wohingegen die Konstrukte 174 und 115 carboxyterminal um 29 bzw. 88 Aminosäuren verkürzt waren. Das Konstrukt CUE bestand allein aus der exprimierten CUE-Domäne und war somit sowohl amino- als auch carboxyterminal im Vergleich zum WT deutlich verkürzt. In Abbildung 10A wird die Ubiquitinkettenbildung von Ubc7 in Anwesenheit des WT-Cue1-Konstrukts sichtbar. Im Gegensatz zum WT-Cue1 ließ sich für die Cue1-Verkürzungen oder die CUE-Domäne keine Verstärkung der Ubiquitinierungsaktivität erkennen. Die Bindung von Ubc7 an die carboxyterminalen Aminosäuren von Cue1 scheint also eine Voraussetzung für die Stimulation der Ubiquitinkettenbildung von Ubc7 durch Cue1 zu sein.

Auch die Rolle der CUE-Domäne in Cue1 ist in der Vergangenheit diskutiert worden. Während CUE-Domänen anderer Proteine eine ausgeprägte Bindung von Mono- oder Polyubiquitin aufweisen, konnte für Cue1 lediglich eine schwache Bindung von Polyubiquitinketten gezeigt werden. Weiterhin lieferte die Deletion der Cue1-CUE-Domäne bisher keine Hinweise für eine Beeinträchtigung der Zusammensetzung der Ligasekomplexe oder des Substratproteinabbaus. Trotz dieser Befunde sollten Cue1-Konstrukte mit verschiedenen Mutationen in der *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion auf ihre Funktion getestet werden. Für die ubiquitinbindenden Eigenschaften vieler CUE-Domänen ist ein Motiv von drei konservierten Aminosäuren, MFP, notwendig. Mutationen in diesem Bereich, besonders des Prolins, führen fast immer zum Verlust der Ubiquitinbindung. Die CUE-Domäne in Cue1 weist hingegen nicht diese konservierten Aminosäuren sondern stattdessen LAP in der Proteinsequenz auf. Zumindest teilweise ist diese Abänderung für die Reduktion der Ubiquitinbindung durch die Cue1-CUE-Domäne verantwortlich, da eine Mutation von LAP zu MFP eine Verstärkung der Ubiquitinbindung bedeutet [25] .

Für die Untersuchungen wurden drei verschiedene Cue1-Varianten generiert. Das erste Konstrukt wies einen Aminosäureaustausch von LAP nach RGA auf (RGA-Variante), bei dem zweiten Konstrukt wurde das LAP-Motiv deletiert (Δ LAP) und beim dritten Konstrukt wurde eine Deletion der gesamten CUE-Domäne vorgenommen (Δ CUE). Wie in Abbildung 10A dargestellt, sind die Cue1-Mutanten Δ LAP und Δ CUE in der Lage, die Ubiquitinkettenbildung von Ubc7 zu ermöglichen bzw. zu verstärken,

allerdings sind die Ubiquitinketten im Vergleich zur Reaktion mit dem WT-Cue1 deutlich kürzer.

Um dieses Phänomen genauer zu charakterisieren, wurden die Ubiquitinierungsreaktionen des Cue1-WT und der beiden Cue1-Varianten in Abhängigkeit der Reaktionszeit verfolgt (Abb. 10B). Es bestätigte sich nicht nur, dass die mit Hilfe der Δ LAP- oder Δ CUE-Variante geformten Ubiquitinketten tatsächlich niedrigmolekularer sind als die mit Hilfe des WT-Cue1 geformten Ketten. Die Mutation der CUE-Domäne scheint auch eine Verzögerung der Polyubiquitinierung zu verursachen.

Nach 10 min Reaktionszeit sind in der Reaktion von Ubc7 und WT-Cue1 deutlich stärkere Signale für konjugierte Ubiquitinmoleküle nachweisbar als zum gleichen Zeitpunkt in den Reaktionen mit den CUE-Domänen-Varianten. Die Unterschiede in der Länge der Ubiquitinketten und der Ubiquitinierungs-geschwindigkeit sind nicht nur bei den gebildeten freien Ubiquitinketten sichtbar sondern auch bei den auf Cue1 selbst konjugierten Ubiquitinmolekülen. Es stellte sich nun die Frage, welchen Einfluss die Mutation der CUE-Domäne auf eine Reaktion von Ubc7, Cue1 und einer Ubiquitinligase hat. Abbildung 10C zeigt *in vitro* Ubiquitinierungsansätze von Ubc7 mit Doa10 oder Hrd1 in Ab- oder Anwesenheit des Cue1-Wildtyp oder der RGA-Variante. Es fällt auf, dass die geformten Ubiquitinketten, bei ungefähr gleicher Menge an eingesetzter Ligase, in den Reaktionen mit Doa10 wesentlich niedrigmolekularer, d. h. kürzer, und auch in ihrer Anzahl gegenüber den Reaktionen mit Hrd1 reduziert sind. Dies könnte bedeuten, dass die Reaktivität von Doa10 im Allgemeinen geringer ist als die des Hrd1. Die Unterschiede könnten aber auch auf die verschiedenen großen Proteinbereiche der Ligasen zurückzuführen sein. Dabei könnte das etwa um 100 Aminosäuren größere Hrd1-Fragment, im Gegensatz zum Doa10-Fragment, Elemente aufweisen, welche die Ubiquitinierung verstärken. Da beide E3-Enzyme auch in Abwesenheit von Cue1 in der Lage sind, in geringem Maße Polyubiquitin mit Ubc7 zu assemblieren, werden die Effekte der Cue1-abhängigen stimulierten Ubiquitinierung und somit auch der Einfluss der CUE-Domäne in diesen Reaktionen teilweise überdeckt. Dennoch bleibt der Unterschied in der Länge der gebildeten Ubiquitinketten zwischen Reaktionen mit WT-Cue1 oder der RGA-Variante erkennbar.

Ergebnisse

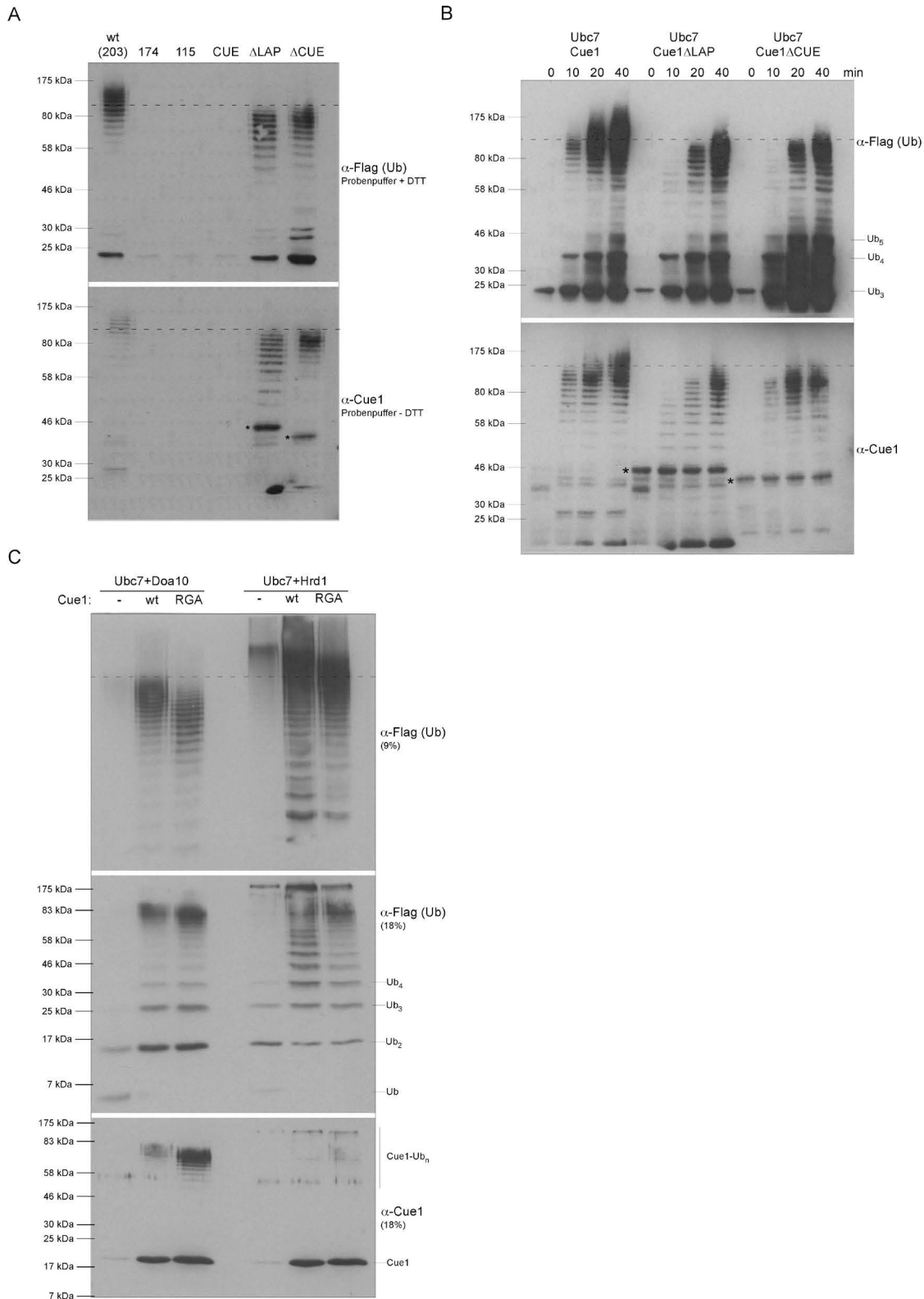


Abbildung 10: Einfluss verschiedener Cue1-Varianten auf die Ubc7-abhängige *in vitro* Ubiquitinierung. A: Reaktionen von Ubc7 mit Hrd1 und Cue1-Varianten in Anwesenheit von Flag-Ubiquitin und ATP für 15 min. B: Untersuchung verschiedener Cue1-Varianten in einer Reaktion mit Ubc7. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden der Reaktion Proben entnommen und per Immunoblotting analysiert. C: Verhalten von WT-Cue1 und der Cue1-RGA-Variante bei *in vitro* Ubiquitinierungen an der Doa10- oder Hrd1-Ligase. Die Reaktionen wurden nach 15 min Inkubation durch Zugabe von Probenpuffer gestoppt und anschließend analysiert.

2.8 Cue1 bindet K48- und K63-verknüpftes Polyubiquitin in Abhängigkeit seiner CUE-Domäne

Ausgehend von der Annahme, dass die für CUE-Domänen beschriebene Funktion der Ubiquitinbindung zutrifft, müsste der Einfluss der Cue1-CUE-Domäne auf die Geschwindigkeit der Polyubiquitinierung und die Länge der Ketten auf einen Defekt bei der Bindung von Ubiquitin zurückzuführen sein. Wie bereits erwähnt, wurde für Cue1 bislang nur eine sehr geringe Ubiquitin-bindende Fähigkeit beobachtet. Für eine bessere Einschätzung dieser Resultate wurde die Bindung von Ubiquitin an Cue1 erneut untersucht (Abb. 11A). Einige ubiquitinbindenden Domänen haben Präferenzen für Mono- oder Polyubiquitin bzw. für Ubiquitinketten, die über einen bestimmten Lysinrest miteinander verknüpft sind. Um zu untersuchen, ob Cue1 ebenfalls eine Präferenz für bestimmte Ubiquitinketten aufweist, wurden prä-assemblierten Ubiquitinketten gekauft (zwei bis sieben konjugierte Ubiquitinmoleküle, Ub₂-Ub₇), die entweder eine Lysin48-Verknüpfung oder aber eine Lysin63-spezifische Verknüpfung aufwiesen. Die Qualität der käuflich erworbenen Ubiquitinketten differierte zum Teil erheblich. Bei den K48-Ketten waren statt sieben konjugierter Ubiquitinmoleküle häufig nur Ub₅-Ketten nachweisbar. Die K63-Ketten zeigten hingegen auch längere Verknüpfungen. Die zu untersuchenden Cue1-Varianten, aber auch die UBA-Domäne von Dsk2 wurden als GST-Fusionen exprimiert und durch Bindung an Glutathion-SepharoseTM immobilisiert. Für die UBA-Domäne von Dsk2 konnte in früheren Experimenten eine sehr gute Ubiquitinbindung festgestellt werden, weshalb sie in diesem Versuchsaufbau als Positivkontrollen diente. Die immobilisierten GST-Fusionsproteine wurden in einer Lösung mit den verschiedenen Ubiquitinketten inkubiert, gewaschen und anschließend auf die Menge des gebundenen Ubiquitins hin untersucht (P). Auch wurde nach der Inkubation getestet, wie viel nicht gebundenes Ubiquitin im Überstand verblieben ist (Ü).

Aus dem Immunblot gegen GST in Abbildung 11A geht hervor, dass die verschiedenen GST-Fusionsproteine in etwa vergleichbarer Menge in den Proben vorlagen. Allerdings zeigen sich bei einigen Fusionsproteinen niedermolekulare Abbauprodukte sowie GST allein. Um eine Bindung des Ubiquitins an GST auszuschließen, diente aufgereinigtes immobilisiertes GST in dieser Bindungsstudie als Negativkontrolle. Der Immunblot gegen Ubiquitin belegt, dass GST allein weder Lysin48-verknüpftes noch Lysin63-verknüpftes Polyubiquitin bindet (P). Infolge dessen verblieb nach der Inkubation sämtliches Ubiquitin im Überstand (Ü). Untersucht man die Fähigkeit der

Ergebnisse

Cue1-Fusionsproteine Cue1 Δ TM (WT) sowie die carboxyterminale Verkürzung von Cue1 (174) Lys48-verknüpftes Ubiquitin zu binden, so befindet sich das Ubiquitin nach der Inkubation in der Pelletfraktion. Dies belegt einerseits, dass Cue1 prinzipiell in der Lage ist Polyubiquitin zu binden, und andererseits zeigt es, dass die Ubc7-bindende Region in Cue1 nicht zu dieser Fähigkeit beiträgt. Hiermit wird die ubiquitinbindende Funktion von Cue1 klar von der Ubc7-rekrutierenden Funktion getrennt. Ein gewisser Anteil an Ubiquitin in den Überstands-Proben nach der Inkubation, könnte auf ein geringes Bindungsvermögen der Cue1-Varianten hinweisen, oder aber es liegt eine Sättigung der Cue1-Moleküle vor. In diesem Fall wären mehr Ubiquitinketten vorhanden als Cue1-Moleküle, die diese binden. Diese Überlegungen lassen sich teilweise durch Betrachtung der Ubiquitinbindung an die Dsk2-UBA-Domäne besser einschätzen. Im Vergleich zum WT-Cue1 scheint die UBA-Domäne doch etwas mehr Ubiquitin gebunden zu haben, auch wenn hier ebenfalls ein geringer Anteil kurzer Ubiquitinketten im Überstand verbleibt. Dies lässt auf ein im Vergleich zu Dsk2 etwas geringeres Ubiquitin-Bindungsvermögen des Cue1 schließen. Allerdings scheinen unter diesen Versuchsbedingungen die Unterschiede nicht so gravierend zu sein wie angenommen.

Anhand der untersuchten Cue1-Varianten mit fehlerhafter CUE-Domäne in diesem Experiment zeigt sich, dass keine dieser 3 Varianten Ubiquitin bindet. Ein Aminosäureaustausch (LAP zu RGA) in der für andere CUE-Domänen konservierten Region genügt, um die Bindung von Lys48-verknüpften Ubiquitin an Cue1 völlig zu unterbinden. Allerdings konnte auch der exprimierte Bereich der minimalen CUE-Domäne (CUE domain) nicht mit den Ubiquitinketten interagieren – das Ubiquitin liegt hier vollständig im Überstand vor. Es wäre durchaus denkbar, dass die als GST-Fusion aufgereinigte CUE-Domäne nicht ihre native Faltung erlangt hat und deshalb die Fähigkeit Ubiquitin zu binden nicht vorhanden ist. Ein weiterer Grund für die fehlende Ubiquitinbindung könnte an der Auswahl der Sequenz bzw. der Abgrenzung der CUE-Domäne liegen. Wie erwähnt, wurde für die Expression der Domäne ein Bereich gewählt, der laut Strukturvorhersage eine minimale CUE-Domäne repräsentiert. Vielleicht sind jedoch auch Aminosäuren außerhalb dieses Bereichs für deren Funktion notwendig.

Ergebnisse

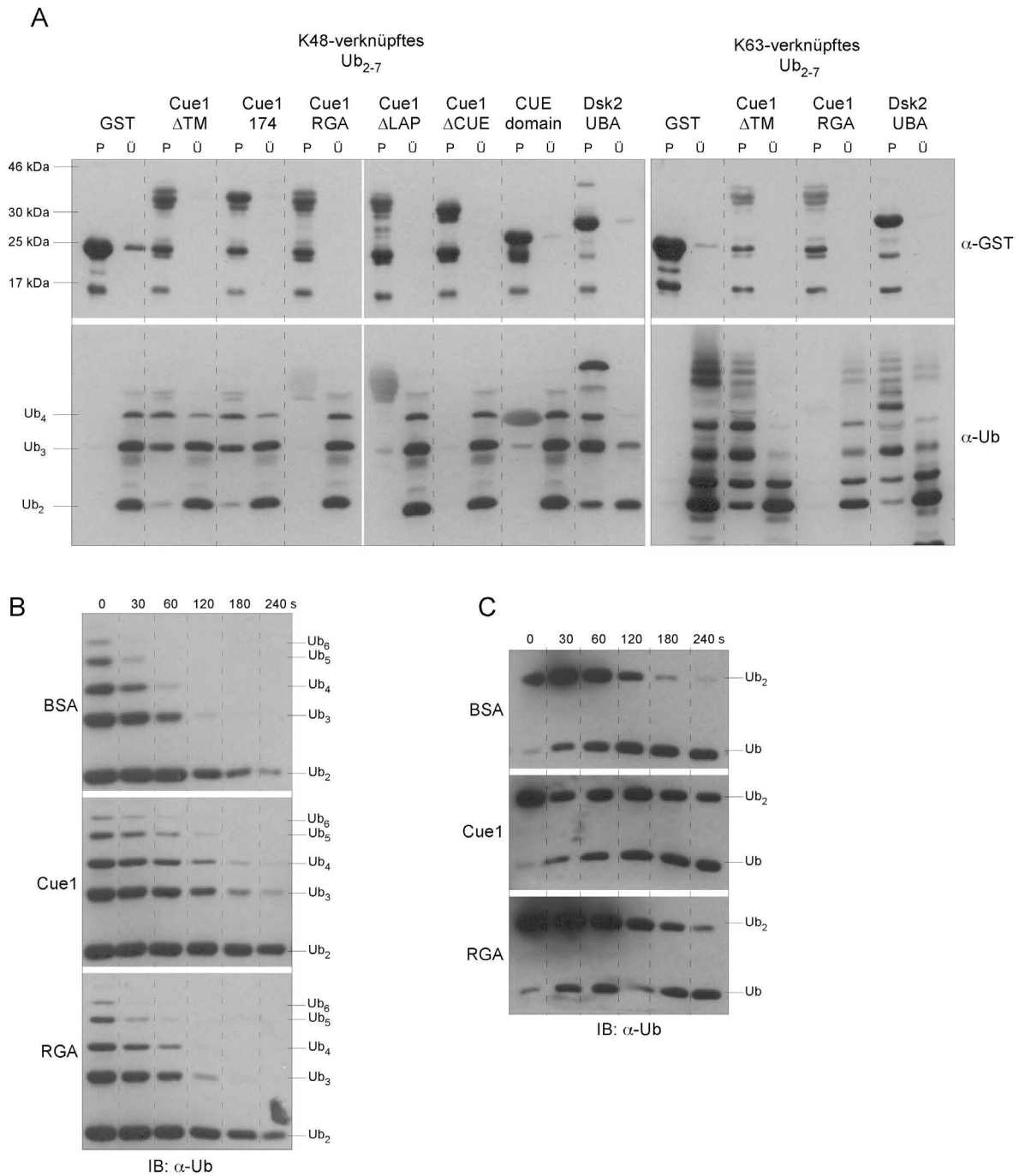


Abbildung 11: Bindung und Schutz von Ubiquitinketten durch die Cue1CUE-Domäne. A: *In vitro* Bindung von prä-assemblierten Ubiquitinketten an verschiedene immobilisierte GST-Cue1-Fusionen und die UBA-Domäne von Dsk2. Analyse von Überstand (Ü) und immobilisiertem Material (P) nach 4-stündiger Bindung bei 4 °C. * markiert das Signal für GST-Dsk2-UBA im anti-Ub-Immunblot. B,C: Inkubation von K48-verknüpften Ubiquitinketten mit BSA, WT-Cue1 oder der RGA-Variante auf Eis. Analyse des Kettenabbaus nach Zugabe des humanen deubiquitinierenden Enzyms Otubain1 in einem Zeitraum von 240 s. Rechter und linker Immunblot entstammen demselben Experiment. C: Abnahme des Diubiquitin bei gleichzeitiger Zunahme des Monoubiquitin.

Analysiert man die Bindung von Lys63-verknüpften Ubiquitinketten, so zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei den Lys48-verknüpften Ketten. WT-Cue1 bindet die Ubiquitin-

ketten, während die RGA-Variante diese Fähigkeit verloren hat. Erstaunlicherweise bindet die Dsk2-UBA-Domäne zwar Lys63-verknüpftes Ubiquitin, diese Bindung scheint jedoch schwächer zu sein als die Bindung der Lys63-verknüpften Ketten an Cue1. Es bleibt zu spekulieren, ob die Cue1-CUE-Domäne tatsächlich eine höhere Affinität für Ubiquitinketten aufweist, die nicht über Lys48 verknüpft sind. Leider war es aus technischen Gründen (Mangel an verschiedenen prä-assemblierten Ubiquitinketten) nicht möglich, die Bindung weiterer, unterschiedlicher Ubiquitinketten an Cue1 zu untersuchen. Sofern geeignete Ketten verfügbar wären, könnte z.B. eine Biacore-Bindungsstudie Aufschluss über die differenzierte Affinität des Cue1 zu Ubiquitinketten verschiedener Verknüpfung und Länge geben.

2.9 Die CUE-Domäne schützt Polyubiquitinketten partiell vor Prozessierung durch ein deubiquitinierendes Enzym

Um einen weiteren Nachweis für die Ubiquitin-bindende Eigenschaft der Cue1-CUE-Domäne zu erbringen, wurden Ubiquitinketten in An- oder Abwesenheit einer intakten CUE-Domäne mit einem deubiquitinierenden Enzym versetzt. Die Bindung der CUE-Domäne an eine Ubiquitinkette würde die Kette „maskieren“ und eine Spaltung der Kette durch die spezifische Protease verhindern. Um diese Hypothese zu testen wurde die Prozessierung von Lysin48-verknüpften Ubiquitinketten durch das Lys48-spezifische deubiquitinierende Enzym Otubain1 in einer zeitabhängigen Reaktion untersucht (Abb. 11B). Den entsprechenden *in vitro* Reaktionen wurde in vergleichbarer Menge entweder BSA als Negativkontrolle, WT-Cue1 (Δ TM), oder die Cue1-RGA-Variante zugefügt. Zum Zeitpunkt 0, vor Zugabe des Otubain1, befand sich in allen Reaktionen die gleiche Menge an Ubiquitinketten. Während der anschließenden 240 sekundigen Inkubation in einem Eisbad fand insgesamt ein deutlicher Abbau der Ubiquitinketten statt.

In der Reaktion mit BSA sind nach 120 s Reaktionszeit nahezu keine Tetraubiquitinketten mehr vorhanden, nach 180 s sind auch Triubiquitinmoleküle nur noch schwer detektierbar. Aus Abbildung 11C wird ersichtlich, dass in dem Maße wie die Ubiquitinketten degradiert werden, die Menge an Monoubiquitin zunimmt. Dies gilt nicht nur für die Reaktion mit BSA sondern auch für die mit den Cue1-Varianten versetzten Proben. Im Vergleich zur Probe mit BSA verläuft die Deubiquitinierung der Ubiquitinketten durch Otubain1 in der Reaktion mit WT-Cue1 signifikant verzögert. Nach 120 s Reaktionszeit sind nicht nur Tetra- sondern auch Pentaubiquitinmoleküle

Ergebnisse

erhalten. Und sowohl Triubiquitin als auch ein geringer Teil Tetraubiquitin kann nach Ablauf der 240 s Beobachtungszeitraum noch nachgewiesen werden.

Wie erwartet werden die Ubiquitinketten in der Probe mit der Cue1-RGA-Variante ebenso schnell abgebaut wie in der Kontrollreaktion mit BSA. Nach 240 s ist in dieser Probe neben Mono- nur noch Diubiquitin detektierbar. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Cue1 in diesem System durch seine CUE-Domäne in der Lage ist Ubiquitinketten zu binden und diese somit partiell vor Degradation durch eine Ubiquitin-spezifische Protease zu schützen. In den zuvor beschriebenen *in vitro* Reaktionen, die eine verzögerte und verringerte Polyubiquitinierung nach Mutation der CUE-Domäne aufwiesen, waren allerdings keine deubiquitinierenden Enzyme anwesend, weshalb der Schutz der Ubiquitinketten vor vorzeitigem Abbau nur eine Teilfunktion der CUE-Domäne sein kann.

Somit kann der Cue1-CUE-Domäne nach Auswertung der *in vitro* Untersuchungen erstmals eine umfassende Funktion zugeschrieben werden. Die CUE-Domäne bindet Ubiquitinketten verschiedener Verknüpfungen. Weiterhin ermöglicht Cue1 mit seiner CUE-Domäne in Interaktion mit Ubc7 eine schnelle und effektive Polyubiquitinkettenbildung, wobei die Ketten, wahrscheinlich durch strukturelle Stabilisierung des Ubiquitinierungskomplexes, eine gesteigerte Länge im Vergleich zu CUE-Domänen-Varianten aufweisen. Gleichzeitig kann die CUE-Domäne die gebundenen Ketten zumindest teilweise vor Abbau durch deubiquitinierende Enzyme schützen. Weshalb wurde bislang kein Effekt einer Deletion der Cue1-CUE-Domäne *in vivo* beobachtet? Ist die Funktion der CUE-Domäne für Zellen vielleicht vernachlässigbar, solange die Substratproteine am Hrd1- oder Doa10-Ligasekomplex noch in ausreichendem Maß ubiquitiniert, das heißt mit genügend langen Ubiquitinketten versehen werden? Wird die Rolle der CUE-Domäne erst unter bestimmten zellulären Stressbedingungen deutlich? Gibt es vielleicht Unterschiede in der Relevanz der CUE-Domäne für verschiedene Klassen von Substratproteinen, die bisher nicht betrachtet wurden?

Die Bedeutung der Cue1-CUE-Domäne in zellulären Stresssituationen ist bereits früher untersucht worden. Starke Belastungen des Endoplasmatischen Retikulum durch Behandlung der Zellen mit Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung, oder dem stark reduzierend wirkenden DTT hatten zwar im Allgemeinen einen dramatischen Einfluss auf Zellwachstum, Proteinfaltung und den Abbau der fehlgefalteten Proteine, eine zusätzliche Veränderung durch Mutation oder Deletion der CUE-Domäne wurde jedoch nicht beobachtet. Auch die vermeintliche Störung des ERAD

durch gleichzeitige Deletion zweier Ubiquitin-bindender Domänen, nämlich der Cue1-CUE-Domäne und der UBA-Domäne von Ubx2, zeigte keinerlei Beeinträchtigung des Substratproteinabbaus (ohne Abbildung).

2.10 Einfluss der CUE-Domäne auf die Protein-Protein-Wechselwirkungen an den Ligasekomplexen

Die *in vitro* Experimente offenbarten, dass die Deletion der CUE-Domäne einen Einfluss auf die Polyubiquitinierung durch Ubc7 an einer Ligase hat. Doch wie wirkt sich eine Deletion der CUE-Domäne an einem Ligasekomplex *in vivo* aus? Durch Immunpräzipitation einer Ligase und die Co-Präzipitation der interagierenden Enzyme und Adapterproteine sollten die Vorgänge genauer untersucht werden. Aufgrund der im Vergleich zur Hrd1/Hrd3-Immunpräzipitation besseren Detektierbarkeit der ligase-assoziierten Faktoren an der Doa10-Ligase, wurde, nach Expression verschiedener *cue1*-Mutanten, aminoterminal myc-epitopmarkiertes Doa10 mittels eines anti-myc Antikörpers gefällt und die Zusammensetzung des Ligasekomplexes betrachtet (Abb. 12). Im Anschluss an den Zellaufschluss wurden die Membranen präpariert und solubilisiert. Wie in der linken Hälfte der Abbildung erkennbar, wurden das Plasmid-kodierte Wildtyp-*CUE1* ebenso gut exprimiert wie das endogene, chromosomal kodierte *CUE1*. Die *cue1* Δ *CUE*-Mutante und die Mutante *cue1LL(179,180)SS*, die einen Defekt bei der Bindung von Ubc7 aufweist, sind sogar etwas stärker exprimiert. Wie erwartet, ist in Membranen aus Δ *cue1*-Zellen kein Ubc7-Protein vorhanden. Auch die Expression der *LL(179,180)SS*-Mutante führt offenbar zum Verlust der Ubc7-Rekrutierung an die Membran. Bei längerer Exposition eines Röntgenfilms auf dem Immunblot wird jedoch ein sehr schwaches Signal für membranlokalisiertes Ubc7 sichtbar (ohne Abbildung). Die Menge an membranrekrutiertem Ubc7 in diesem Stamm ist also lediglich deutlich reduziert. Expression der übrigen *cue1*-Mutanten beeinflussten die Lokalisierung des Ubc7 nicht, es ist in vergleichbaren Mengen im Solubilisat der Membranen vorhanden. Weitere Ligase-interagierende Proteine, Ubx2 und Cdc48 sind in allen *cue1*-Mutanten unverändert im Vergleich zu *CUE1*-WT exprimiert und die verschiedenen Cue1-Proteine membranlokalisiert. Nur die zum Zeitpunkt des Zellaufschlusses vorhandenen Ubc6-Mengen weisen kleine Unterschiede zwischen untersuchten Stämmen auf.

Nach Immunpräzipitation des Doa10 wurden die Proben auf co-präzipitierte Proteine untersucht (rechte Hälfte der Abbildung). Alle Cue1-Varianten sind in der Lage, mit der Ligase in etwa gleicher Stärke zu interagieren. Die CUE-Domäne bzw. deren

Ergebnisse

Veränderung spielt demzufolge bei der Wechselwirkung mit der Ubiquitinligase keine Rolle. Anders sieht die Situation für die Interaktion von Ubc7 mit Doa10 in den *cue1*-Mutanten aus. In Zellen mit WT-*CUE1* zeigt Ubc7 eine gute Bindung an Doa10. Auch die *cue1RGA*-Mutante scheint diese Interaktion nicht zu stören. Im Gegensatz dazu schwächt eine Deletion der CUE-Domäne die Wechselwirkung zwischen Ubc7 und Doa10. Dies wurde aus der Analyse der *in vitro* Versuche nicht ersichtlich, spielte aber vielleicht bei einer Polyubiquitinierungsreaktion mit löslichen Proteinen keine große Rolle.

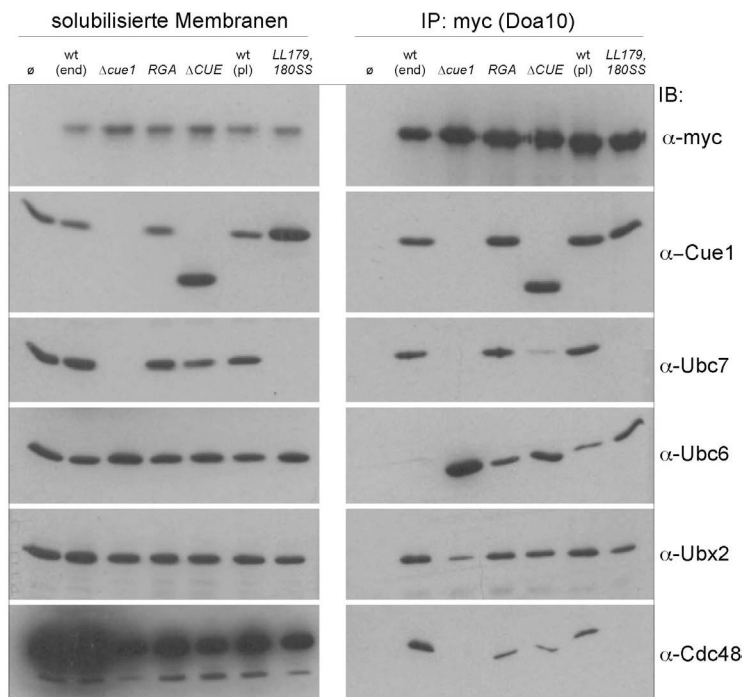


Abbildung 12: Einfluss der Expression von *cue1*-Mutanten auf die Proteinkomposition an der ER-Membran und der Doa10-Ligase. Expression der *cue1*-Mutanten sowie des WT-*CUE1* von einem ARS/CEN-Plasmid. Immunpräzipitation von myc-epitopmarkiertem Doa10 aus Digitonin-solubilierten Hefemembranen. Co-präzipitierte Proteine wurden durch Antigen-detektion mit Hilfe proteinspezifischer Antikörper nachgewiesen.

In vivo hingegen könnte die mit der Deletion der CUE-Domäne einhergehende Verkürzung von Cue1 um etwa 40 Aminosäuren eine Veränderung in der Struktur des Ligasekomplexes hervorrufen. Eine deutliche Verringerung des Abstands von Cue1-gebundenem Ubc7 zur ER-Membran und zur Doa10-Ligase könnte zu einer Störung der E2-E3 Interaktion führen. Eine sehr transiente Wechselwirkung des E2 mit dem E3 würde ebenfalls in einer schwachen Ligasebindung des Ubc7 in der *cue1ΔCUE*-Mutante resultieren. Es ist vorstellbar, dass aufgrund der fehlenden Stabilisierung der substratkonjugierten Ubiquitinkette an der Ligase, die Interaktion von Ubc7, Doa10 und dem Substrat nicht so stabil ist wie unter WT-Bedingungen.

Ergebnisse

Abwesenheit oder Reduktion von Ubc7-Mengen an der ER-Membran, wie im $\Delta cue1$ -Stamm oder der *cue1LL(179,180)SS*-Mutante, führt zur Stabilisierung des mit Doa10-interagierenden kurzlebigen Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc6. Dies wird auch nach Co-Präzipitation des Ubc6 mit der Ligase deutlich, da in diesen Stämmen im Vergleich zum *CUE1*-WT eine höhere Menge von Ubc6 mit der Ligase assoziiert ist. Es fällt auf, dass bei Expression des endogen kodierten WT-*CUE1* nahezu kein Ubc6 mehr mit der Ligase interagiert, während mit dem Plasmid-kodierten WT-*CUE1* noch ein gewisser Anteil an Ubc6 mit Doa10 co-präzipitiert. Es ist möglich, dass das Cue1-Protein, welches durch Expression des Plasmid-kodierten *CUE1* synthetisiert wird, aus unbekanntem Gründen nicht die Funktionalität des Proteins erreicht, das durch Expression des chromosomalen *CUE1* gebildet wird. Somit würde Ubc6 durch die beiden verschiedenen WT-Cue1-Proteine nicht in gleichem Maße abgebaut. Eine solche Beobachtung ist bereits früher auch für die Expression anderer Plasmid-kodierter Proteine gemacht worden. In der *cue1RGA*- und der *cue1ΔCUE*-Mutante sind die Ubc6-Mengen am Ligasekomplex im Verhältnis zum WT-*CUE1* erhöht, wobei die Wechselwirkung von Ubc6 mit der Ligase in der *cue1ΔCUE*-Mutante stärker ist als die in der *RGA*-Mutante.

Die Interaktion von Ubx2 und Cdc48 mit Doa10 wird über die Aktivität des Ligasekomplexes reguliert. In Zellen, die WT-*CUE1* exprimieren, interagiert deshalb relativ viel Ubx2 und Cdc48 mit der Doa10-Ligase. Andererseits wird in $\Delta cue1$ -Zellen oder in Stämmen, welche die *cue1LL(179,180)SS*-Mutante exprimieren, nahezu kein Cdc48 an die Ligase rekrutiert. Ebenso sind die Mengen von Cdc48 in der *cue1RGA*- und *cue1ΔCUE*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp reduziert, was auf eine verminderte Ubiquitinierungsaktivität des Ligasekomplexes hinweist.

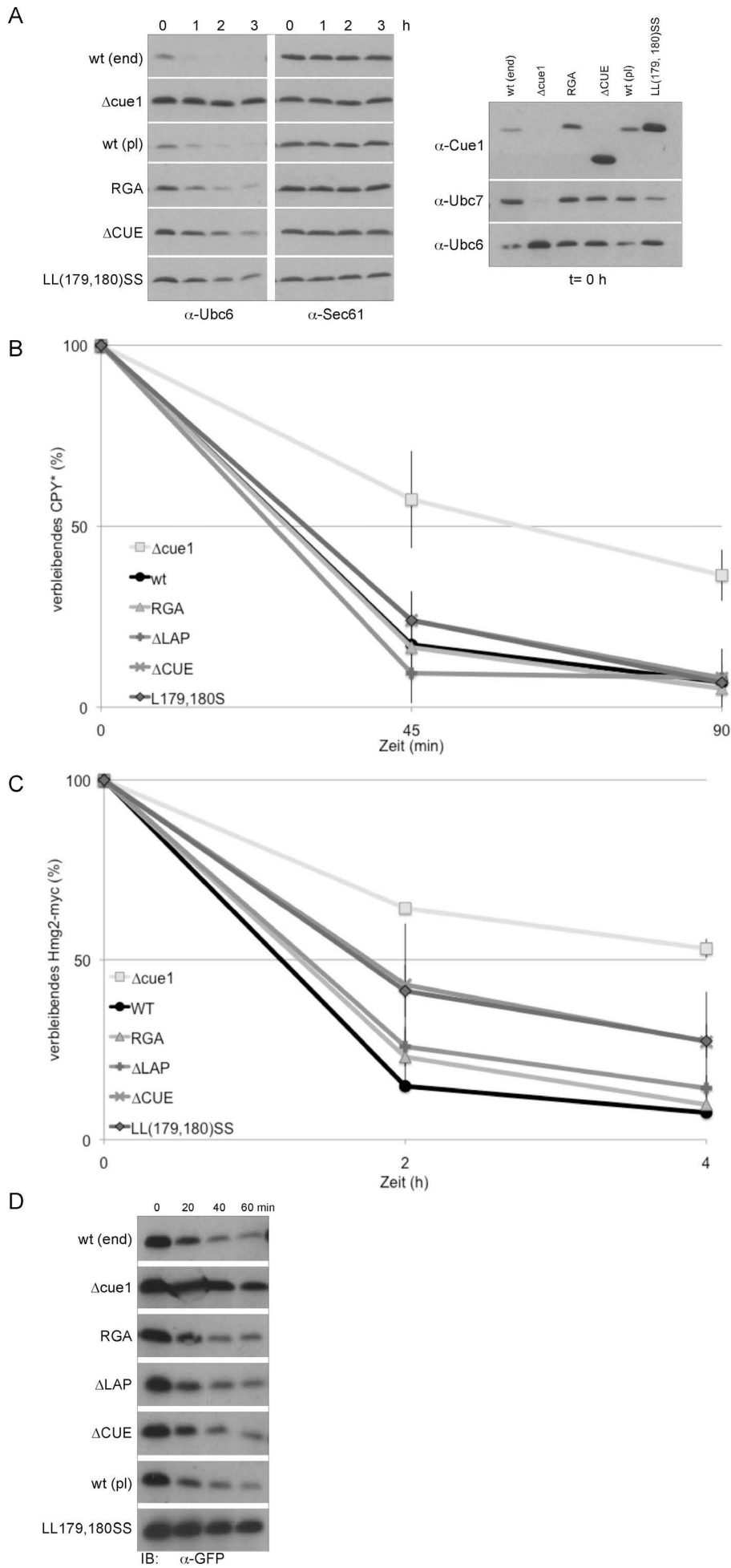
Es wurde einmal mehr bestätigt, dass die Bindung von Ubc7 an eine definierte carboxyterminale Region von Cue1 für dessen Rekrutierung an die ER-Membran und Integration in den Doa10-Ligasekomplex erforderlich ist. Ein Austausch zweier Leucinreste gegen Serin reicht aus, um die Bindung von Ubc7 an Cue1 deutlich zu reduzieren. Dieser Aminosäureaustausch hat auch eine Stabilisierung des Ubc6 im Ligasekomplex zur Folge. Die fehlende Substratubiquitinierung am Ligasekomplex führt weiterhin zu einer Abwesenheit von Cdc48 an Doa10. Dies zeigt erneut, dass die Aktivität von Ubc6 allein an der Ligase nicht für eine Cdc48-Rekrutierung und im Folgenden nicht für den Abbau von Substratproteinen genügt. Die Deletion der Cue1-CUE-Domäne resultiert in diesem Versuch in einer verringerten Ubc7-Einbindung in

den Doa10-Ligasekomplex, wohingegen die Menge an ligaseassoziiertem Ubc7 in der *cue1RGA*-Mutante der des WT-*CUE1* gleicht. Trotzdem ist in dieser Mutante, wie auch in der *cue1ΔCUE*-Mutante, Ubc6 im Vergleich zu WT-*CUE1* stabilisiert und weniger Cdc48 mit der Ligase assoziiert.

2.11 Die Deletion der CUE-Domäne führt zur Stabilisierung membrangebundener Substratproteine

Wie bereits eingangs erwähnt, konnte bislang kein Phänotyp für eine *cue1ΔCUE*-Mutante beschrieben werden. Es ist aber anhand der Immunpräzipitationsexperimente in Abbildung 12 erkennbar, dass die Zusammensetzung des Doa10-Ligasekomplexes in einer solchen Mutante verändert ist. Dies schien jedoch bislang ohne Folgen für den Abbau einiger untersuchter Substrate. Allerdings resultiert die Expression von *cue1*-CUE-Domänen-Mutanten in einer erhöhten Ubc6-Menge an der ER-Membran. Aus diesem Grund war es interessant, den Abbau von Ubc6 im *CUE1*-WT und in den *cue1*-Mutanten näher zu untersuchen. In einem Zeitraum von 3 Stunden nach Inhibition der Proteinneusynthese durch Cycloheximid-Behandlung der Zellen, wurde die Abnahme der Ubc6-Mengen im Gesamtzellextrakt betrachtet. In der rechten Hälfte der Abbildung 13A sind die Mengen der Proteine Cue1, Ubc7 und Ubc6 zum Zeitpunkt 0, das heißt direkt nach Zugabe des Cycloheximids dargestellt. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf des Ubc6-Abbaus. Wie auch schon bei der Immunpräzipitation von Doa10 beschrieben, ist Ubc6 in einem Hefestamm mit plasmidkodiertem WT-*CUE1* etwas stabiler als mit endogen kodiertem *CUE1*, das heißt, es wird langsamer abgebaut. Eine weitere Verzögerung seines Abbaus erfährt Ubc6 durch Mutation der CUE-Domäne, wobei die Mutante *cue1ΔCUE* wiederum einen größeren Effekt zeigt als die Punktmutante *cue1RGA*. Die *cue1LL(179,180)SS*-Mutante, bei der die Ubc7-Bindung durch das Cue1-Protein gestört ist, sowie die Deletion von *cue1*, resultieren in noch stärkerem Maße in einer Stabilisierung von Ubc6. Bei *cue1*-defizienten Stämmen ist, wie erwartet, nahezu kein Ubc6-Abbau während des Beobachtungszeitraums erkennbar. Ubc6 ist also das erste bekannte Substratprotein, welches durch das Fehlen der CUE-Domäne in Cue1 nur noch vermindert abgebaut werden kann.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 13: Abbau von Substratproteinen an der Hrd1- oder Doa10-Ligase in Abhängigkeit verschiedener *cue1*-Mutanten. Transformation von Hefezellen und Expression des *WT* und der *cue1*-Mutanten von einem ARS/CEN-Plasmid. A, D: Cycloheximid-Abbau-Versuche von Doa10-abhängigen Substratproteinen. B,C: Pulse-Chase-Experimente zur Untersuchung des Abbaus von Substraten am Hrd1-Ligase-Komplex. A: Abbau von Ubc6 im Untersuchungszeitraum von 3 Stunden (linke Seite) und Darstellung der Expressionslevel des Substrats sowie von Cue1/Ubc7 zu Beginn des Versuchs (rechte Seite). Analyse des Gesamtzellextraktes nach Behandlung der Proben mit 1 % SDS. B: Degradation von CPY* innerhalb der ersten 90 min nach 8-minütiger radioaktiver Markierung der neusynthetisierten Proteine. C: Hmg2-myc-Abbau innerhalb 4 Stunden nach 12-minütiger Markierung der Proteine mit ³⁵S Cys/Met-Mix. D: Proteolyse von Deg1-GFP (pUL028) in den 60 min nach Inhibition der Proteinneusynthese durch Cycloheximid.

Am Endoplasmatischen Retikulum werden über die Ligasekomplexe Hrd1 und Doa10 Proteine verschiedener Substratklassen für den proteasomalen Abbau ubiquitiniert. An beiden Ligasen ist das Heterodimer aus Cue1 und Ubc7 für die Substratubiquitinierung erforderlich. Deshalb wurde im Folgenden nicht nur der Abbau eines zytosolischen Doa10-Substrats in Gegenwart der *cue1ΔCUE*-Mutante untersucht, sondern auch ein ER-luminales sowie ein integrales ER-Membranprotein analysiert. Als ER-luminales Substratprotein, welches Hrd1-abhängig abgebaut wird, diente erneut die G(259)R-Mutante der CarboxypeptidaseY (CPY*). Während die Deletion von *cue1* in dem durchgeführten Pulse-Chase-Experiment eine signifikante Stabilisierung des CPY* über den beobachteten Zeitraum von 90 min hervorruft (Abb. 13B), erfolgt der Abbau von CPY* im Wildtyp-Stamm und in den *cue1*-Mutanten mit ähnlicher Geschwindigkeit. Dies zeigt, dass die Veränderung oder Deletion der CUE-Domäne keinen Einfluss auf den CPY*-Abbau hat. Erstaunlicherweise führt auch die Mutation *cue1LL(179,180)SS*, bei der nur sehr geringe Mengen von Ubc7 an die Ligase gebracht werden, nicht zu einer Stabilisierung des CPY*.

In einem weiteren Pulse-Chase-Experiment wurde der Abbau des integralen ER-Membranproteins Hmg2-myc über einen Zeitraum von 4 Stunden untersucht (Abb. 13C). Innerhalb dieser Zeit wird Hmg2-myc in der *cue1LL(179,180)SS*-Mutante teilweise stabilisiert. Die Stabilisierung des Hmg2-myc in einer *cue1*-Deletion ist jedoch wesentlich höher. Auch die *cue1ΔCUE*-Mutante hat in diesem Versuch einen verringerten Abbau des Hmg2-myc zur Folge, etwa in gleichem Maße wie die *cue1LL(179,180)SS*-Mutante. Im Gegensatz dazu zeigen die *cue1RGA*-Mutante und die *cue1ΔLAP*-Mutante nur einen, im Vergleich zu Zellen mit dem *CUE1*-Wildtyp, minimal verzögerten Hmg2-Abbau. Offenbar ist die Cue1-CUE-Domäne für einen effizienten Hmg2-myc-Abbau wichtig.

Als weiteres Substratprotein wurde eine Fusion aus Deg1 und einem zweifachen GFP-Epitop (green fluorescent protein) verwendet. Deg1 bezeichnet den N-terminalen, 67 Aminosäuren langen α -helikalen Bereich des Mat alpha Faktors, der als Erkennungssequenz sowie als initiales Abbausignal (Degron) dient und den Mat alpha Faktor der Ubiquitinierung an der Doa10-Ligase zuführt. Bei den *cue1*-Mutanten exprimierenden Hefezellen wurde nach Zugabe von Cycloheximid der Abbau von Deg1-GFP-GFP innerhalb von 60 min verfolgt und über Immunoblotting analysiert. Abbildung 13D belegt, dass sowohl chromosomal (end) als auch plasmidkodiertes (pl) WT-*CUE1* einen schnellen Deg1-GFP-GFP-Abbau fördern. Im Gegensatz dazu führt nicht nur die Deletion des *cue1* zu einer sehr starken Stabilisierung des Substratproteins, sondern auch die Punktmutante *cue1LL(179,180)SS*. Ein Einfluss der CUE-Domäne auf den Deg1-GFP-GFP-Abbau konnte in diesem Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden. In allen drei Mutanten, *cue1RGA*, *cue1 Δ LAP* und *cue1 Δ CUE*, wird das Substrat ähnlich gut abgebaut wie unter Wildtyp-Bedingungen. Obwohl Deg1-GFP-GFP ebenso ein Substrat der Doa10-Ligase ist wie Ubc6, verhält es sich in Bezug auf den Abbau verschieden. Der Effekt, den die CUE-Domäne auf die Substratubiquitinierung hat, ist daher kein generelles Phänomen von Doa10-Ligase-Substraten. Stattdessen kann eine Veränderung des Hrd1-abhängigen Hmg2-Abbaus durch Deletion der CUE-Domäne festgestellt werden. Wie auch Ubc6 ist Hmg2-myc ein in die ER-Membran integriertes Protein, und ein Teil des Hmg2 ragt wie der Ubc6-Aminoterminal ins Zytosol. Diese Gemeinsamkeiten lassen auf eine Gruppe von ER-membrangebundenen ERAD-Substratproteinen schließen, für deren ungehinderten Abbau die Cue1-CUE-Domäne erforderlich ist.

2.12 Die Ubiquitinmoleküle einer durch Ubc7 gebildeten Ubiquitinkette sind in einer K48-abhängigen Weise miteinander verknüpft

Ein bislang unbeachteter Aspekt ist die Möglichkeit, dass Cue1 den Verknüpfungstyp der von Ubc7 konjugierten Ubiquitinmoleküle beeinflusst. Wie in der Vergangenheit mehrfach beschrieben, ist der proteasomale Abbau von ERAD-Substraten von einer Lysin48-Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle abhängig [15,16,74]. In Zellen, in denen eine *K48R*-Ubiquitinmutante überexprimiert war, fand eine generelle Stabilisierung von Proteinen statt, die normalerweise über Hrd1 oder Doa10 ubiquitiniert werden. In den letzten Jahren gab es aber auch Hinweise auf eine Funktion von K63- oder K11-verknüpften Ubiquitinketten beim proteasomalen Abbau von Proteinen [19,75]. Kann

Ergebnisse

es dennoch sein, dass Cue1 bei der Ubiquitinierung bestimmter Substratproteine eine Modulation der Ubiquitinverknüpfung bewirkt?

Unterschiede in der Art der Verknüpfung der Polyubiquitinkette sind am ehesten durch *in vitro* Reaktionen aufzudecken, da hier verschiedene Ubiquitinmutanten auf ihre Fähigkeit der Kettenbildung an einem bestimmten E2-E3-Komplex getestet werden können. In einem Versuchsansatz wurde zunächst die Art der Ubiquitinverknüpfung in einer Reaktion von Ubc7 mit Hrd1 in Abwesenheit von Cue1 untersucht (Abb. 14A). Hierzu wurden neben WT- und epitopmarkiertem Ubiquitin auch Ubiquitinvarianten verwendet, bei denen ein bestimmtes Lysin durch Arginin ersetzt wurde (z.B. Ub K48R). Andere Ubiquitinvarianten wiesen nur noch ein einzelnes Lysin auf (z.B. Ub K48only; K48o). In dem α -Ubiquitin Immunoblot wird erneut deutlich, dass Ubc7 in Abwesenheit von Hrd1 oder dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym keine Ubiquitinketten mit dem Ubiquitin-Wildtyp formen kann. Nur in Anwesenheit dieser beiden Proteine verknüpft Ubc7 Wildtyp- und Flag-epitopmarkiertes Ubiquitin, so dass zumindest eine deutliche Bildung von Diubiquitin detektierbar wird. Aufgrund der kurzen Expositionszeit des Röntgenfilms zur Signaldetektion sind höhermolekulare Ubiquitinkonjugate nur schwer erkennbar. Im Gegensatz dazu fehlt die Diubiquitinbildung bei Verwendung der K11o-Variante nahezu vollständig und ist durch die K48R-Ubiquitinvariante deutlich reduziert. Dies weist einerseits darauf hin, dass das alleinige Vorhandensein des Lysins an Position 11 des Ubiquitins nicht ausreicht, um eine Ubiquitinkettenbildung zu erhalten. Andererseits scheint Lysin 48 für die Polyubiquitinierung durch Ubc7 und Hrd1 notwendig, da dessen Veränderung zu Arginin (R) die Kettenbildung stark einschränkt. Wie für das WT und epitopmarkierte Ubiquitin beschrieben, kann auch unter Verwendung der K63R-Ubiquitinvariante eine gute Diubiquitinierung detektiert werden. Das Lysin 63 spielt demnach bei der Ubiquitinverknüpfung keine oder nur eine untergeordnete Rolle. Auch die K48o-Variante des Ubiquitin ist zur Ubiquitinkettenbildung durch Ubc7 und Hrd1 geeignet. Hier können sogar in höhermolekularem Bereich Ubiquitinverknüpfungen nachgewiesen werden. Dies könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass etwas mehr freies Ubiquitin in die Reaktion eingebracht wurde als in den anderen Proben. Jedoch ist auch eine effektivere Polyubiquitinierung bei dieser, nur Lysin48-verknüpfbaren Ubiquitinvariante durchaus denkbar. Anscheinend ist die Anwesenheit dieses einzelnen Lysins an Position 48 genügend, um eine starke Ubiquitinkettenbildung durch Ubc7 und Hrd1 zu ermöglichen. Eine Ubiquitinvariante, die nur dieses eine erforderliche Ubiquitin aufweist, könnte daher eventuell besser und schneller verknüpft werden als zum Bei-

Ergebnisse

spiel Wildtyp-Ubiquitin. Somit kann festgehalten werden, dass für eine *in vitro* Polyubiquitinierungsreaktion von Ubc7 und Hrd1 das Lysin 48 im Ubiquitin sowohl notwendig als auch ausreichend ist und demzufolge alle derart produzierten Ubiquitinketten auf eine K48-Verknüpfung zurückgehen.

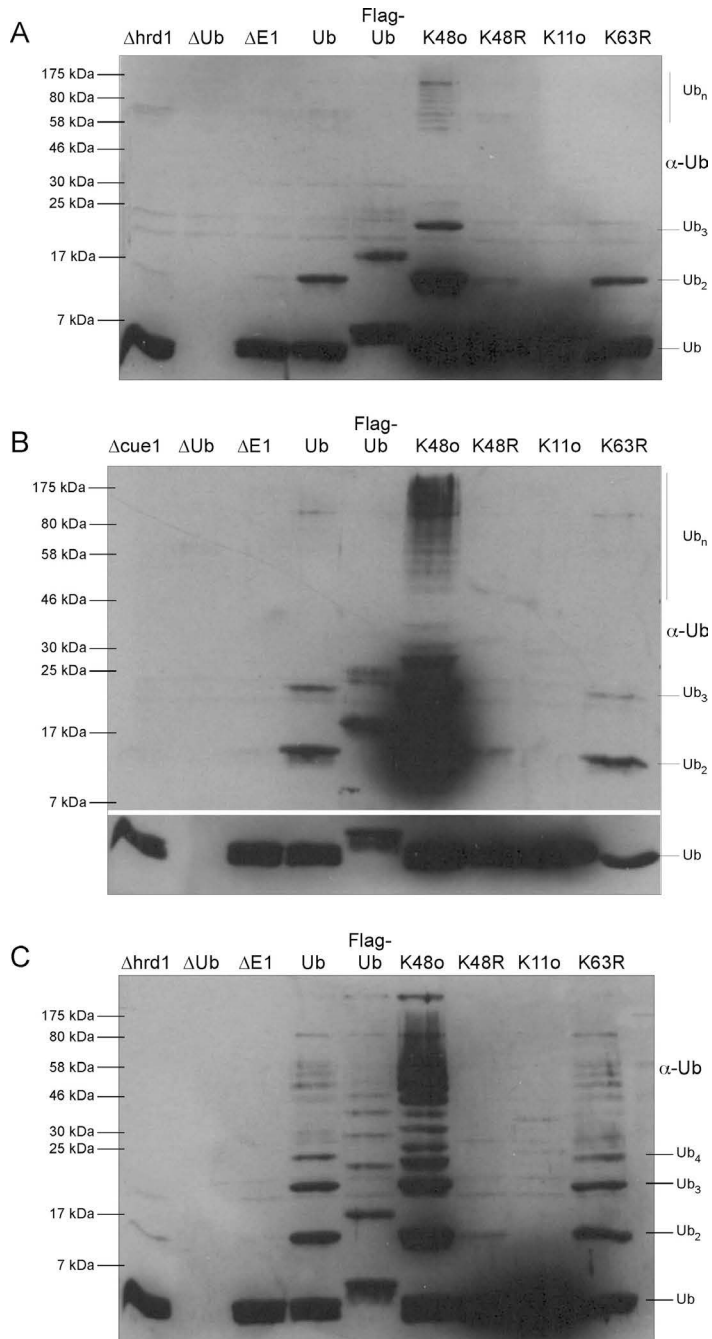


Abbildung 14: **Ubc7 formt Ubiquitinketten durch Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle an einem spezifischen Lysin.** *In vitro* Ubiquitinierungsreaktionen mit Ubc7 sowie Cue1 oder/und Hrd1 unter Verwendung unterschiedlicher Lysinmutanten des Ubiquitin. Inkubation der Ansätze für 20 min bei 30 °C. Analyse der Proben nach Erhitzen in DTT-haltigem Probenpuffer. A: Reaktion von Ubc7 mit Hrd1. B: Ubiquitinkettenbildung durch Interaktion von Ubc7 mit Cue1. C: Polyubiquitinierung durch das Zusammenspiel von Ubc7, Cue1 und Hrd1.

Wie bereits in Abbildung 5A dargestellt wurde, kann Ubc7 *in vitro*, auch in Abwesenheit einer Ligase, allein durch Wechselwirkung mit Cue1 Ubiquitinketten synthetisieren. Die Frage, ob Ubc7 als Heterodimer mit Cue1 eine von der K48-Verknüpfung abweichende Ubiquitinkonjugation erzeugt, kann aufgrund folgenden Experimentes verneint werden.

Analog zu dem vorherigen Versuchsaufbau wurden die in Abbildung 14B gezeigten Reaktionen nur mit Hilfe von Ubc7 und Cue1, in Abwesenheit von Hrd1 durchgeführt. Die Ergebnisse der Einzelreaktionen entsprechen im Wesentlichen den Resultaten der Polyubiquitinierung durch Ubc7 und Hrd1. Während für die K110- und die K48R-Ubiquitinvariante keine Kettenbildung erkennbar ist, weisen die Reaktionen mit WT-Ubiquitin, der Flag-epitopmarkierten Variante sowie der K48o und K63R-Variante nachweisbare Signale für eine Ubiquitinkonjugation (zwei bis 3 Ubiquitinmoleküle) auf. Wiederum ist die höchste Polyubiquitinierungsaktivität in der Reaktion mit der K48o-Ubiquitinvariante zu finden. Gemeinsam mit Cue1 synthetisiert Ubc7 also ebenso Lysin48-verknüpfte Ubiquitinketten wie bei dem Zusammenspiel mit Hrd1. Auch eine massenspektrometrische Analyse einer *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion mit Ubc7 und Cue1 ergab, dass etwa 98% der detektierten verzweigten Ubiquitin-Peptide durch eine kovalente Bindung des C-Terminus von Ubiquitin auf das Lysin an Position 48 eines weiteren Ubiquitinmoleküls zustande kamen. Verknüpfungen über K6 oder K11 wurden zu jeweils etwa 1% gemessen.

Dieses Bild bleibt bestehen, wenn alle drei Interaktionspartner gemeinsam in eine Ubiquitinierungsreaktion eingesetzt werden (Abb. 14C). Die stimulierende Wirkung von Cue1 und Hrd1 auf die Ubiquitinierungsaktivität von Ubc7 resultiert in vermehrt gebildeten höhermolekularen Ubiquitinketten, die in diesem Versuchsansatz deutlich besser zu detektieren sind als in den Reaktionen von Ubc7 mit Cue1 oder Hrd1 allein. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Art und Weise, wie die Ubiquitinmoleküle miteinander verknüpft werden. Das Lysin an Position 48 des Ubiquitin ist auch hier die bevorzugte bzw. nahezu einzige zur Konjugation der Ubiquitinmoleküle verwendete Aminosäure.

2.13 Versuche einer *in vitro* Substratubiquitinierung

Trotz dieses relativ eindeutigen Ergebnisses bleibt ein Aspekt ungeklärt. Die *in vivo*-Beobachtungen haben eine Notwendigkeit der Cue1CUE-Domäne für den Abbau einer bestimmten Subpopulation von Substratproteinen gezeigt. Könnte es daher

Ergebnisse

sein, dass die Interaktion eines speziellen Substrats mit der Ligase und dem ebenfalls daran gebundenen Ubc7-Cue1-Heterodimer den Komplex so verändert, dass Ubc7 zu Konjugation verschieden verknüpfter Ubiquitinketten angeregt wird? Zwar wurden Versuche unternommen, ein Substratprotein in die *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion einzubringen, jedoch blieben diese Proteine nach Inkubation mit den Reaktionspartnern unkonjugiert. Das heißt, es konnten keine Ubiquitinketten auf den Substraten nachgewiesen werden. Weder natives noch hitzedenaturiertes CPY, BSA oder RNaseA wurden in einer Reaktion mit Ubc7, Cue1 und Hrd1 modifiziert. Auch der lösliche Teil von Ubc6 oder aufgereinigtes Deg1-cNLS-GFP-GFP-His₆ wurden nicht durch Inkubation mit Ubc7, Cue1 und Doa10 ubiquitiniert. Es musste jedoch auch die Möglichkeit miteinbezogen werden, dass Ubc7 die Substrate nicht de novo ubiquitiniert, sondern nur auf bereits monoubiquitinierte Proteine kettenverlängernd wirkt.

Bei den eingangs beschriebenen *in vitro* Ubiquitinierungen, ohne Zugabe eines Substratproteins, ubiquitinierte Ubc7 lediglich ein anderes Ubiquitinmolekül, das entweder als Monomer oder aber als letztes Glied einer Ubiquitinkette vorlag. Theoretisch sollte Ubc7 also auch ein monoubiquitiniertes Protein polyubiquitiniieren können. Eine Fusion aus dem Doa10-abhängigen Substrat Deg1-cNLS-GFP-GFP-His₆ und einem Ubiquitin sollte den Beleg dafür liefern. In Abbildung 15 sind hierzu zwei *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen dargestellt.

Beide Reaktionen enthielten sowohl Ubc7, Cue1, Doa10 und freies Ubiquitin. Der ersten Reaktion wurde zusätzlich Deg1-cNLS-GFP-GFP-His₆ (pUL 063), der zweiten die Fusion Deg1-cNLS-GFP-Ub-His₆ (pUL 067) zugesetzt. Im Immunblot gegen das zugegebene Ubiquitin sind für beide Reaktionen neben Ubiquitin-Monomeren und – Dimeren auch Ubiquitinketten sichtbar. Leider scheint es sich hierbei erneut um „freie“ Ubiquitinketten zu handeln. Der Immunblot zum Nachweis des GFP-fusionierten Deg1-Substrats zeigt sowohl für die nicht-Ubiquitin-fusionierte Form als auch für die Ubiquitin-fusion keine Signale, die der Anheftung eines weiteren Ubiquitinmoleküls zugeordnet werden könnten. Das mit * gekennzeichnete, im Immunblot erkennbare Signal oberhalb des Deg1-Substrats ist nachweislich kein Resultat der *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion sondern wahrscheinlich ein Artefakt der heterologen Expression in *E. coli* bzw. der Proteinaufreinigung. Die Konzentration und die unterschiedliche Affinität des freien Ubiquitin und des Ubiquitin-Fusionsproteins zum E1 und E2 könnten die Ursache für eine fehlende Ubiquitinierung auf dem Deg1-

Ergebnisse

cNLS-GFP-GFP-Ub-His₆ sein. Möglicherweise ist die Affinität des relativ großen Deg1-Ubiquitin-Fusionsproteins zum Ligasekomplex deutlich geringer als die der freien Ubiquitinmoleküle. Dann müsste eine wesentlich höhere Menge des Fusionsproteins eingesetzt werden, um einen Effekt beobachten zu können.

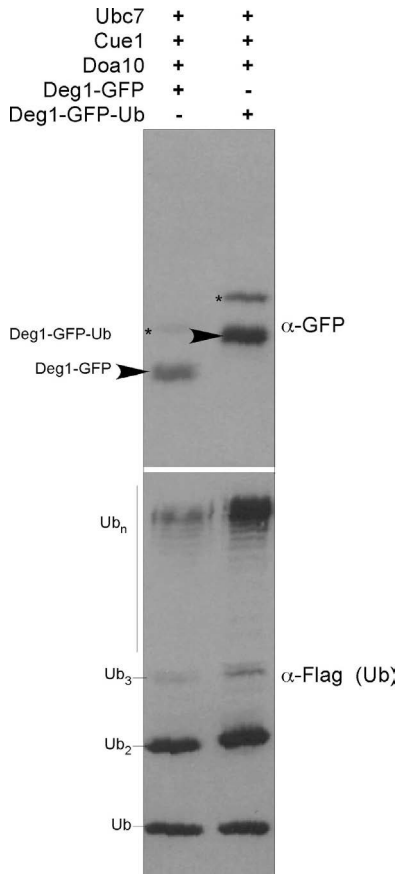


Abbildung 15: Ubiquitinierung von Deg1-cNLS-GFP-GFP-His₆ bzw. Deg1-cNLS-GFP-GFP-Ub-His₆ *in vitro*. Reaktion der aus *E. coli* aufgereinigten Deg1-Fusionen mit Ubc7, Cue1 und Doa10 sowie Flag-Ub. Inkubation der Proben für 15 min bei 30 °C. * zeigt die durch die Aufreinigung der Deg1-Fusionsproteine bedingten zusätzlichen Signale für die jeweiligen Proteine an.

Ein weiteres Hindernis könnte die generelle Bindung eines Substrats durch die Ubiquitinligasen darstellen. Wie bereits erklärt, wurden die Ligasen in *E. coli* ohne ihre jeweiligen Transmembranbereiche exprimiert. Wenn die Substratproteine nicht im Bereich des RING-Fingers mit der Ligase interagieren, werden sie als Folge dessen in einer *in vitro* Reaktion auch nicht ubiquitiniert. Eine andere Möglichkeit, den Ubiquitinierungsprozess am Doa10-Ligase-Komplex näher zu betrachten, bietet das Protein Ubc6. Dieses ist nicht nur ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym der Doa10-Ligase sondern gleichzeitig ein Substratprotein, welches in Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von Ubc6 und Ubc7 polyubiquitiniert und anschließend abgebaut wird.

Ergebnisse

Um jedoch die Ubiquitinierung von Ubc6, als Substrat, durch Ubc7, Cue1 und Doa10 untersuchen zu können, musste festgestellt werden, wie sich das Protein als Ubiquitin-konjugierendes Enzym an der Ligase verhält. Hierzu wurde zunächst eine *in vitro* Ubiquitinierung mit Doa10 und Ubc6 bzw. der katalytisch inaktiven Variante, C(87)S, von Ubc6 betrachtet (Abb. 16A). Wie erwartet, zeigen Doa10 und Ubc6C(87)S allein und in Kombination keinerlei Ubiquitinierungsaktivität. Eine Reaktion von aktivem Ubc6 mit Ubiquitin offenbart hingegen, dass durch E1 aktiviertes Ubiquitin mit Ubc6 wechselwirkt und auf Ubc6 kovalent verknüpft wird.

Wie im α -Ubc6-Immunblot erkennbar, erzeugt die Interaktion des Ubiquitin mit Ubc6 eine Konjugation eines einzelnen Ubiquitin auf Ubc6. Diese ist stabiler als eine Thioesterbindung, da eine Behandlung der Proben mit DTT-haltigem Probenpuffer keinen Verlust des Signals der Ubc6-Ubiquitinverbindung bedeutet. Auch im α -Flag-Immunblot ist das Signal für eine Ubc6-Ubiquitinverknüpfung deutlich nachweisbar. Die Zugabe von Doa10 ändert an dieser Reaktion anscheinend nichts. Es findet weder eine Synthese von freien oder konjugierten Ubiquitinketten statt, noch wird Doa10 mit Ubiquitin modifiziert.

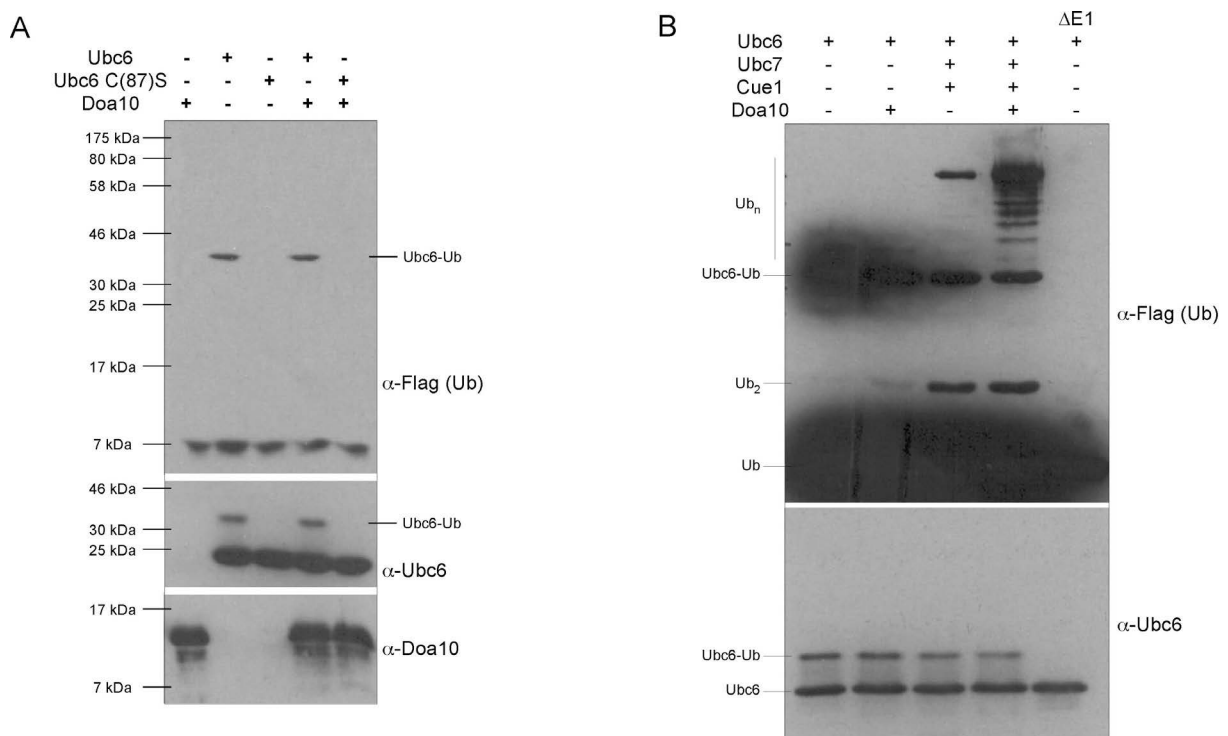


Abbildung 16: **Ubiquitinierungsaktivität des Ubc6 *in vitro* und dessen Verhalten als Substratprotein.** A: Ubiquitinierungsreaktion von Ubc6 oder dessen katalytisch inaktiver Variante C(87)S in Ab- und Anwesenheit von Doa10. Inkubation im Reaktionspuffer für 15 min. B: Ubiquitinierung in Reaktionen mit aktivem Ubc6 als E2-Enzym oder Substrat. 20 min Inkubation.

Anscheinend beeinflusst der Doa10-RING-Finger die Aktivität von Ubc6 in diesem Versuch in keiner Weise. Dies könnte erneut auf die fehlende Co-Lokalisierung beider Enzyme zurückzuführen sein. Ubc6 als Ubiquitin-konjugierendes Enzym sollte zwar mit dem RING-Finger der Ligase interagieren, jedoch ist Ubc6 in den Hefezellen durch seinen eigenen Transmembrananker in der ER-Membran und somit in räumlicher Nähe zu Doa10 lokalisiert. Diese Konzentration der beiden Proteine an einer Membran fehlt in der *in vitro* Reaktion. Somit kann weder eine Aussage über die Aktivität von Ubc6 mit Doa10 getroffen werden, noch kann Ubc6 als Substrat in einer Ubiquitinierungsreaktion mit Ubc7 und Cue1 an der Doa10-Ligase untersucht werden. Tatsächlich bleibt Ubc6 in einer Reaktion mit Cue1 und Ubc7 und auch nach zusätzlicher Zugabe von Doa10, wie im α -Ubc6-Immunblot der Abbildung 16B dargestellt, bis auf die Auto-Monoubiquitinierung unmodifiziert. Ein Immunblot gegen das eingesetzte epitopmarkierte Ubiquitin weist erneut die Ubc6-Ubiquitin-Verknüpfung auf sowie die freien Ubiquitinketten, die aus der Reaktion von Ubc7 mit Cue1 und Doa10 hervorgehen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass weder Deg1-GFP oder eine Ubiquitininfusion dieses Proteins, noch Ubc6 als Substrat zur Untersuchung der Ubiquitinierungsvorgänge an der Doa10-Ligase geeignet sind, vermutlich, da keine ausreichende Interaktion der Substrate mit dem Ligasekomplex erreicht wird. Aus diesem Grund kann nicht geklärt werden, ob die Cue1-CUE-Domäne *in vivo* eine funktionelle Bedeutung bei der Ubiquitinierung und dem Abbau spezieller Substratproteine hat.

2.14 Ubc6 verknüpft Ubiquitinmoleküle über das Lysin an Position 11

Eine Frage, die sich aus den eben gezeigten Experimenten ergibt, zielt auf die Interaktion des Cue1-Ubc7-Heterodimers mit der Ligase und Ubc6. Wenn Cue1 und Ubc7 in Wechselwirkung mit den ERAD-Ligasen effektiv und ausreichend lange Polyubiquitinketten produzieren können, wieso ist für den Doa10-abhängigen Abbau von Substratproteinen auch Ubc6 unbedingt erforderlich? Es wurde beobachtet, dass die Ubiquitinketten, die Cue1 und Ubc7 zusammen mit Doa10 bilden, kürzer sind als die Ubiquitinketten, die durch Hrd1 geformt werden. Ein bereits angeführter Grund könnte die verschiedene Länge der Ligasekonstrukte sein. Es wäre aber auch möglich, dass Ubc6 an der Doa10-Ligase benötigt wird, um die Ketten weiter zu verlängern, obwohl die durch Ubc7 gebildeten Ubiquitinketten eigentlich schon ein hochmolekulares Niveau erreichen. Welche Funktion also hat Ubc6 an der Doa10-Ligase?

Ergebnisse

Wie in den Abbildungen 16A und 16B gezeigt, konjugiert Ubc6 *in vitro* nur ein Ubiquitinmolekül auf sich selbst. Bei sehr langen Inkubationszeiten der Reaktionen mit Ubc6 und entsprechend langer Exposition eines Röntgenfilms auf dem Immunblot werden aber auch Diubiquitinverbindungen auf Ubc6 erkennbar (Abb. 17). Dass Ubc6 die Ubiquitinmoleküle auf sich selbst konjugiert, könnte am Fehlen eines adäquaten Substratproteins liegen. Jedoch konnte auch eine Bildung von freien Ubiquitinketten nach der verlängerten Inkubationszeit nachgewiesen werden. Die Annahme einer multiplen Monoubiquitinierung bestätigte sich nicht, da unter Verwendung verschiedener Ubiquitinvarianten in einigen Reaktionen keine Signale für eine Mehrfachubiquitinierung festzustellen sind. Bei einer multiplen Monoubiquitinierung, bei der keine Ubiquitinketten gebildet werden, hätten Mutationen der Lysine in Ubiquitin keinen Effekt.

Die Abbildung 17 zeigt eine Ubc6-abhängige Bildung von Oligoubiquitin sowohl für Wildtyp-Ubiquitin als auch für die K48R und K11o-Variante, während bei Verwendung des K48o-Ubiquitins keine Konjugation von Ubiquitinmolekülen detektierbar ist. Offensichtlich synthetisiert Ubc6 keine K48-verknüpften Ubiquitinketten. Es ist aber in der Lage Ubiquitinmoleküle aufeinander zu konjugieren, bei denen nur das Lysin an Position 11 vorhanden ist. Es ist also wahrscheinlich, dass Ubc6 Ubiquitinmoleküle in einer Lysin11-abhängigen Weise miteinander verbindet. Verknüpfungen über weitere Lysinreste sind jedoch nicht vollständig auszuschließen, da die hierfür notwendigen Ubiquitinvarianten nicht getestet wurden. Die Ubc6-abhängige Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle über Lys11 steht im Gegensatz zu der für Ubc7, Cue1 und Hrd1 gezeigten Aktivität, durch die ausschließlich K48-verknüpfte Ubiquitinketten synthetisiert werden. Es ist denkbar, dass Ubc6 *in vivo* durch eine Interaktion mit der Doa10-Ligase, welche *in vitro* nicht erreicht wurde, in seiner Aktivität ebenso stimuliert wird wie Ubc7 durch die Wechselwirkung mit den Ligasen. Ungewiss bleibt jedoch, ob die gebildeten Ubiquitinketten *in vivo* tatsächlich auf ein Substratprotein übertragen werden oder ob K11-verknüpfte Ubiquitinketten am Doa10-Ligasekomplex einen anderen Zweck erfüllen. Dies könnte nur durch die massenspektrometrische Analyse eines aus Zellen aufgereinigten Substratproteins geklärt werden.

Ubc6 und Ubc7, die Ubiquitin-konjugierende Enzyme der Doa10-Ligase, unterscheiden sich in ihrer Aktivität und der Art der durch das jeweilige E2 gebildeten Ubiquitinketten. Es bleibt die Frage, aus welchem Grund die Aktivität beider E2-Enzyme für den Substratabbau erforderlich ist. In zahlreichen Veröffentlichungen wurde bereits

Ergebnisse

beschrieben, dass K48-polyubiquitinierte Substratproteine bevorzugt durch das 26S Proteasom abgebaut werden. Daher müsste die Ubiquitinierung von Proteinen durch Ubc7 für deren Abbau genügen. Welche Rolle spielt also Ubc6 bei der Ubiquitinierungsreaktion und welchen Zweck erfüllen konjugierte K11-verknüpfte Ubiquitinketten? Wäre es möglich, dass Ubc6 und Ubc7 am Doa10-Ligasekomplex gemischte Ubiquitinketten synthetisieren? Eine derartige Reaktion war in den *in vitro* Ansätzen nicht erkennbar (Abb. 16B). Die könnte aber mit der mangelnden Interaktion von Ubc6 mit der Ligase erklärt werden.

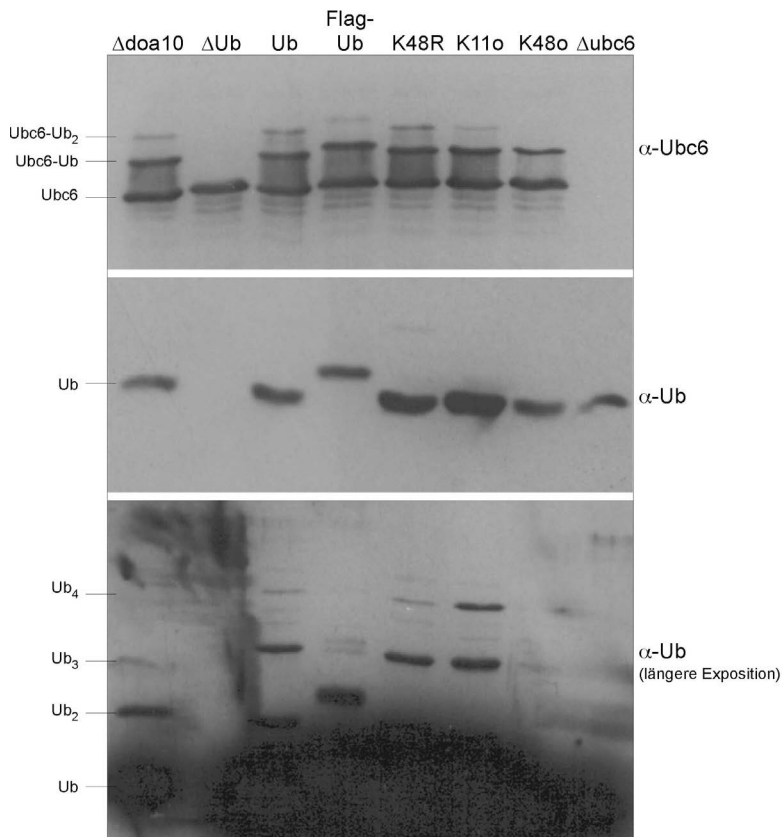


Abbildung 17: Ubiquitinverknüpfung durch Ubc6 *in vitro*. Inkubation von Ubc6 mit den angezeigten Ubiquitin-Varianten für 40 min. Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE und Immunoblotting in DTT-haltigem Probenpuffer.

Alternativ könnten beide Enzyme nacheinander auf das Substrat wirken. Die *in vitro* Reaktionen mit Ubc7 zeigten, dass dieses E2 sehr effektiv freies Ubiquitin für die Synthese einer Ubiquitinkette verwenden kann. Eine Schlussfolgerung daraus war eine eventuell kettenverlängernde Aktivität des Ubc7. Die initiale Monoubiquitinierung eines Doa10-Ligase-Substrats könnte demnach von Ubc6 durchgeführt werden. Dagegen spricht das alleinige Wirken von Ubc7 am Hrd1-Ligase-Komplex, bei dem kein zweites Ubc-Enzym für den Proteinabbau benötigt wird.

2.15 Ubc6 und Ubc7 binden unabhängig voneinander an Doa10

Falls Ubc6 und Ubc7 gleichzeitig an Doa10 wirken würden, müsste für beide Enzyme eine separate Bindungsstelle an Doa10 vorhanden sein. Bei einer sequenziellen Aktivität der E2s genügt eine Bindestelle an der Ligase für einen Ubiquitinierungsvorgang. In letzterem Fall könnte eine Überexpression des einen Enzyms zu einer Verdrängung des jeweils anderen Enzyms führen. Um diese Idee zu testen, wurden in einem Hefestamm mit myc-epitoparkiertem Doa10 entweder *UBC6* (pTX008, pJU285) oder *CUE1/UBC7* (pJU267, pJU379) oder alle drei Gene (pJU220, pJU287) von einem 2 μ -Plasmid überexprimiert. Die linke Hälfte der Abbildung 18A zeigt die Menge der entsprechenden synthetisierten Proteine, die aus solubilisierten Membranen gewonnen wurde. Die Menge von Ubc6 ist sowohl in einem Δ *ubc7*-Stammaufgrund des verminderten Ubc6-Abbaus, erhöht als auch in den Stämmen, in denen *UBC6* vom Plasmid überexprimiert wird. Auch die Überexpression von *UBC7* ist erkennbar, wenn auch schwächer als die *UBC6* Überexpression. Eine Erhöhung der Ubc7-Menge ist nur durch die gleichzeitige vermehrte Synthese des stabilisierenden Co-Faktors Cue1 möglich, weshalb *CUE1* stets mit *UBC7* co-exprimiert wurde. Die Doa10-, Ubx2- und Cdc48-Mengen scheinen in allen Stämmen nahezu gleich. Bei der in der rechten Hälfte der Abbildung dargestellte Immunpräzipitation von 13x-myc-epitopmarkiertem Doa10 in den angezeigten Überexpressionstämmen offenbart sich eine unerwartete Co-Präzipitation der ligaseassoziierten Proteine. In den Hefestämmen mit *UBC6*-Überexpression, auch bei zusätzlicher Überexpression von *UBC7/CUE1*, interagiert mehr Ubc6 mit der Ligase als in einem Wildtyp-Stamm. Eine Deletion von *ubc7* führt ebenso zu einer verstärkten Wechselwirkung von Ubc6 mit Doa10. Dies kann einerseits an der Stabilisierung von Ubc6 liegen, welche zu einer generell höheren Ubc6-Menge an der ER-Membran führt, es könnte aber auch die fehlende Konkurrenz mit Ubc7 sein, die eine stärkere Bindung von Ubc6 an die Ligase fördert. Die nach Überexpression von *UBC7/CUE1* detektierbare Interaktion des Ubc7 mit Doa10 ist schwer zu interpretieren. Sowohl in Wildtyp-Zellen, in transformierten Zellen mit leerem Überexpressionsplasmid (Vektor) als auch in einem *ubc6*-Deletionsstamm sind etwa vergleichbare Mengen von Ubc7 an der Ligase. Erstaunlicherweise führt auch eine Überexpression von *UBC6* nicht zu einer schwächeren Ubc7-Bindung, was gegen eine gegenseitige Verdrängung der beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme spricht. Darüber hinaus führt anscheinend die Überexpression von *UBC7/CUE1* selbst, in An- oder Abwesenheit von überexprimiertem *UBC6*,

Ergebnisse

zu einer Reduktion der Ubc7-Mengen an der Doa10-Ligase. Dies erscheint wenig logisch und kann auch in diesem Zusammenhang nicht erklärt werden.

Während die Mengen des Cdc48-rekrutierenden Proteins Ubx2 unter den verschiedenen Bedingungen an der Ligase nur wenig differieren, sind bei der Lokalisierung von Cdc48 selbst deutliche Unterschiede zu erkennen. In Wildtyp-Zellen, nach Transformation der Hefen mit dem Leervektor und bei Überexpression von *UBC6*, und *UBC7/CUE1* zusammen sind vergleichbare Mengen Cdc48 am Ligasekomplex detektierbar, was auf eine ähnliche Ubiquitinierungsaktivität in diesen Hefestämmen hindeutet. Im *ubc7* Deletionsstamm hingegen ist kein Cdc48 mehr an Doa10 detektierbar. Anscheinend führt bereits der Verlust der Lysin48-abhängigen Substratubiquitinierung durch Ubc7 zur Inhibierung der Cdc48-Rekrutierung. Ganz anders verhält sich Cdc48 in einem $\Delta ubc6$ -Stamm. Offenbar begünstigt die Deletion von *ubc6* gar die Rekrutierung des Cdc48 an die Ligase. Dies zeigt deutlich, dass nur die Aktivität von Ubc7, nicht aber die des Ubc6 für eine Cdc48-Lokalisierung an Doa10 und somit für das Herauslösen der Substratproteine aus dem Membran-gebundenen Komplex erforderlich ist.

Erstaunlicherweise hat die Überexpression von *UBC6* den gleichen Effekt auf Cdc48, wahrscheinlich aus dem Grund, dass, wie gezeigt, bei *UBC6*-Überexpression auch mehr Ubc7 mit der Ligase wechselwirkt. Jedoch auch eine mehrfach verstärkte Expression von *UBC7/CUE1*, die zu einer Reduktion der Ubc7-Mengen an der Ligase führt, zeigt im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle leicht erhöhte Cdc48-Mengen an der Ligase. Eine sinnvolle Interpretation des Resultats ist an dieser Stelle nicht möglich. Es scheint als würde sowohl die Deletion von *ubc6* und *ubc7* als auch die Überexpression der beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme ein Ungleichgewicht in der Zusammensetzung der Ligase hervorrufen, welches aber weder auf eine Konkurrenz der E2s schließen lässt, noch eine erklärbare Abhängigkeit der Proteinverhältnisse aufzeigt. Teilweise sind die Resultate auch deshalb schwer zu interpretieren, weil Ubc6 als Teil des Ligasekomplexes selbst durch die Ubc7-Aktivität ubiquitiniert und somit für den Abbau markiert wird. Eine Inhibition der katalytischen Aktivität der Ligase, die auch den Ubc6-Abbau blockiert, könnte daher deutliche Resultate liefern.

Ergebnisse

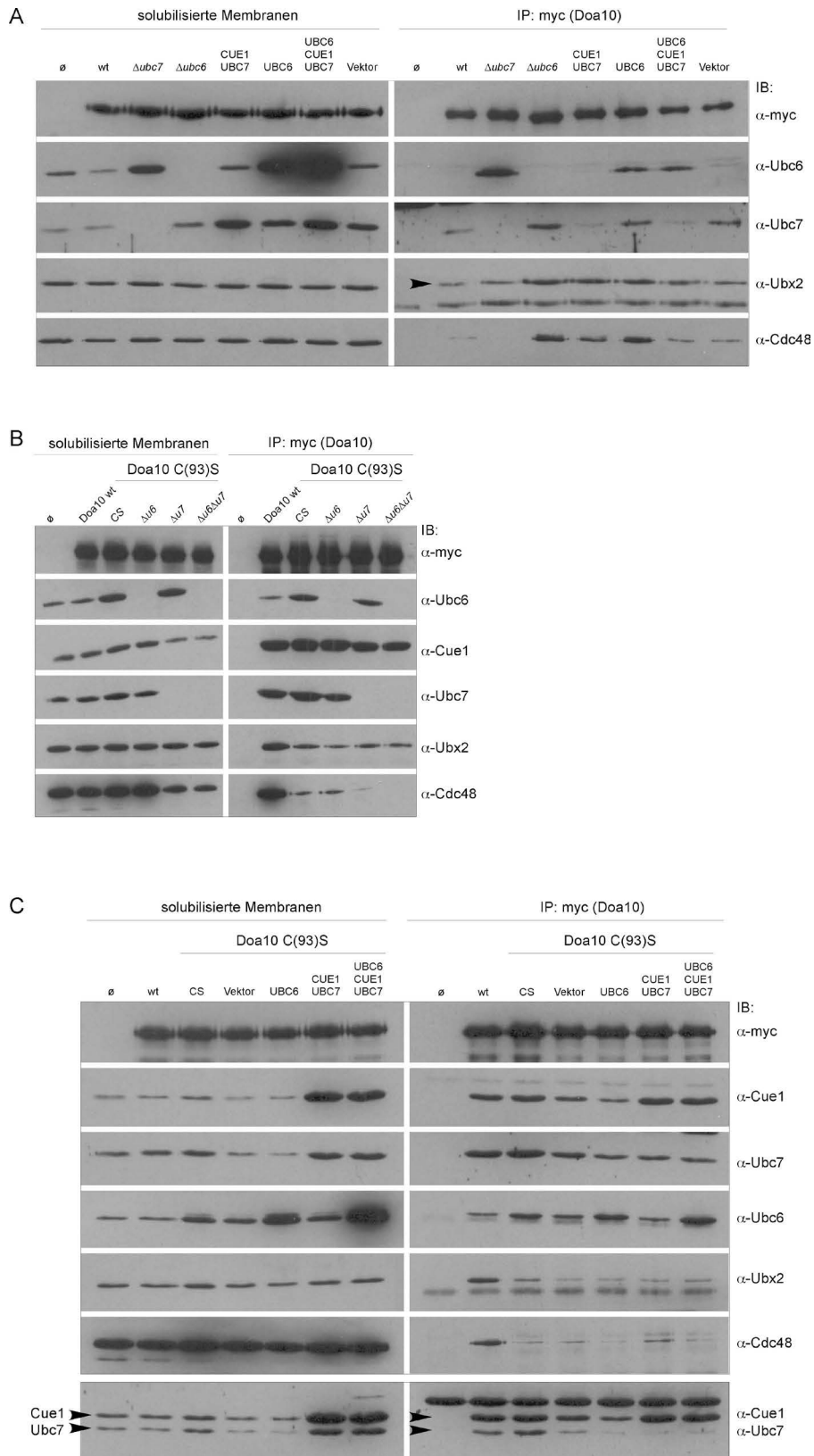


Abbildung 18: **Bindung von Ubc6 oder Ubc7 an Doa10 bei gleichzeitiger Deletion oder Überexpression des jeweils anderen E2.** Immunpräzipitation von N-terminal 13xmyc-epitopmarkiertem Doa10 oder dessen katalytisch inaktiver Variante C(93)S aus Digitonin-solubilierten Membranen äquivalenter Hefezellmengen. A,C: Überexpression von Ubc6 oder/und Cue1/Ubc7 von einem 2 μ -Plasmid. C (unterer Ausschnitt): Cue1 und Ubc7 verhalten sich in Bezug auf die Ligasebindung verschieden.

Ergebnisse

In früheren Versuchen wurde festgestellt, dass die Punktmutation C(93)S im Doa10-RING-Finger zwar die Ubiquitinierungsaktivität am Ligasekomplex unterbindet, die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme aber trotzdem mit der Ligase wechselwirken. In den abgebildeten Immunpräzipitationsexperimenten (Abb. 18B, C) wurde erneut jeweils Doa10 bzw. dessen katalytisch inaktive Mutante mit Hilfe des myc-Epitops gefällt.

Der in Abbildung 18B dargestellte Versuch zeigt das Verhalten der E2s in verschiedenen Deletionsstämmen. Der Nachweis der ligaseassoziierten Proteine aus den solubilisierten Membranen vor der Immunpräzipitation lässt bereits erkennen, dass Ubc6 in der *doa10C(93)S*-Mutante (CS) im Vergleich zum Wildtyp an der Membran stabilisiert ist. Eine zusätzliche Deletion von *ubc7* ruft keine weitere Stabilisierung des Ubc6 hervor. Die Cue1-Mengen an der Membran sind in den Stämmen, in denen *ubc7* deletiert wurde, leicht reduziert. Anscheinend spielt die Anwesenheit von Ubc7 auch eine geringe Rolle für die Stabilität des Co-Faktors. Die Mengen von Ubx2 sind wiederum unverändert, während das Vorhandensein von Cdc48 in den *ubc7*-Deletionsstämmen, verglichen mit der dem WT und der *doa10C(93)S*-Mutante verringert ist. Dies lässt sich durch die Reduktion des Cdc48 am Hrd-Ligase-Komplex erklären, dessen Ubiquitinierungsaktivität zwar nicht durch die Mutation in *doa10*, wohl aber durch die Deletion des *ubc7* beeinflusst ist.

Die Interaktion von Cdc48 mit der Doa10-Ligase, durch die Immunpräzipitation von myc-Doa10 sichtbar gemacht, ist im *DOA10*-Wildtyp-Stamm am stärksten, da nur hier eine effektive Ubiquitinierung der Substrate stattfindet. Katalytische Inaktivierung der Ligase wie in der *doa10C(93)S*-Mutante resultiert in einer verminderten Rekrutierung von Cdc48 an den Ligase-Komplex. Die zusätzliche Deletion von *ubc6* hat, wie bereits im vorherigen Versuch geschildert, keine Auswirkungen auf diesen Zustand. *doa10C(93)S*-Mutanten in denen *ubc7* deletiert wurde, weisen nahezu kein Cdc48 mehr an der Ligase auf, und in $\Delta ubc6/\Delta ubc7$ -Doppelmutanten ist die Cdc48-Bindung an die Ligase nicht detektierbar. Eine *in vitro* nachgewiesene, „autonome“ Ubiquitinierungsaktivität des Ubc7 mit Cue1 könnte der Grund für die partielle Rekrutierung von Cdc48 an den Ligasekomplex in der *doa10C(93)S*-Mutante sein. Die räumliche Nähe eines an Doa10 gebundenen Substrats zu Ubc7 würde somit für eine sehr geringe K48-abhängige Ubiquitinierung und Cdc48-Rekrutierung ausreichen.

Ubc7 bindet an Wildtyp-Doa10 und die Doa10-C(93)S-Variante in vergleichbarer Stärke. Auch die Deletion von *ubc6* hat keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten

von Ubc7. Umgekehrt ist die Interaktion des Ubc6 mit Doa10 in der *doa10C(93)S*-Mutante aufgrund der Ubc6-Stabilisierung in diesem Stamm stärker als unter Wildtyp-Bedingungen. Eine gleichzeitige Deletion von *ubc7* in der *doa10C(93)S*-Mutante beeinflusst die Ubc6-Bindung nicht zusätzlich. Die Konkurrenz der beiden E2s um eine Bindungsstelle konnte daher nicht gezeigt werden. Beide Ubiquitin-konjugierenden Enzyme binden folglich unabhängig voneinander und über separate Bindestellen an den Ligasekomplex.

Ähnlich sieht es auch bei der Überexpression von *UBC6* oder *UBC7/CUE1* in *doa10C(93)S*-Zellen aus (Abb. 18C). In den Stämmen, in denen *UBC6* überexprimiert ist und mehr Ubc6 an der ER-Membran vorliegt (linke Seite der Abbildung), interagiert auch mehr Ubc6 mit der Doa10C(93)S-Variante (rechte Seite der Abbildung), unabhängig davon, ob Ubc7 und Cue1 ebenfalls verstärkt synthetisiert wird oder nicht. Die Überexpression von *UBC7/CUE1* führt an der Ligase nur zu einer leicht erhöhten Bindung von Cue1, während die Ubc7-Mengen an Doa10C(93)S im Vergleich zu Zellen mit normaler Cue1 und Ubc7-Synthese (Vektor-Probe) stabil bleiben. Auch die Überexpression von *UBC6* ändert nichts am Interaktionsverhalten von Ubc7 und Cue1 mit der Ligase, was die voneinander unabhängige Bindung der beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzyme nochmals bestätigt. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass Ubc6 und Ubc7 gleichzeitig auf die Substratubiquitinierung an der Doa10-Ligase wirken und nicht nacheinander.

2.16 Ubc6 und Ubc7 sind an der Synthese der substratkonjugierten Ubiquitinketten beteiligt

Doch welchen Beitrag leistet jedes der Enzyme jeweils an der Ubiquitinierung? Wenn man davon ausgeht, dass Lysin48-verknüpfte Ubiquitinketten die Schlüsselrolle bei der Erkennung des Substratproteins am Proteasom spielen, sollte das Substrat durch Ubc7 quantitativ stärker mit Ubiquitin modifiziert werden als durch Ubc6. Um diese Überlegung zu prüfen, wurden *rpt4R*-Hefezellen verschiedener Deletionsstämmen mit dem Doa10-abhängigen ERAD-Substratprotein Deg1- β Gal, einer Fusion aus Deg1 und β -Galaktosidase, transformiert. Wie in Abbildung 19 dargestellt, ist die Synthese des Fusionsproteins im Gesamtzellextrakt, (Lysat, α - β Gal-Immunblot), trotz Inhibierung des proteasomalen Abbaus in den *rpt4R*-Mutanten, relativ schwach. In den Stämmen mit einer Deletion von *ubc6* und *ubc7* oder einer Deletion von *doa10* sind deutlichere Signale für Deg1- β Gal sichtbar, die auf eine unerwartete zusätzliche Stabilisierung von Deg1- β Gal in den *rpt4R*-Zellen zurückzuführen sind. Dies wider-

Ergebnisse

spricht jedoch auch den Befunden, dass bereits die Einzeldelationen von *ubc6* oder *ubc7* zum nahezu vollständigen Verlust des Substratabbaus führen.

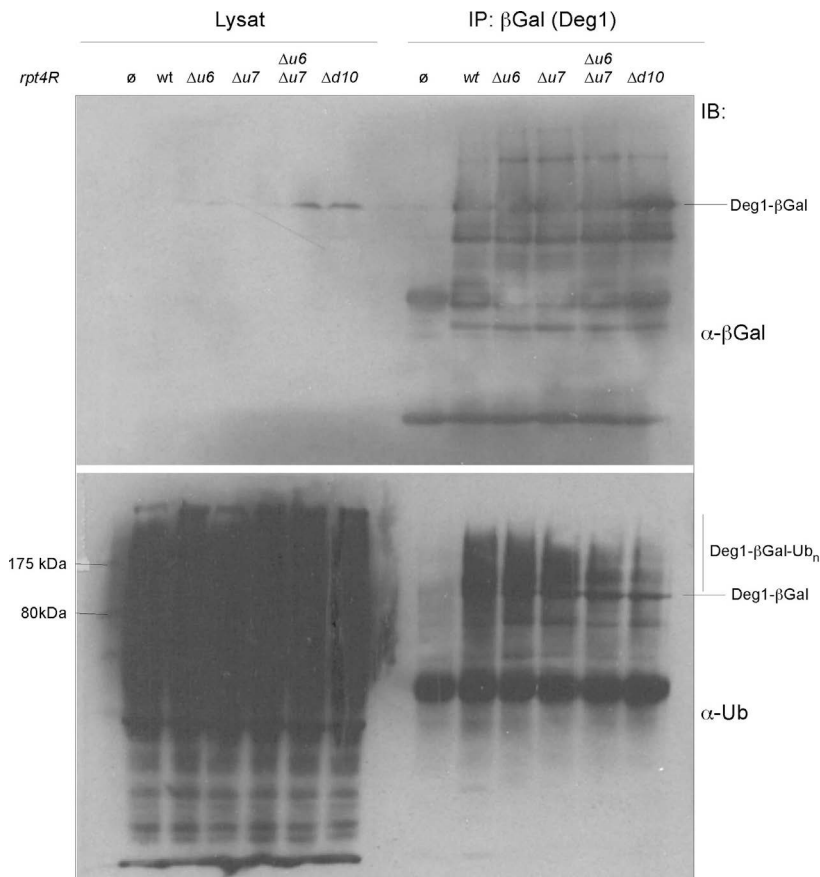


Abbildung 19: Ubiquitinierung auf Deg1-βGal in vivo. Proteasomale *rpt4R*-Mutanten wurden mit einem für Deg1-βGal codierenden Plasmid transformiert. Aufschluss logarithmisch wachsender Zellen und Immunpräzipitation des epitopmarkierten Deg1 durch einen β-Galaktosidase- Antikörper. Analyse der Proben mittels Immunoblotting.

Die Menge an freiem und auf Proteinen konjugiertem Ubiquitin ist im Zellysat sehr hoch. Da der Ubiquitinierungsprozess an der Doa10-Ligase nur einen Bruchteil des Umsatzes von Ubiquitin in der gesamten Zelle ausmacht, sind für die verschiedenen Deletionsstämme im α-Ub-Immunblot keine Unterschiede in der Menge der Ubiquitinkonjugate im Gesamtzellextrakt erkennbar. Die Aufreinigung des Deg1-βGal-Fusionsproteins aus dem Hefelysat, mittels eines anti-βGal-Antikörpers, erlaubte die Untersuchung der Ubiquitinierung eben dieses Substrats (rechte Hälfte der Abbildung). Die Signale für die Deg1-Fusion sind auch nach dessen Aufkonzentrierung durch die Immunpräzipitation im α-βGal-Immunblot schlecht detektierbar. Eine Aussage über Deg1-βGal-Ubiquitinkonjugate kann bei dieser Darstellung daher nicht getroffen werden. Der Nachweis von Ubiquitin im präzipitierten Material liefert besser auswertbare Resultate. Neben der diffusen Schwärzung des Röntgenfilms, die aus

einer Detektion einzelner unterschiedlich stark ubiquitinerter Proteine hervorgeht, ist auch Deg1- β Gal selbst erkennbar. Da eine derart starke Monoubiquitinierung des Fusionsproteins nicht zu erwarten ist, resultiert dieses Signal wahrscheinlich aus einer Kreuzreaktion der hier verwendeten Antikörper, wobei das nicht-modifizierte Deg1- β Gal sichtbar gemacht wird. Die Ubiquitinsignale im höhermolekularen Bereich müssten demzufolge ubiquitinierte Formen des Substratproteins repräsentieren.

Am stärksten ubiquitiniert ist Deg1- β Gal im Wildtyp-Hefestamm. Die Deletion von *ubc6* führt, wenn überhaupt, nur zu einer sehr geringen Abnahme der Ubiquitinierung. Auch in einem *ubc7*-Deletionsstamm ist eine hohe Menge an ubiquitiniertem Deg1- β Gal detektierbar, wenn auch geringfügig weniger als im *ubc6*-Deletionsstamm. Erst die Abwesenheit beider Ubc-Enzyme oder der Doa10-Ligase resultiert in einer deutlichen Reduktion von ubiquitiniertem Deg1- β Gal. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass Ubc6 und Ubc7 beide an der Substratubiquitinierung beteiligt sind, auch wenn Ubc7 wahrscheinlich einen etwas größeren Anteil der auf dem Substrat konjugierten Ubiquitinketten synthetisiert.

Dieser Versuch zeigt darüber hinaus, dass Ubc6 oder Ubc7 in Abwesenheit des jeweils anderen E2 in der Lage sind Polyubiquitinketten zu bilden. Diese Schlussfolgerung ist im Einklang mit den Ergebnissen der *in vitro* Experimente, in denen Ubc7 ohne Zugabe von Ubc6 Ubiquitinketten synthetisieren kann, und auch Ubc6 allein Ubiquitinmoleküle miteinander verknüpft (Abb. 5 und 17). Des Weiteren war es nicht möglich durch Immunpräzipitation eines der beiden Ubc-Enzyme das jeweils andere Ubc in adäquaten Mengen mit zu fällen (ohne Abbildung). Eine Wechselwirkung von Ubc6 und Ubc7 findet also allem Anschein nach nicht direkt, sondern lediglich über deren Bindung an Doa10 statt. Eine vielfach vermutete nötige Heterodimerisierung von Ubc6 und Ubc7, bzw. die für die effektive Ubiquitinierung erforderliche Bildung eines Trimers aus Ubc6, Cue1 und Ubc7 wird dadurch unwahrscheinlich.

2.17 Der Abbau von Ubc6 erfordert K27-verknüpfte Ubiquitinketten

Fasst man die bisherigen Erkenntnisse über die Ubiquitinierungsvorgänge an der Doa10-Ligase zusammen, so müsste man postulieren, dass Doa10-abhängig ubiquitinierte Substratproteine durch die Aktivität von Ubc7 sowohl mit Lysin48-verknüpften als auch, durch die Ubc6-Aktivität, mit Lysin11-verknüpften Ubiquitinketten versehen sind. Folglich sollte nicht nur die Überexpression einer Ubiquitin-*K48R*-Mutante in den Hefezellen zu einer Stabilisierung von Substratproteinen führen. Auch

Ergebnisse

die Überexpression einer *K11R*-Mutante sollte einen stabilisierenden Effekt zeigen. Um diese Hypothese zu testen, wurden Wildtyp-Hefezellen mit Plasmiden transformiert, die für *WT*-Ubiquitin sowie für verschiedene Ubiquitinmutanten kodieren und für deren Überexpression sorgen. Zunächst sollte der Abbau von Ubc6 und CPY* in diesen Zellen untersucht werden. Da für den Abbau von CPY* an der Hrd1-Ligase nur Ubc7 notwendig ist und somit wahrscheinlich nur Lysin48-verknüpfte Ubiquitinketten auf CPY* geformt werden, sollte die Überexpression einer *K48R*-Ubiquitinmutante dieses Substrat stabilisieren. Der Abbau von CPY* wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden nach Inhibierung der Proteinbiosynthese, durch Behandlung der Zellen mit Cycloheximid, verfolgt. Die Ergebnisse sind in der mittleren Spalte der Abbildung 20A dargestellt. Die in der rechten Spalte der Abbildung gezeigten Signale für das stabile Sec61-Protein stammen von demselben SDS-Gel wie die Signale für CPY* und dienen der Ladekontrolle. Wie erwartet, wird CPY* in Zellen mit Kupfersulfat- (CuSO_4) induzierter *WT*-Ubiquitin-Überexpression innerhalb der ersten 80 Minuten abgebaut. Dies trifft ebenfalls für die induzierte Überexpression der Ubiquitinmutanten *K6R*, *K11R*, *K27R* und *K63R* zu. Ebenfalls erwartungsgemäß stabilisiert die mehrfach verstärkte Expression der Ubiquitin-*K48R*-Mutante, so dass auch nach Ablauf der 120 min Beobachtungszeitraum noch eine größere Menge des CPY* nachgewiesen werden kann. Überexpression der *K48R*-Ubiquitinmutante verringert deutlich die Ubc7-abhängige Bildung von K48-verknüpften Ubiquitinketten auf dem Substratprotein, weshalb dieses nicht mehr der Degradation am 26S Proteasom zugeführt wird. Die Untersuchungen zum Abbau von Ubc6 liefern erstaunliche Resultate. Die Signale für dieses Substrat, die ebenfalls demselben SDS-Gel entstammen wie solche der beiden anderen Proteine CPY* und Sec61, zeigen einen deutlichen Abbau des Ubc6 nach Überexpression des *WT*-Ubiquitins oder der Ubiquitinmutanten *K6R*, *K11* oder *K63R*. Dies bedeutet, dass weder das Lysin an Position 6, noch jenes an Position 11 oder 63 des Ubiquitin für einen Ubc6-Abbau benötigt werden. Im Gegensatz dazu, führt nicht nur die Überexpression der *K48R*-Mutante sondern auch die der *K27R*-Ubiquitin-Mutante zu einer sehr starken Ubc6-Stabilisierung.

Es scheint, als wäre die in den *in vitro* Versuchen nachgewiesene Konjugation von K11-verknüpften Ubiquitinmolekülen auf Ubc6 in einer *in vivo* Situation für dessen Abbau verzichtbar. Stattdessen ist neben der erwarteten Abhängigkeit des Ubc6-Abbaus von den durch Ubc7 geformten K48-verknüpften Ubiquitinketten ebenfalls eine Abhängigkeit von der Synthese K27-verknüpfter Ubiquitinmoleküle nachweisbar. Die unterschiedlichen Anforderungen für den Abbau verschiedener ERAD-Substrate

Ergebnisse

werden auch im folgenden Versuch deutlich. An Stelle der *R*-Ubiquitinmutanten wurden Hefezellen nun mit Ubiquitinmutanten transformiert, die jeweils nur noch ein intaktes Lysin aufweisen (*Konly*).

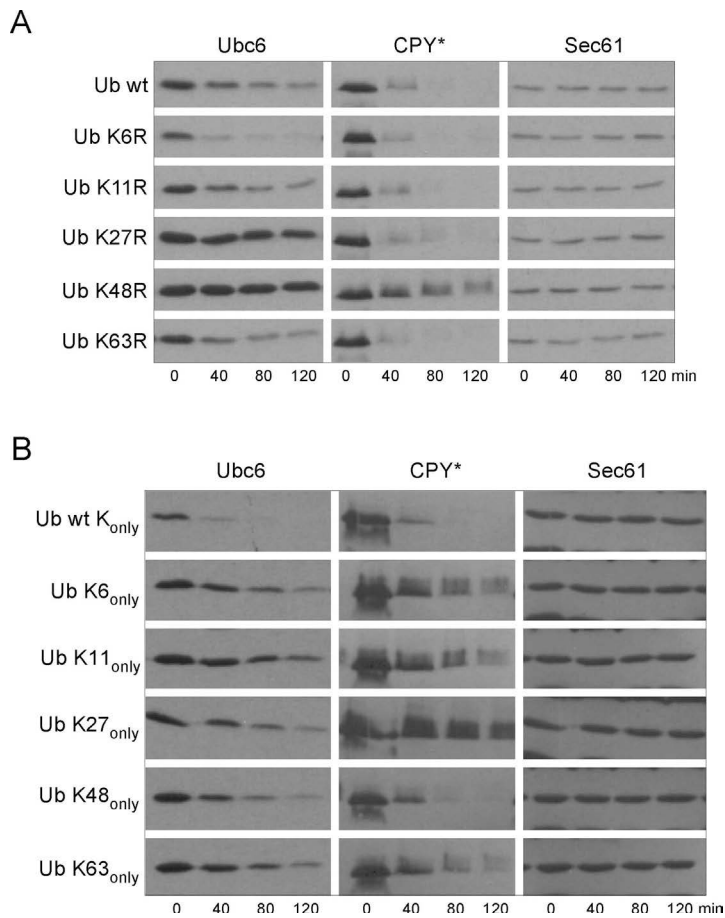


Abbildung 20: Abbau von Ubc6 und CPY* bei Überexpression verschiedener Ub *KR* oder Ub *Konly*-Mutanten. Transformation eines *prc1-1*-Hefestamms (CPY*, YTX949) mit verschiedenen Ubiquitin überexprimierenden Plasmiden (*KR*-Serie: pUB39, pUb192, pUB193, pUb195, pUb115, pUb197, *Konly*-Serie: pTX357, pTX358, pTX359, pTX360, pTX 363, pTX 364). Induktion der Überexpression in logarithmisch wachsenden Zellen mit CuSO_4 für 3,5 Stunden. Beobachtung des Proteinabbaus über 120 min nach Behandlung der Hefezellen mit Cycloheximid. A: Cycloheximid-Abbau-Experiment nach Expression von Ubiquitin-Mutanten mit Austausch einzelner Lysine zu Arginin (*KR*). B: Auswirkung der Überexpression von *Konly*-Ubiquitinmutanten auf den Proteinabbau.

Mit Hilfe des gleichen Versuchsaufbaus wie im vorhergehenden Experiment konnte der Abbau von Ubc6 und CPY* bei Überexpression dieser Mutanten betrachtet werden (Abb. 20B). Während CPY* nach Überexpression von Wildtyp-Ubiquitin (*UB wt Konly*) erneut nach 80 min nahezu vollständig proteolysiert wurde, sind die Ubiquitinmutanten mit den verbliebenen Lysinen an Position 6,11, 27 und 63 nicht ausreichend, um CPY* für den Abbau am Proteasom zu markieren. Einzig die Überexpression des *K48only*-Ubiquitin kann einen CPY*-Abbau, ähnlich dem in *WT*-

Zellen, herbeiführen. Dieses Ergebnis stimmt völlig mit den Resultaten der *in vitro* Ubiquitinierung von Ubc7, Cue1 und Hrd1 überein. Das Lysin an Position 48 des Ubiquitin ist demzufolge nicht nur notwendig und genügend für die Formierung von Polyubiquitinketten an diesem Ligasekomplex, sondern es ist auch ausreichend, um durch die Konjugation der K48-verknüpften Ubiquitinketten auf ein Protein, dieses für den proteolytischen Abbau vorzubereiten.

Der Ubiquitinierungsprozess an der Doa10-Ligase scheint etwas komplexer zu sein. Verfolgt man den Ubc6-Abbau, so vermag nur die Anwesenheit von Wildtyp-Ubiquitin das Substrat erfolgreich für die Degradation zu markieren. Die Überexpression aller untersuchten *Konly*-Mutanten, auch die von *K48only*, führt zu einer Ubc6-Stabilisierung. Dies zeigt, dass wahrscheinlich nicht ein einzelnes Lysin, sondern mehrere Lysine in Ubiquitin für die zum Abbau führende Ubc6-Ubiquitinierung notwendig sind. Als Schlussfolgerung aus der Überexpression der *KR*-Ubiquitinmutanten müsste die Mutante *KK27,48only* ausreichen, um den Ubc6-Abbau zu erlauben, da sie die erforderliche Bildung von K48- und K27-verknüpften Ubiquitinketten zulässt. Es galt nun zu überprüfen, ob die Abhängigkeit des Proteinabbaus von K27-verknüpften Ubiquitinketten ein generelles Phänomen an der Doa10-Ligase ist oder ob noch andere ERAD-Substratproteine betroffen sind.

2.18 Der Abbau von Substratproteinen an der Doa10-Ligase ist von einer K11- und K27- Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle unabhängig

Für die Untersuchungen zur Abhängigkeit des Substratabbaus von verschiedenartigen Ubiquitinketten, wurde zunächst der Abbau von Hmg2-myc, eines Substrats der Hrd1-Ligase, in einem Pulse-Chase-Experiment betrachtet (Abb. 21A). Nach Überexpression von *WT*-Ubiquitin oder der *K6R*-Mutante, sind nach 4 Stunden nur noch knapp 10% des radioaktiv markierten Hmg2-myc vorhanden. Hingegen führt die Deletion von *cue1* bei gleichzeitiger *WT*-Ubiquitin-Überexpression zu einer starken Stabilisierung des Hmg2-myc, so dass nach Ablauf der 4 Stunden noch mehr als 43 % des markierten Substrats vorliegen. Auch die Überexpression des *K48R*-Ubiquitin stabilisiert Hmg2-myc, wenn auch nicht in der Stärke wie die Cue1-Deletion. Zum Ende des Beobachtungszeitraums sind noch etwa 27 % des Ausgangsmaterials vorhanden. Ein signifikanter Einfluss der *K27R*-Ubiquitinmutante kann in diesem Experiment nicht festgestellt werden. Im Vergleich zum Abbau von Hmg2-myc nach *WT*-Ubiquitin-Überexpression ist die Menge des verbliebenen Substratproteins nach

Ergebnisse

K27R-Überexpression nur um 5 Prozentpunkte höher. Von einem eindeutigen Effekt dieser Mutante kann daher nicht gesprochen werden.

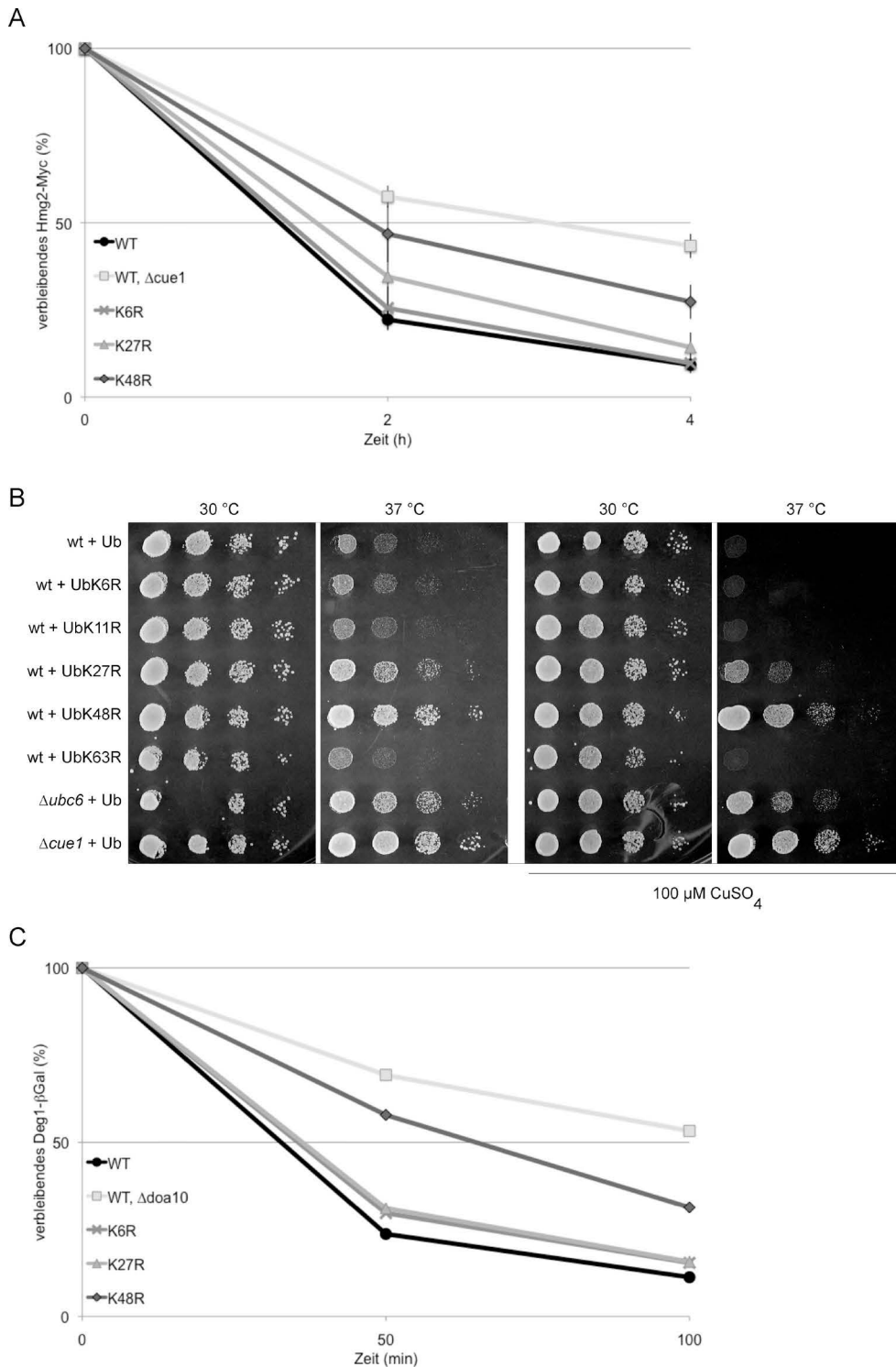


Abbildung 21: Stabilisierung von ERAD-Substratproteinen durch Überexpression von KR-Ubiquitin-Mutanten. A,C: Pulse-Chase-Experimente zur Untersuchung des Abbaus des Hrd1-abhängigen Substrats Hmg2-myc (A) oder des Doa10-abhängigen Substrats Deg1- β Gal (C). Radioaktive Markierung der neusynthetisierten Proteine für 12 min (A) bzw. 8 min (C). B: Wachstumstest von *sec61-2*-Mutanten. Nur Zellen mit stabilisiertem Sec61-Protein sind teilungsfähig.

Ergebnisse

Sec61 ist eine normalerweise stabile Komponente des Translokationskomplexes, der einen co- oder post-translationalen Transport von Proteinen aus dem Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum vermittelt. Die temperatursensitive Mutante *sec61-2* weist bei einer restriktiven Temperatur von 37 °C einen Defekt bei der Integration des veränderten Proteins in den Translokationskomplex auf, was zu einer Instabilität des Proteins führt. Als Folge dessen wird das Sec61-2-Protein an der Doa10-Ligase, teilweise auch an der Hrd1-Ligase, ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. Der für den zellulären Proteintransport so wichtige Transportkanal ist dadurch nicht funktionell. In Wachstumsexperimenten sind *sec61-2*-Zellen bei einer Inkubation bei 37 °C daher kaum teilungs- und lebensfähig. Fehlen oder Mutationen von ERAD-Komponenten, die am Sec61-2-Abbauprozess beteiligt sind, führen entsprechend zu einer Stabilisierung des Proteins und dessen verstärktem Einbau in den Translokationskomplex. Dies resultiert in einem erhöhten Zellwachstum und häufigerer Zellteilung. Ein solcher Wachstumsversuch wurde nun auch zur Untersuchung des Sec61-2-Abbaus herangezogen. Überexpression bestimmter Ubiquitinmutanten, die den Abbau des Sec61-2 verzögern, würden zu einem verstärkten Zellwachstum führen. Ein solches Experiment ist in Abbildung 21B dargestellt. Wie in den vorherigen Versuchen wurden Hefezellen verschiedener *sec61-2*-Stämme mit Plasmiden transformiert, von denen *WT*-Ubiquitin oder die unterschiedlichen Ubiquitinmutanten überexprimiert werden sollten. Die Zellen wurden in jeweils vier 10-fachen Verdünnungen (1 OD_{600} bis $1 \times 10^{-4} \text{ OD}_{600}$) auf SD-Minimal-Selektionsmedium gestempelt und bei entweder 30 °C (permissive Temperatur) oder 37 °C inkubiert. Dabei enthielt das Medium wahlweise kein oder, zur starken Induktion der Ubiquitin-Überexpression, 100 μM Kupfersulfat (CuSO_4). Zusätzlich zur Überexpression der Ubiquitinmutanten führt das Kupfersulfat zu einem milden Stress in den Zellen, weshalb die Unterschiede im Zellwachstum auf diesen SD-Platten größer sind.

Bei einer permissiven Temperatur von 30 °C wachsen die Hefezellen in allen untersuchten Hefestämmen völlig gleich. Auch die Behandlung der Zellen mit Kupfersulfat bleibt ohne Einfluss. *sec61-2*-Zellen mit zusätzlicher Überexpression von Wildtyp-Ubiquitin (WT-Ub) zeigen eine starke Einschränkung des Wachstums bei 37 °C. Auf der SD-Platte mit zusätzlichem Kupfersulfat kommt das Zellwachstum nahezu vollständig zum Erliegen. Die Deletion von *cue1* oder *ubc6* ($\Delta\text{ubc6} + \text{WT-Ub}$, $\Delta\text{cue1} + \text{WT-Ub}$) führt auf den bei 37 °C inkubierten Platten zu einer vermehrten Zellteilung, was auf die Stabilisierung des Sec61-2-Proteins zurückzuführen ist. Dabei hat die Deletion von *cue1* einen größeren Effekt als die des *ubc6*, da Cue1 den Proteinab-

Ergebnisse

bau an beiden ERAD-Ligasen reguliert, während Ubc6 nur auf die Ubiquitinierung an Doa10 wirkt.

Die Überexpression der Ubiquitinmutanten *K6R*, *K11R* und *K63R* in *sec61-2*-Zellen (Ub *KR*) führt wie die Überexpression von *WT*-Ubiquitin zu keiner besseren Zellvermehrung. Dies bedeutet, dass der Verlust der Fähigkeit, K6-, K11- oder K63-verknüpfte Ubiquitinketten zu bilden, den Abbau des fehlerhaften Sec61 nicht inhibiert. Hingegen resultiert die Expression der Ubiquitin *K48R*- oder *K27R*-Mutante, mit und ohne Induktion durch Kupfersulfat, in einer Stabilisierung des Sec61-2-Proteins und beschleunigtem Zellwachstum. Hierbei ist der Effekt von *K48R*-Ubiquitin erneut stärker als der des *K27R*-Ubiquitin. Wie für den Einfluss des Cue1 und Ubc6 könnte dies ein Hinweis auf die Funktion der verschiedenen Ketten an den unterschiedlichen Ligasen sein. Während K48-verknüpfte Ubiquitinketten durch Ubc7 an Hrd1 und Doa10 gebildet werden, sind K27-verknüpfte-Ubiquitinketten vielleicht nur für den Abbau von Doa10-abhängigen Substraten nötig.

Ein weiteres, hier bereits beschriebenes Doa10-Substrat, Deg1- β Gal, wurde nun in einem Pulse-Chase-Experiment auf dessen Abbau bei gleichzeitiger Überexpression der Ubiquitinmutanten untersucht (Abb. 21C). Zelleigene (\emptyset) sowie Überexpression von *WT*-Ubiquitin und die Überexpression der *K6R*-Mutante weisen einen vergleichbar schnellen Abbau des Deg1- β Gal auf. 100 min nach der radioaktiven Markierung der neusynthetisierten Proteine sind in diesen Hefezellen nur noch 9 % bis 13 % des markierten Proteins nachweisbar. Durch Stabilisierung des Deg1- β Gal in einem Δ *doa10*-Stamm können hier nach Ablauf der 100 min Beobachtungszeitraum noch knapp 80% des markierten Proteins detektiert werden. Während die Überexpression der *K48R*-Ubiquitinmutante Deg1- β Gal partiell stabilisiert, gut 40 % verbleibendes Protein nach 100 min, wird das Substratprotein nach *K27R*-Überexpression nahezu genauso schnell abgebaut wie unter *WT*-Bedingungen. Die Menge an verbliebenem Deg1- β Gal liegt hier bei etwa 17 %. Somit scheint Deg1- β Gal, ebenso wie Hmg2-myc unabhängig von K27-verknüpften Ubiquitinketten abgebaut zu werden.

Eine generelle Notwendigkeit der Lysin27-verknüpften Ubiquitinketten für die Doa10-abhängige Substratubiquitinierung kann also nicht festgestellt werden. Da es sich bei Ubc6 und Sec61 um membrangebundene Doa10-Substrate handelt, war die Untersuchung eines weiteren integralen Membranproteins sinnvoll. Dazu wurde eine epitopmarkierte Fusion aus Deg1 und den Transmembranbereichen des Vma12 herangezogen (Deg1-Flag-Vma12-ProteinaseA, ohne Abbildung). Jedoch auch hier

Ergebnisse

zeigte sich keine Beeinflussung des Abbaus dieses Fusionsproteins nach Überexpression von *K27R*-Ubiquitin. Im Gegensatz dazu wurde das Deg1-Vma12-Konstrukt durch Überexpression von *K48R*-Ubiquitin sowie in einem *doa10*-Deletionsstamm sehr stark stabilisiert. Es scheint also, als wäre die Bildung von K27-verknüpften Ubiquitinketten in ERAD nur für den Abbau des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc6 erforderlich.

3 Diskussion

Die Ubiquitinierung von ERAD-Substratproteinen erfolgt durch die zwei RING-Ligasen Hrd1 und Doa10. Das Substratspektrum dieser Ligasen umfasst ER-luminale und -membrangebundene Proteine sowie zytosolische Polypeptide. Diese erstaunliche Vielfalt wird durch zusätzliche Faktoren ermöglicht, die mit den Ligasen kooperieren. Von zentraler Bedeutung ist das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7 welches als einziges E2 mit beiden Ligasen interagiert und dadurch für die Modifizierung und den nachfolgenden Abbau aller bislang bekannter Substratproteine erforderlich ist. Da Ubc7 selbst ein lösliches Protein ist, wird es durch Bindung an den C-terminalen Bereich (E2BR) des membrangebundenen Co-Faktors Cue1 an die ER-Membran und somit an die Ligasekomplexe rekrutiert. Diese Interaktion stabilisiert Ubc7, welches sonst abgebaut wird.

3.1 Ubc7 zeigt eine *in vitro* Ubiquitinierungsaktivität in Wechselwirkung mit Cue1 oder den ERAD-Ligasen

Die in dieser Arbeit dargestellten *in vitro* Ubiquitinierungen belegen auf eindeutige Weise eine Polyubiquitinierungsaktivität von Ubc7 in Interaktion mit den beiden ERAD-Ligasen. Anders als unter *in vivo* Bedingungen erfolgt die Ubiquitinkettenbildung in dem hier vorgestellten *in vitro* System auch ohne die Cue1-vermittelte Rekrutierung von Ubc7 an die Ligasen. Die Synthese von Ubiquitinketten durch Ubc7 und die Ligasen ist auch in Abwesenheit von Cue1 detektierbar, jedoch verstärkt Cue1 Δ TM (ohne Transmembranbereich) die Polyubiquitinierungsaktivität um ein Vielfaches. Diese Ergebnisse konnten auch durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt werden [73], und belegen eine Funktion für Cue1 in ERAD, die über die einfache Stabilisierung und Rekrutierung von Ubc7 an die ER-Membran hinausgeht.

Eine Analyse der durch Ubc7 synthetisierten Ubiquitinkettenbildung zeigte, dass Ubc7 sowohl mit Hrd1 als auch Cue1 oder in Kombination mit beiden Proteinen Lys48-verknüpfte Ubiquitinketten bildet. Auch die Interaktion von Ubc7 mit der Doa10-Ligase, welche hier nicht dargestellt wurde, resultierte ausschließlich in der Synthese von K48-verknüpften Ubiquitinketten. Eine solche K48-spezifische Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen wurde bereits für das humane Ubc7-Homolog UBE2G2, für Homologe von Ubc7 in Pflanzen, sowie für Cdc34 der Hefe gezeigt. Die zum proteasomalen Abbau der Substratproteine erforderliche Lysin48-abhängige

Polyubiquitinierungsaktivität von Ubc7 ist von einem schleifenförmigen Bereich in Ubc7 abhängig.

3.2 Die saure Schleife in Ubc7 ist für eine Ubiquitinkettenbildung notwendig und beeinflusst die E2-E3-Interaktion

Die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc7, Cdc34 und UBE2G2 weisen im Vergleich zu anderen E2s eine gemeinsame Besonderheit auf: die Insertion von 13, teils sauren Aminosäuren C-terminal des katalytisch aktiven Cysteins (Abb. 6A, 22). Bereits früher wurde eine wichtige Funktion dieses sauren Bereichs für die E2-Enzyme UBE2G2 und Cdc34 bei der Übertragung von Ubiquitinmolekülen auf ein Substrat beschrieben. Wie die Ergebnisse der abgebildeten Versuche belegen, ist eine solche Funktion auch für die saure Schleife des Ubc7 feststellbar. In einer Ubiquitinierungsreaktion von Cdc34 mit dem SCF-Komplex und Sic1 als Substrat [9] sowie bei der Ubiquitinierung von HERPc durch UBE2G2 [69] verläuft die Monoubiquitinierung des Substratproteins nach Aminosäureaustausch oder Deletion der sauren Schleife in den E2s offenbar normal. Im Vergleich dazu wird der Transfer eines Ubiquitinmoleküls auf ein bereits monoubiquitiniertes Substrat, also die Verlängerung der Ubiquitinkette, von diesen E2-Mutanten vollständig unterbunden.

Da bei der Reaktion von Ubc7 mit Hrd1 das Ubiquitinmolekül selbst als Substrat fungiert und ein monoubiquitiniertes Substrat darstellt, lässt sich dieser Aspekt für Ubc7 hier schwer belegen. Betrachtet man jedoch die Reaktion der Ubc7-Variante mit deletierter saurer Schleife (Ubc7 Δ al) und Hrd1 in Anwesenheit von Cue1, so wird Cue1 durch die Ubc7-Mutante nur noch monoubiquitiniert, aber nicht mehr mit Polyubiquitinketten versehen. Auch die Ubc7-Varianten mit Punktmutationen innerhalb der sauren Schleife zeigen eine im Vergleich zum WT-Ubc7 deutlich reduzierte Ubiquitinierung, sowohl in Bezug auf die Bildung freier Ubiquitinketten als auch in Bezug auf die Kettenbildung auf Cue1. Der Unterschied zwischen einer Substrat-Monoubiquitinierung und der Verlängerung zu einer Ubiquitinkette liegt u. a. in der Position des Ubiquitinakzeptors zum E2.

Strukturanalysen von Ubc7 ergaben, dass ein Akzeptor-Ubiquitinmolekül das katalytisch aktive Cystein von WT-Ubc7, mit dem dort gebundenen Donor-Ubiquitin, wahrscheinlich nur in einer bestimmten Orientierung erreichen kann [44]. Diese Restriktion des Zugangs zum Donor-Ubiquitin könnte eine wesentliche Voraussetzung für die Ausbildung spezieller, K48-abhängiger Ubiquitin-verknüpfungen sein. Deletion oder

Mutation der sauren Schleife in Ubc7, welche sich in direkter Umgebung zum aktiven Cystein befindet, könnte eine Störung der für die K48-abhängigen Kettenbildung notwendigen Struktur des Ubc7 bedeuten, während die Ubiquitinkonjugation auf ein Lysin des Substratproteins nicht beeinträchtigt wird.

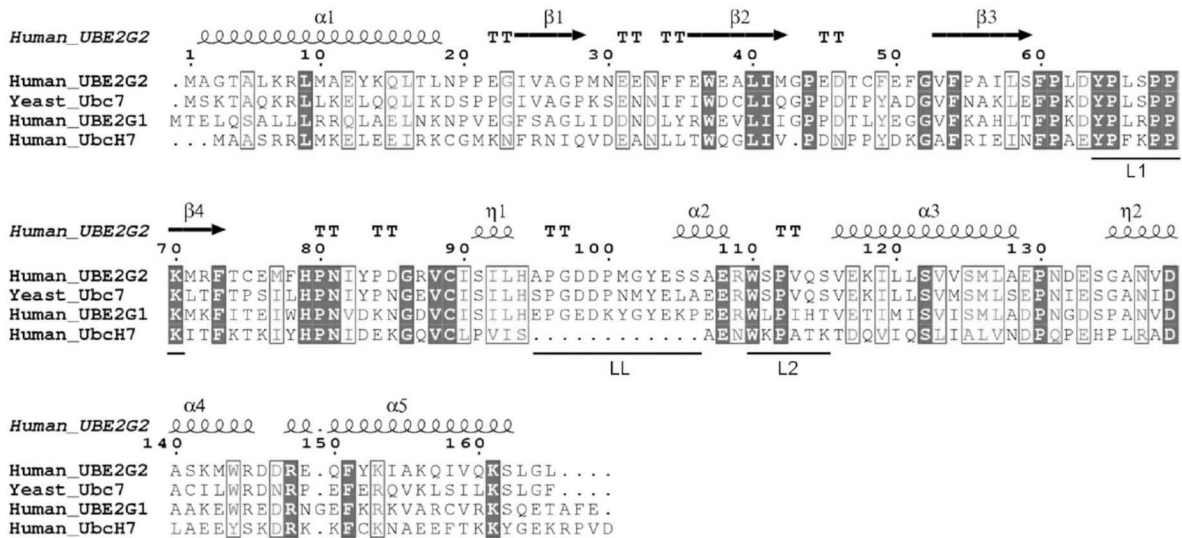


Abbildung 22: Vergleich der Proteinsequenzen von Ubc7 aus *S. cerevisiae* und den zu Ubc7 humanen Homologen. Das katalytisch aktive Cystein an Position 89 sowie zahlreiche andere Aminosäuren sind in den abgebildeten Proteinen konserviert. Die für Ubc7 charakteristische Insertion von 13 Aminosäuren (Position 95-107, hier mit LL beschriftet) ist auch in UBE2G2 und UBE2G1 enthalten. Aus: R. Arai et al. „Structure of human ubiquitin-conjugating enzyme E2G2 (UBE2G2/UBC7)“, 2006, [76].

Andererseits beeinflusst die saure Schleife auch die Interaktion von Ubc7 mit Hrd1 oder Doa10, da eine Deletion der sauren Schleife die Bindung an die RING-Ligasen verstärkt. Ein Grund hierfür könnte die, durch den verhinderten Ubiquitintransfer, anhaltende Beladung der Ubc7 Δ al-Variante mit Ubiquitin sein. Thioesterbindungen von Ubiquitin an ein E2 verändern die Interaktionsoberfläche zwischen E2 und E3, und führen zur Bildung einer sogenannten geschlossenen Konformation, die den Transfer des Ubiquitins auf ein Substrat begünstigen und die Prozessivität dieses Vorganges unterstützt [Rachel Klevit, persönliche Kommunikation]. Eine Störung des Ubiquitintransfers vom Cystein des E2s auf ein Substrat führt demnach zu einer vermehrten Bildung dieser engen E2-E3-Bindung.

In diesem Zusammenhang muss erneut kurz auf die Bindung von Ubc7 an die E2-Binderegion in Cue1 und der daraus resultierenden erhöhten Ubiquitinierungsaktivität eingegangen werden. Sowohl CUE-Domäne als auch die Ubc7-Binderegion in Cue1 sind der CUE-Domäne und der Ube2g2-Binderegion (G2BR) des humanen Proteins

gp78 sehr ähnlich. Letztere, auch als AMFR (autocrine motility factor receptor) bezeichnete RING-Ligase, ist eine zum Hrd1 der Hefe homologe ERAD-Komponente. Der im Vergleich zu Hrd1 jedoch stark verlängerte C-Terminus von gp78 beherbergt eine CUE-Domäne, die als Bindestelle des interagierenden UBE2G2 dient, sowie eine p97-bindende Region am äußersten Carboxyterminus (Abb. 23). Strukturanalysen und Bindungskinetiken zeigten, dass die Bindung von UBE2G2 an gp78 eine Konformationsänderung in der sauren Schleife des UBE2G2 bewirkt, welche die Interaktion des E2s mit dem gp78-RING verstärkt und dessen Ubiquitinierungsaktivität erhöht [6].

Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch die erhöhte Aktivität des Ubc7 mit der Hrd1 oder Doa10-Ligase in Anwesenheit von Cue1 erklären: Die Bindung von Ubc7 an den C-terminalen Bereich von Cue1 löst möglicherweise eine Konformationsänderung in Ubc7, evtl. sogar im Bereich der sauren Schleife aus, welche die Steigerung der Affinität des Ubc7 zur RING-Domäne zur Folge hat. Die für Ubc7 charakteristische saure Schleife würde demnach eine wichtige Funktion sowohl bei der Interaktion des E2s mit den Ubiquitinligasen als auch mit dem Substrat und der darauf synthetisierten Ubiquitinkette erfüllen.

3.3 Eine zusätzliche RING-unabhängige E2-E3-Interaktion erhöht die Effektivität der Polyubiquitinierung

Cdc34 interagiert ebenfalls auf zwei verschiedenen Weisen mit dem SCF-Ligase-Komplex, um Substrate effektiv zu ubiquitinieren. Zusätzlich zur Wechselwirkung von Cdc34 mit der RING-Domäne des Ligasekomplexes ist das E2 über eine elektrostatische Interaktion seines verlängerten C-Terminus mit dem Cullin Cul1 der Ligase assoziiert [71]. Da sich die Domänen für die Interaktion des E2s mit der Ligase und dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym überschneiden, erfolgt die Beladung des E2s mit einem aktivierten Ubiquitin nur nach dessen Dissoziation von der RING-Domäne der Ligase [70,77]. Die elektrostatische Wechselwirkung des Cdc34-C-Terminus mit der SCF-Ligase führt zu einer sehr schnellen und effektiven erneuten Bindung des E2 an den Ligasekomplex. Im Anschluss an die Beladung des Cdc34 mit Ubiquitin durch das E1 kann Cdc34 somit in kürzester Zeit wieder mit der RING-Domäne wechselwirken. Dies ermöglicht eine sehr schnelle Synthese ausreichend langer Polyubiquitinketten auf dem Substrat, bevor sich das Substrat von der Ligase löst.

Ein ähnliches Szenario ist auch für die Aktivität des UBE2G2 an der gp78-Ligase denkbar, da hier eine zusätzliche Interaktion des E2 durch Bindung an die E2BR in gp78 gewährleistet ist. In Kombination mit der bereits beschriebenen Konformationsänderung im E2 durch eine solche Bindung, bewirkt dies möglicherweise eine weitere Stimulation der Polyubiquitinierungsreaktion [72,78] .

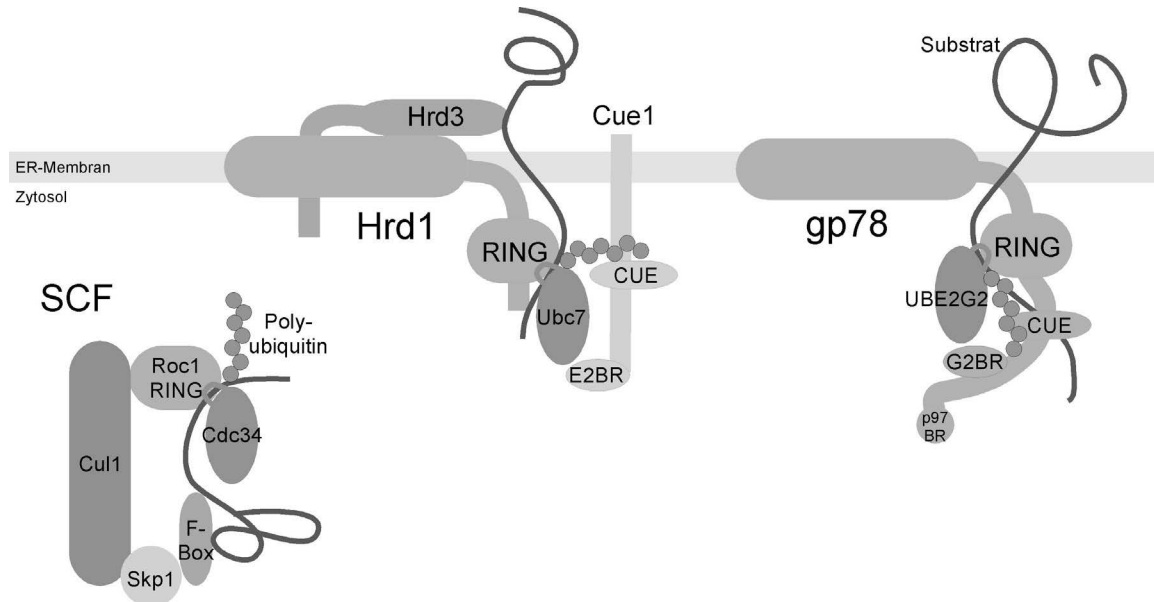


Abbildung 23: Vereinfachte Darstellung des SCF-Komplexes und der Hrd-Ligase der Hefe *S. cerevisiae* sowie dem Hrd1-Homologen gp78 aus humanen Zellen. Alle drei Ligasen interagieren mit einem E2 mit sogenannter saurer Schleife, welche für eine effektive Bildung von K48-abhängigen Polyubiquitinketten auf einem Substratprotein notwendig ist.

Die Bindung von Ubc7 an die E2-Binderegion in Cue1 resultiert in diesem Zusammenhang zumindest in einer Membranverankerung des E2s und vermittelt eine räumliche Nähe des E2s zur Ligase. Im Fall einer direkten Wechselwirkung von Cue1 mit der Ligase wäre auch Ubc7 indirekt über eine zweite, RING-Domänen-unabhängige, Bindung mit der Ligase assoziiert. Einen Hinweis hierfür liefern Immunpräzipitationsversuche, bei denen Cue1 auch in Abwesenheit von Ubc7 an die ERAD-Ligasen bindet. Die Rekrutierung von Ubc7 durch Cue1 an den Ligasekomplex würde, der für Cdc34 belegten und für UBE2G2 diskutierten Wirkungsweise entsprechend, eine effektivere Interaktion ein und desselben Ubc7-Moleküls mit dem E3-RING nach erneuter Beladung des E2s mit Ubiquitin durch das E1 erlauben. Diese räumliche Kopplung des Ubc7 an die ERAD-Ligasen und eine möglicherweise daraus resultierende Erhöhung der Ubc7 Polyubiquitinierungs-aktivität konnte in den *in vitro* Versuchen nicht nachgestellt werden. Aufgrund des Entfernen der Trans-

membranbereiche von den Proteinen wurde eine Interaktion des Cue1 mit der jeweiligen untersuchten Ligase wahrscheinlich nicht realisiert.

3.4 Sequenzielle Ubiquitinierung oder *en bloc* Transfer von Ubiquitinketten

Der eben beschriebene Prozess zur Bindung eines ubiquitinbeladenen E2s an den Ligasekomplex und der Dissoziation des unbeladenen E2s favorisiert die schrittweise Übertragung einzelner Ubiquitinmoleküle auf ein vom E3 gebundenes Substratprotein. Es gibt jedoch auch Hinweise auf einen *en bloc* Transfer von prä-assemblierten Ubiquitinketten, die durch eine Interaktion zweier Ubiquitin-konjugierender Enzyme gebildet werden. Dabei erfolgt die Ubiquitinierung eines Thioester-gebundenen Ubiquitinmoleküls auf dem katalytisch aktiven Cystein des E2s durch ein anderes E2. Hierfür wäre also eine direkte oder indirekte Dimerisierung von E2-Molekülen erforderlich. Eine wiederholte Abfolge eines solchen Vorganges führt zur Bildung einer Ubiquitinkette, die bei Interaktion mit einem E3 auf das dort gebundene Substrat transferiert wird. Eine solche Substratubiquitinierung wurde für UBE2G2 in Anwesenheit von gp78 und dem Substrat HERPc in einer *in vitro* Versuchsreihe gezeigt [69] .

Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen steht der Befund, dass sich UBE2G2 bei einer analytischen Ultrazentrifugation wie ein Monomer verhält [76] . Auch für Ubc7 konnte bei *in vivo* Immunpräzipitationsexperimenten keine Dimerisierung mit einem weiteren Ubc7 bzw. mit Ubc6 oder Ubc1 festgestellt werden, wenngleich dies eine Dimerisierung nicht völlig ausschließt. Darüber hinaus wurden auch in einer *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion unter nicht-reduzierenden Versuchsbedingungen keine auf Ubc7 befindlichen Ubiquitinketten nachgewiesen, welche über eine Thioesterbindung auf dem aktiven Cystein gebildet wurden. Homodimerisierung der jeweiligen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc7 und UBE2G2 könnte jedoch auch auf indirektem Weg stattfinden, da sowohl für Hrd1 als auch für gp78 eine Oligomerisierung der Ligasen belegt wurde [36,79] .

Ubc7 synthetisiert auch in Abwesenheit einer Ubiquitinligase Polyubiquitinketten und überträgt diese ein Substratprotein. Dies wird anhand der Interaktion von Ubc7 mit Cue1 in einer *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion deutlich, bei der sowohl freie als auch auf Cue1 konjugierte Ubiquitinketten gebildet werden. Es ist nicht auszuschließen, dass zwei Ubc7-Moleküle indirekt über eine Interaktion ihrer gebundenen Cue1-Proteine dimerisieren. Aufschlüsse über eine mögliche Interaktion zweier

Cue1/Ubc7-Komplexe könnte die Struktur dieses Heterodimers liefern. Leider wurden keine geeigneten Bedingungen gefunden, unter denen eine Kristallbildung von Cue1/Ubc7 zur Röntgenstruktur-Analyse stattfinden konnte.

3.5 Die Cue1-CUE-Domäne bindet Ubiquitin und wirkt bei der *in vitro* Synthese von Polyubiquitin durch Ubc7 kettenverlängernd

Die Interaktion von Ubc7 mit der E2-Binderegion in Cue1 ist für eine effektive Kettenbildung durch dieses E2 notwendig. Die ubiquitinbindende CUE-Domäne in Cue1 beeinflusst zusätzlich, wie in den Ergebnissen dargestellt, die Syntheserate und die Länge der durch Ubc7 gebildeten Ubiquitinketten,

Entgegen früherer Annahmen, dass die Cue1-CUE-Domäne keine Ubiquitinmoleküle bindet [45], wurde in dieser Arbeit eine Polyubiquitin-bindende Funktion für diese CUE-Domäne gezeigt. Diese scheint in Bezug auf die Art der Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle nicht spezifiziert zu sein, da sowohl K48- als auch K63-verknüpfte Ubiquitinketten gebunden wurden, welche sich strukturell deutlich voneinander unterscheiden. Die Bindung weiterer Ubiquitinverknüpfungen an die CUE-Domäne konnten nicht getestet werden, da solche Ketten bislang nicht verfügbar waren. Durch die Zugabe des deubiquitinierenden Enzyms Otubain1 zu K48-verknüpften Ubiquitinketten wurde darüber hinaus ein partieller Schutz der Ketten durch deren CUE-Domänen-abhängige Bindung an Cue1 aufgezeigt.

Die Auswertung der Untersuchungen erlaubt demnach die klare Trennung zweier verschiedener Funktionen von Cue1: Erstens, die Rekrutierung, Stabilisierung und Stimulation des Ubc7 zur Ubiquitinkettenbildung über die Bindung von Ubc7 an die C-terminale E2BR in Cue1 und zweitens, die Bindung von Ubiquitinketten durch die CUE-Domäne und dem daraus resultierenden Schutz der Ketten vor Prozessierung durch DUBs.

Die Fähigkeit des Cue1, Ubiquitinketten über die CUE-Domäne zu binden, lässt sich mit der kettenverlängernden Wirkung und der gesteigerten Rate der Kettenbildung in der *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion in Einklang bringen. Eine Bindung der von Ubc7 gebildeten, sukzessive verlängerten Ubiquitinkette durch Cue1 könnte stabilisierend auf den Ubiquitinierungskomplex aus Ubc7, Cue1 sowie dem Oligoubiquitin wirken und somit ein vorzeitiges Dissoziieren der Ubiquitinketten verhindern. Dadurch würden besonders hochmolekulare Ubiquitinketten synthetisiert. Eine Stabilisierung der auf einem Substrat konjugierten Ubiquitinketten *in vivo* hätte ebenfalls diesen Effekt.

Dies ist von Vorteil, da nach Entlassen des Substrats vom Ligasekomplex in das Zytosol verschiedene deubiquitinierende Enzyme an die Substrat-konjugierte Ubiquitinkette binden und diese stark verkürzen können [80]. Je länger die auf einem Protein verknüpfte Ubiquitinkette beim Dissoziieren vom Ligasekomplex ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Substrat mit einer für den proteasomalen Abbau erforderlichen Ubiquitinkette aus mindestens vier Ubiquitinmolekülen konjugiert ist. Zusätzlich zu dieser, den Ubiquitinierungskomplex stabilisierenden Rolle des Cue1 kann über eine weitere Funktion dieses Proteins spekuliert werden.

In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass E4-Enzyme auch in Abwesenheit einer Ubiquitinligase Ubiquitinkette von mono- oder oligoubiquitinierten Substraten verlängern. Dies trifft auch für die Wirkung des Cue1 in Anwesenheit von Ubc7 bei *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen zu. Aus Abbildungen 10A geht deutlich die kettenverlängernde Wirkung der CUE-Domäne hervor, obwohl auch nach Entfernen der CUE-Domäne Ubiquitinketten detektierbar sind. In einer *in vivo* Situation könnten die ERAD-Ligasen eine Mono- oder Oligoubiquitinierung des Substrats vornehmen, während assoziiertes Cue1 mit Hilfe seiner CUE-Domäne die Ubiquitinketten verlängert. Da möglicherweise eine Beeinflussung der Kettenlänge nicht durch die Ligasen möglich ist, hat vielleicht Cue1 hierbei eine regulierende Funktion. Eine solche E4-ähnliche Funktion wurde inzwischen auch für die CUE-Domäne in dem gp78 festgestellt [81]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein, durch die humane Ubiquitinligase RMA1 initial ubiquitiniertes Substrat (CFTR Δ F508) über die CUE-Domäne an gp78 bindet und gleichzeitig in einer CUE-Domänen-abhängigen Weise polyubiquitiniert wird. Diese Abfolge von Ereignissen ist dabei für den Abbau des mutierten CFTR notwendig.

3.6 Die Funktion der Cue1-CUE-Domäne ist *in vivo* nur für den Abbau einiger Substratproteine bedeutsam

In *S. cerevisiae* beeinträchtigt die Deletion der Cue1-CUE-Domäne nur in wenigen Fällen die Proteolyse von ERAD-Substraten. ER-membrangebundene Proteine, wie Ubc6 und Hmg2, deren Abbau in *cue1*-CUE-Domänen-Mutanten reduziert ist, könnten eine eigene Substratklasse definieren, deren effektive Polyubiquitinierung durch Ubc7 die Anwesenheit der CUE-Domäne in Cue1 erfordert. Diese Hypothese widerlegen im Jahr 2009 veröffentlichte Daten [82]. Die Autoren dieses Artikels untersuchten das Protein Ste6*-HA, einen mutierten Mat α -Faktor-Transporter, auf dessen Stabilität in *cue1* Δ CUE-Hefezellen. Wie Ubc6 und Hmg2-myc ist auch Ste6* ein

integrales ER-Membranprotein mit zytosolischem Anteil und wird auch durch die Doa10-Ligase ubiquitiniert. Allerdings beeinflusst eine Deletion der CUE-Domäne den Abbau dieses Substratproteins nicht. Es wurde ebenso effektiv abgebaut wie in Wildtyp-Zellen. Demzufolge gibt es wahrscheinlich weitere Kriterien oder Merkmale, die Substrate einem CUE-Domänen-abhängigen Abbau zuführen. Leider konnten im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen keine weiteren Substrateigenschaften diesbezüglich definiert werden. Da Hmg2-myc und Ubc6 an verschiedenen Ligasen ubiquitiniert werden, scheint der Einfluss der CUE-Domäne sowohl für den Ubc7/Cue1-Komplex an der Hrd-Ligase als auch an Doa10 zu bestehen.

3.7 Ubc6 synthetisiert K11-verknüpftes Oligoubiquitin unabhängig von der Doa10-RING-Domäne

Im Gegensatz zum Hrd-Komplex sind die Proteinmodifikation und der Substratabbau über die Doa10-Ligase nicht nur von Ubc7 und Cue1 sondern auch von Ubc6 abhängig. Demzufolge muss es deutliche Unterschiede in der Arbeitsweise von Hrd1 und Doa10 geben. Wenn die Aktivität von Ubc7 grundsätzlich für eine effektive Substratubiquitinierung durch Hrd1 ausreicht [46,83], welche Funktion erfüllt dann Ubc6 am Doa10-Komplex?

Bei Untersuchungen zur Ubiquitinierungsaktivität von Ubc6, ohne dessen Transmembrananker, *in vitro*, lässt sich eine Auto-Monoubiquitinierung des Ubc6 beobachten. Diese Aktivität erfordert das katalytisch aktive Cystein des Ubc6 und erfolgt unabhängig von Doa10. Unklar ist jedoch, ob eine Interaktion von Ubc6 mit Doa10 *in vitro* nur aufgrund der fehlenden Transmembranbereiche nicht vermittelt wurde, oder ob die Aktivität von Ubc6 generell unabhängig von der Wechselwirkung mit der Doa10-RING-Domäne ist. Bei den *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen lagen Ubc6 und Ubc7 jeweils in vergleichbaren Konzentrationen vor. Dennoch konnte die für Ubc7 gezeigte Polyubiquitinierungsaktivität nicht für Ubc6 festgestellt werden. Möglicherweise beschränkt sich die Funktion von Ubc6 auf eine Monoubiquitinierungsaktivität. Auto-Monoubiquitinierung des Ubc6 könnte eine Veränderung in der Struktur des Ligasekomplexes bewirken. Auch die Konjugation eines Monoubiquitins auf ein bestimmtes Lysin des Substratproteins oder auf andere ligaseassoziierte Faktoren ist denkbar und würde den Doa10-abhängigen Substratabbau beeinflussen. Die Verwendung von Ubc6 als Substratprotein in dem *in vitro* System erwies sich im Nachhinein als ungeeignet, da der Ubc6-Abbau von der Bindung des Ubc6-Transmembranbereichs an die 5. Transmembrandomäne von Doa10 abhängt [84].

Eine Verlängerung der *in vitro* Inkubation von Ubc6 und Ubiquitin ergab freie niedrigmolekulare Ubiquitinverknüpfungen sowie Oligo- oder multiple Monoubiquitinierung von Ubc6. Dabei konnte eine bevorzugte Bildung der Ubiquitinverknüpfungen mit einer K11only-Variante von Ubiquitin beobachtet werden, was auf eine mögliche vorrangige Bildung von K11-Ketten durch Ubc6 hindeutet. Dies wurde auch durch unabhängige Untersuchungen von Xu et al. im Jahr 2009 [19] gezeigt. Eine Modifikation der Doa10-abhängigen Substratproteine mit zwei verschiedenen verknüpften Ubiquitinketten ist daher möglich - den durch Ubc7 gebildeten K48-abhängigen sowie den durch Ubc6 geformten K11-Ketten. Ein weiteres Indiz für die Synthese K11-verknüpfter Ubiquitinketten durch Ubc6 liefern *ubc6*-defiziente Zellen, in denen die Menge an K11-verknüpften Ubiquitinkonjugaten im Vergleich zu *WT*-Zellen um etwa 40 % reduziert ist [19].

Da Ubc6 selbst ein Doa10-abhängiges Substrat ist, sollten sich verschieden gebildete Ketten auch auf Ubc6 nachweisen lassen. Tatsächlich befinden sich im Vergleich zum Wildtyp weniger Ubiquitinketten auf Ubc6, wenn dieses aus Hefezellen präzipitiert wird, die eine katalytisch inaktive *ubc6C(87)S*-Mutante exprimieren. Diese Beobachtung weist auf eine Beteiligung der Ubc6-Aktivität an der Substratubiquitinierung hin [85]. Die Ergebnisse stimmen mit Resultaten der massenspektrometrischen Analyse überein, bei denen K11-verknüpfte Ubiquitinmoleküle (53%) aber auch K48- (20%) sowie K33- und K63-Verknüpfungen auf aus Hefe aufgereinigtem Ubc6 detektiert wurden [19]. Zusätzlich stabilisierte die Expression von K11R-Ubiquitin das Ubc6-Protein unter den dort beschriebenen Bedingungen.

Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse der hier vorgestellten *in vivo* Ubc6-Abbauexperimente, bei denen eine Stabilisierung von Ubc6 durch Überexpression der *K27R*-Ubiquitinmutante, aber nicht durch Überexpression der *K11R*-Mutante detektiert wurde. Demzufolge müsste neben K48-verknüpften Ubiquitinketten auch K27-verknüpftes Polyubiquitin für den Ubc6-Abbau verantwortlich sein. Eine Beeinträchtigung des Abbaus anderer Doa10- oder aber auch Hrd1-abhängiger Substratproteine durch die Überexpression der *K27R*- oder *K11R*-Mutante konnte nicht festgestellt werden. Wie erwartet, erfuhren jedoch alle untersuchten Substratproteine eine Stabilisierung durch die Überexpression des *K48R*-Ubiquitins.

Die Stabilisierung von Ubc6 nach *K27R*-Überexpression in den Hefezellen beeinflusst demnach möglicherweise ausschließlich dieses kurzlebige E2. Bislang konnte weder geklärt werden, ob Ubc6 selbst die K27-Ketten bildet, noch ob die derart ver-

knüpften Ubiquitinmoleküle auf Ubc6 konjugiert sind. Es ist nicht auszuschließen, dass ein unbekanntes E2 diese Art der Polyubiquitinierung auf einem anderen Protein vornimmt, welches letztendlich zur Degradation von Ubc6 führt. Die Untersuchung dieser Fragestellung steht noch aus.

3.8 Ubc6 hat keinen Einfluss auf die Ubc7-abhängige Substratubiquitinierung

Wie bereits erwähnt, gibt es keine Belege für eine Wechselwirkung von Ubc6 mit der Doa10-RING-Domäne. Es ist jedoch möglich, dass Ubc6, wie auch Ubc7 eine Ubiquitinierungsfunktion in Interaktion dieser Domäne ausführt. Eine Konkurrenz der beiden E2s um die Bindung an der RING-Domäne ist hierbei denkbar. Hefezellen, in denen jeweils eines der beiden E2s deletiert oder überexprimiert war, wiesen jedoch keine verstärkte Bindung oder Verdrängung des jeweils anderen E2s an der Doa10-Ligase auf. Allerdings könnte eine Überexpression von Ubc6 statt in einer verstärkten Bindung an die RING-Domäne auch in einer gesteigerten Wechselwirkung des Ubc6 mit dessen Substratbindestelle in Doa10 resultieren, Dies würde den Konkurrenzeffekt der E2s um die RING-Domänen-Interaktionsstelle überdecken.

Alternativ könnten Ubc6 und Ubc7 in einer sequentiellen Reaktion eine einzelne Ubiquitinkette auf einem Substratprotein synthetisieren. Ein solches Zusammenspiel wurde bereits für die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc4 und Ubc1 am APC-Komplex in *S. cerevisiae* nachgewiesen. Dabei übernimmt das erste Enzym die initiale Mono-oder Oligoubiquitinierung, während das zweite Enzym die Kette, möglicherweise mit einer verschiedenartigen Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle, verlängert. Eine Beeinflussung der *in vitro* Polyubiquitinierungsaktivität von Ubc7 durch Zugabe von Ubc6 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Für die Wirkungsweise von Ubc6 und Ubc7 ist auch eine Ubiquitinierung des Substratproteins mit zwei unterschiedlich verknüpften, separaten Ketten denkbar.

Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Funktionen der E2s an der Doa10-Ligase liefert die Beobachtung, dass eine Deletion von Ubc6 ($\Delta ubc6$) nicht in einer Reduktion des mit der Ligase assoziierten Cdc48 resultiert. Dies führt im Umkehrschluss zu der Annahme, dass die Aktivität und das Vorhandensein von Ubc6 nicht für die Rekrutierung von Cdc48 notwendig sind. Auch die für die Cdc48-Rekrutierung erforderliche Ubiquitinierungsaktivität der Ligase [60] wird nicht beeinflusst. Die Tatsache, dass Ubc6 auch eine Rolle im Abbau von Substraten spielt, z.B. Deg1, die in

einer Cdc-48-unabhängigen Weise dem proteasomalen Abbau zugeführt werden, ist im Einklang mit diesem Befund. Die von Ubc7 ausgeführte Substratubiquitinierung ist also offenbar für die Cdc48-Interaktion mit dem substratgebundenen Ligasekomplex ausreichend. Eine Wechselwirkung von Cdc48 mit den ERAD-Ligasen gilt als eine Voraussetzung für die Freisetzung des ubiquitinierten Substratproteins aus dem Ligasekomplex und dessen Weitertransport zum Proteasom [86]. Ob in einer $\Delta ubc6$ -Mutante die durch Ubc7 ubiquitinierten Substratproteine noch unter Mitwirkung von Cdc48 aus dem membrangebundenen Ligasekomplex herausgelöst werden, oder an welcher Stelle der Abbau der Doa10-abhängigen Substrate in $\Delta ubc6$ -Zellen gestört ist, soll in naher Zukunft geklärt werden.

Die Ubiquitinierung von Substraten durch Ubc6 könnte der Rekrutierung zytosolischer Chaperone dienen, welche für die Löslichkeit der zu degradierenden Proteine notwendig sind. Auch die Bindung bisher unbeachteter Doa10-interagierender Faktoren über eine Ubiquitin-bindende Domäne an eine speziell durch Ubc6 auf dem Substrat konjugierte Ubiquitinkette könnte für den Abbau der Substratproteine notwendig sein.

3.9 Ubiquitinierung verschiedener Substratproteine

Aufgrund der Verschiedenheit der ERAD-Substrate muss der Mechanismus der Ubiquitinierung flexibel gestaltet sein. Dies wird zum einen durch die ERAD-Ligasen selbst ermöglicht, die sich durch eine unterschiedliche Substratspezifität auszeichnen, und zum anderen durch die mit den Ligasen assoziierten Faktoren. Für den Abbau Hrd1-abhängiger ER-membrangebundener Substrate ist, neben der Ligase selbst, das an Hrd1 lokalisierte Der1 erforderlich. Eine Interaktion von Hrd1 mit Usa1 bewirkt eine Oligomerisierung der RING-Ligase, welche für die Degradation ER-luminaler Substrate eine wichtige Rolle spielt [36]. Bei Überexpression von Hrd1 ist jedoch die Usa1-bedingte Oligomerisierung der Ligase für den Substratabbau verzichtbar [87]. In wie weit die ligaseassoziierten Faktoren an der Substraterkennung beteiligt sind, die Ubiquitinierungsaktivität des E2-E3-Komplexes beeinflussen oder weitere Co-Faktoren an den Ligasekomplex rekrutieren, ist nicht genau geklärt. Weiterhin sind für die Doa10-Ligase bislang wenig interagierende Proteine beschrieben und auch der Substratrekrutierungsmechanismus an dieser Ligase ist unbekannt.

Alle Versuche, artifizielle, sowie physiologisch relevante oder bereits monoubiquitinierte Substratproteine in einer *in vitro* Reaktion zu ubiquitinieren, sind bislang ge-

scheitert. Hierfür kann es mehrere Gründe geben. Auf der einen Seite wurde vielleicht nicht das erforderliche Verhältnis von Substrat- und Enzym-Molekülen erreicht, damit die Ubiquitinierung vollzogen werden kann. Andererseits reichte ein etwa ungefähres 1:1 Verhältnis von Cue1 und Ubc7 für die Cue1-Modifikation aus. In den *in vitro* Ubiquitinierungsreaktionen synthetisierte Ubc7 auch in Abwesenheit einer Ligase Ubiquitinketten, die teilweise auf Cue1 konjugiert sind. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine artifizielle Modifizierung von Cue1, bei der Cue1 anstelle eines relevanten Substratproteins ubiquitiniert wird. Eine Ubiquitinierung von Cue1 wurde *in vivo* bisher nicht beobachtet, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Grund für eine fehlende Ubiquitinierung der eingesetzten Substratproteine könnte deren mangelnde Bindung an die aufgereinigten Ligasefragmente sein.

Im Vergleich zu anderen RING-Ligasen ist die Substratrekrutierung durch die ERAD-Ligasen wesentlich komplexer. Die Rekrutierung von löslichen oder membrangebundenen Substratproteinen an die membranverankerten Ligasen Doa10 und Hrd1 erfordert wahrscheinlich andere Mechanismen als die Rekrutierung von löslichen Substraten an zytosolische Ligasen. Für die heterologe Expression der Hrd1- und Doa10-Ligase in *E. coli* mussten die für die Transmembranbereiche kodierenden Sequenzen entfernt werden. Dadurch beinhalten die in den *in vitro* Versuchen verwendeten Ligasefragmente zwar ihre katalytisch aktive RING-Domäne, aber möglicherweise substratbindende Regionen im Bereich der Transmembrandomänen fehlten. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass Substratproteine in den Zellen vielleicht nicht direkt an die Ligasen binden, sondern, z.B. wie bei Cullin-Ligasen, über ligaseassoziierte Faktoren gebunden werden. Da für Doa10 kaum assoziierte Proteine bekannt sind, kann über eine Beteiligung von Co-Faktoren hier nur spekuliert werden.

Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass lösliche ER-Substratproteine über die luminale Domäne des mit Hrd1 komplexierten Hrd3 an die Ligase rekrutiert werden. Die für die Ubiquitinierung notwendige Dislokation von ER-luminalen Substratproteinen stellt jedoch eine besondere Herausforderung dar. Wenn der Ligasekomplex selbst einen Kanal zur Dislokation der luminalen Substratproteine bildet, oder dieser zumindest in unmittelbarer Nähe zur Ligase besteht, wäre eine erneute Bindung der Substrate durch Hrd1 auf zytosolischer Seite der ER-Membran womöglich überflüssig. Allerdings könnten auch die auf zytosolischer Seite mit Hrd1 interagierenden Faktoren eine Substratbindung ausüben. Sowohl das Verständnis der Proteindislokation als

auch der Bindung von Substratproteinen an die zytosolischen Bereiche der für ERAD wichtigen Ligasekomplexe bleibt ein wesentliches Ziel weiterer Untersuchungen

3.10 Substratubiquitinierung im ERAD-System – ein Modell

Die sequentielle Ubiquitinierung von ERAD-L oder ERAD-M-Substratproteinen an der Hrd1-Ligase wird durch die Aktivität von Ubc7 ausgeführt, die von einer strukturellen Besonderheit dieses E2s, der sauren Schleife, abhängt. Eine Interaktion des Ubc7 mit Cue1 ist nicht nur für die E2-Rekrutierung an die ER-Membran notwendig, sondern stimuliert die Polyubiquitinierungsaktivität und beeinflusst die Länge der Ubiquitinketten. Hierfür spielen die E2-Binderegion und die CUE-Domäne in Cue1 eine wesentliche Rolle. Die Funktion der Cue1-CUE-Domäne ist jedoch nur für den Abbau einer Gruppe von membrangebundenen Substratproteinen wichtig.

Hingegen ist der Abbau von ERAD-C-Substratproteinen von der Aktivität der E2s Ubc6 und Ubc7 an der Doa10-Ligase abhängig. Die durch Ubc7 geformten K48-verknüpften Ubiquitinketten auf dem Substrat genügen, um die Cdc48-Segregase an den Ligasekomplex zu rekrutieren. Die von Ubc6 gebildeten, wahrscheinlich K11-verknüpften Ubiquitinketten, erfüllen eine bislang unbekannte Funktion im Prozess des Doa10-abhängigen Substratabbaus. Eine Inhibierung der Synthese von K27-verknüpften Ubiquitinketten hat im Gegensatz dazu nur einen Einfluss auf den Abbau von Ubc6.

ER-assoziierten Proteindegradation ist also ein komplexer Mechanismus, der von zahlreichen Faktoren abhängt. Die zentrale Funktion des Ubc7, die K48-abhängige Ubiquitinierung von Substratproteinen, wird an beiden ERAD-Ligasen durch zusätzliche Faktoren, z. B. Cue1 oder Ubc6 in einer substratspezifischen Weise moduliert. Neben den für einen proteasomalen Proteinabbau notwendigen K48-verknüpften Ubiquitinketten, scheinen auch andersartige Ubiquitinketten eine wichtige Rolle in ERAD zu spielen.

4 Material und Methoden

4.1 PCR

Polymerasekettenreaktionen wurden nach einem allgemeinen Schema durchgeführt: Denaturierung der DNA für 5 min bei 95 °C, 25-30 Zyklen [45 s Denaturierung bei 95 °C, 45 s Anlagerung der Oligonukleotide an der DNA bei 48-56 °C, Elongation der Oligonukleotide (ca. 1 kb/min) bei 72°C], Elongation für weitere 5 min bei 72 °C, Abkühlen der Reaktion auf 8 °C. Für die Synthese /Verlängerung der DNA-Stränge wurde das *Expand High Fidelity PCR-System* (Roche) oder die *Pfu UltraTM* DNA-Polymerase (Stratagene) verwendet.

4.2 Klonierung und DNA-Aufreinigung

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden entsprechende Enzyme sowie die Reaktionspuffer von *New England Biolabs* (NEB) verwendet. Die Proben wurden anschließend mit OrangeG-Probenpuffer versetzt (5x Puffer: 0,25 % OrangeG, 50 % Glycerin, 5 mM EDTA pH 8,0) und die enthaltene DNA mittels Gelelektrophorese über 0,6-2 % Agarosegele, welche Ethidiumbromid oder *RedSafeTM* (IntRON) enthielten, der Größe nach aufgetrennt. Unter UV-Licht sichtbare DNA wurde unter Verwendung des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) aus dem Agarosegel aufgereinigt. Für die Ligation der DNA in Vektoren wurde die T4-DNA-Ligase sowie der dazugehörige 10xPuffer von NEB verwendet.

4.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen fand in LB- (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) oder TB-Flüssigmedium (1,2 % Trypton, 2,4 % Hefeextrakt, 0,4 % Glycerol, 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄) bzw. Auf LB-Nährplatten (LB-Medium + 2% Agar-Agar) statt.

4.4 Transformation von *E. coli*

Elektrokompetente Zellen verschiedener *Escherichia coli*-Stämme (XL-1, BL21, BL21 Rosetta2) wurden mittels Elektroporation transformiert und anschließend auf LB-Antibiotika-Selektionsplatten kultiviert.

4.5 Plasmidpräparation aus *E. coli*

In XL-1 -Zellen amplifizierte Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *Jetstar* –Systems (Genomed) aus den Zellen präpariert.

4.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression GST-epitopmarkierter Proteine und Proteinfragmente wurden die jeweiligen entsprechenden amplifizierten Gensequenzen über verschiedene Restriktionsschnittstellen in die multiple Klonierungsstelle des pGex6P-1 Vektors (GE-Healthcare) eingefügt. Die Transformation von *E. coli BL21 Rosetta 2*-Zellen (Novagen) mit dem so konstruierten, gereinigten Plasmid erfolgte mittels Elektroporation. Die Expression der Proteine wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG zur Bakterienkultur in TB-Medium induziert und dauerte bei 16 °C und 180 Upm (Luftschüttler) 16-17 Stunden. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen und Waschen mit bidestilliertem Wasser erfolgte der Zellaufschluss per Ultraschall (*BRANSON Sonifier*: Output 4-5; 60 % Duty Cycle; 3 x 30 Pulse) in einem PBS-Puffer mit 0,5 % TritonX-100 und *Complete EDTA-free* Proteaseinhibitoren. Eine anschließende Zentrifugation trennte feste Zellbestandteile von löslichen Komponenten. Der Überstand der Zentrifugation wurde mit einer adäquaten Menge equilibrierter *Glutathion-SepharoseTM 4FastFlow* versetzt und 2,5 Stunden bei 4 °C unter ständigem Schwenken inkubiert. Nach Sedimentation der SepharoseTM wurde der Überstand verworfen und die Sepharose 3 x mit jeweils 10-fachem SepharoseTM-Volumen mit PBS gewaschen. Für die Elution von GST-Fusionsproteinen wurde 20 mM Glutathion in einem 50 mM Tris-HCl (pH 8) verwendet. Sollte das GST-Epitop von den Fusionsproteinen entfernt werden, folgten anstatt der Elution drei weitere Waschschrte mit jeweils 10-fachem SepharoseTM-Volumen an *Precission Protease Cleavage Buffer* (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,5). Die Zugabe von *Precission Protease* (GE Healthcare), zu der SepharoseTM, und die anschließende Inkubation für 16 h bei 4 °C bewirkte die Trennung des Proteins vom GST-Epitop an der im pGex6P-1 Vektor dafür vorgesehenen Sequenz. Das Protein wurde auf diese Weise gleichzeitig von der SepharoseTM eluiert. Aliquots der aufgereinigten Proteine lagerten bei -80 °C.

4.7 Aufreinigung von His₆-epitopmarkierten Fusionsproteinen

Amplifizierte Gensequenzen der entsprechenden Proteine und Proteinfragmente wurden über Restriktionsschnittstellen in die multiple Klonierungsstelle des pQE60-Vektors ligiert und *E. coli* BL21-Zellen anschließend mit dem gereinigten Plasmid transformiert. Die Proteinexpression wurde nach Expressionsinduktion mittels Zugabe von 0,5 mM IPTG zur Bakterienkultur in LB-Medium für 4 Stunden bei 37 °C im Luftschüttler (200 Upm) durchgeführt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen und Waschen mit bidestilliertem Wasser erfolgte der Zellaufschluss per Ultraschall (*BRANSON Sonifier*: Output 4-5; 60 % Duty Cycle; 3 x 30 Pulse) in einem Puffer aus 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 7,5 + Complete EDTA-free® Proteinaseinhibitoren. Eine anschließende Zentrifugation trennte feste Zellbestandteile von löslichen Komponenten. Der Überstand der Zentrifugation wurde mit einer adäquaten Menge equilibrierter *Ni-NTA-Agarose* (QIAGEN) oder *Talon® Metal Affinity Resin* (Clontech Laboratories, Inc.) versetzt und 2,5 Stunden bei 4 °C unter ständigem Schwenken inkubiert. Nach Sedimentation der Agarose (bzw. des Talon® Resin) wurde der Überstand verworfen und die Sepharose 3x mit kaltem 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 7,5 gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM – 500 mM Imidazol pH 7,5. Dialyse der Eluate ÜN in einem Puffer aus 50 mM Tris-HCl pH7,5, 200 mM NaCl, 5 % Glycerin. Die Proteine lagerten anschließend bei -80 °C.

4.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von aufgereinigten Proteinen erfolgte mit Hilfe des *DC Protein Assay* (Bio-Rad), welches die Protein-Nachweismethode nach Lowry (Lowry et al., 1951) unterstützt. Eine Eichreihe mit definierten Konzentrationen von BSA diente dem Vergleich der Absorbtionswerte bei 750 nm und der Ermittlung der Proteinkonzentration.

4.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die größenabhängige Auftrennung von Proteinen einer Probe wurden die Proben zunächst mit einem SDS-haltigen Probenpuffer versetzt. Die verschiedenen verwendeten Probenpuffer beinhalteten teilweise Harnstoff oder reduzierende Agenzien, wie β -Mercaptoethanol oder DTT.

- 4x reduzierender Probenpuffer (nach Laemmli): 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 20 % β -Mercaptoethanol, 40 % Glycerol, 16 % SDS, 0,05% Bromphenolblau

- 2x nicht-reduzierender Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 4 M Harnstoff, 10 % Glycerol, 0,05% Bromphenolblau
- reduzierender Harnstoff-Probenpuffer (Plemper et al.1998): 8 M Harnstoff, 200 mM Tris-HCl, pH 6,8, 5 % SDS, 0,1 mM EDTA, 0,03 % Bromphenolblau, 1,5 % DTT

Es wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli angewendet (Laemmli, 1970,).

4.10 Western-Blotting / Immunoblotting

Der Transfer von Proteinen aus dem SDS-Gel auf eine PVDF wurde durch sogenanntes "Tank-Blotting" in einem Western-Blot-Puffer (1,1 % Glycin, 0,24 % Tris-base, 25 % Methanol 0,01 % SDS) bei 250 mA für 1,5 h erreicht.

Nach Absättigung der Membran mit 10 % Magermilch in TBT (10x TBT: 0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl, 1 % Tween) wurde eine 5 %-ige Magermilchlösung, die mit einem primären, jeweils proteinspezifischen, Antikörper versehen war, zu den Membranen gegeben. Nach ÜN-Inkubation und waschen der Membranen mit PBS + 0,2 % Brij 58 und PBS erfolgte die Zugabe des sekundären, Peroxidase-gekoppelten (HRP-Konjugate, *horseradish peroxidase*) Antikörpers in 5 %-iger Magermilchlösung. Nach 1-stündiger Inkubation und erneutem Waschen der Membran wurde *Western Lightning® Plus-ECL* (PerkinElmer) zu den Membranen gegeben. Die Chemolumineszenzreaktion des dort enthaltenen Luminols wurde durch die Antikörper-konjugierte Peroxidase katalysiert. Durch Auflegen von Röntgenfilmen (Biomax, Kodak®) auf die so behandelten Membranen und anschließender Entwicklung der Röntgenfilme konnten die Lichtsignale in Schwärzungen auf dem Röntgenfilm umgewandelt und anschließend ausgewertet werden.

4.11 Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Gelen

Eine Anfärbung von Proteinen in SDS-Gelen mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau R-250 diente der Überprüfung der Reinheit von aufgereinigten Proteinen in den untersuchten Proben (Abb. 4). SDS-Gele wurden nach abgeschlossener Gelelektrophorese für 30 min in der Coomassie-Färbelösung (45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,25 % Coomassie Brillantblau R-250) gefärbt und folgend solange unter Schütteln in Entfärbelösung (45 % Methanol, 10 % Essigsäure) gelegt, bis die gefärbten Proteine deutlich sichtbar wurden.

4.12 *In vitro* Ubiquitinierung

Die Reaktionsansätze enthielten jeweils: 18,3 ng/μl E1 (Ube1, *Boston Biochem*, E-301), 66,6 ng/μl bzw. 133,3 ng/μl Ubiquitin (SIGMA 93950, Flag-Ub sowie Ub-Varianten von *Boston Biochem*), 66,6 ng/μl bis 133,3 ng/μl E2 (aufgereinigtes Ubc6, Ubc7 und derenVarianten) sowie 66,6 ng/μl bis 133,3 ng/μl E3 (aufgereinigtes Doa10 oder Hrd1) und Cue1 bzw. dessen Varianten (66,6 ng/μl bis 133,3 ng/μl) in einem Puffer aus 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 2,5 mM MgCl₂, 4 mM ATP (SIGMA A9187) und 0,5 mM DTT.

Die Proben wurden für die jeweils angegebene Zeit bei 30 °C im Wasserbad inkubiert und zum Beenden der Ubiquitinierungsreaktion mit SDS-Probenpuffer (nicht-reduzierend oder reduzierend) versetzt und erhitzt. Die Proben wurden im weiteren mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

4.13 *In vitro* Bindung von Ubiquitinketten

Aufschluss von transformierten *E. coli*-Zellen und Bindung der GST-Fusionsproteine an *Glutathion-Sepharose*TM 4 *Fast Flow* (wie bereits beschrieben). Anschließendes Waschen der SepharoseTM mit Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA). Zu je 25 μl der proteingekoppelten SepharoseTM wurden 150 μl Bindungspuffer sowie 400 ng präassemblierter K48- bzw. K63 verknüpfter Ubiquitinketten (Ub₂-Ub₇, Enzo Lifesciences) gegeben und 3 h schwenkend bei 4 °C inkubiert. Fällung des Überstandes mit 20 % TCA und Waschen des Präzipitats mit 100 % Aceton. Nach dem Waschen der Sepharose mit Bindungspuffer wurden je 40 μl Laemmli-Probenpuffer zu der Sepharose und zum Präzipitat des Überstandes gegeben, die Proben erhitzt und anschließen mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

4.14 *In vitro* Deubiquitinierung

Zu je 66 ng/ml präassemblierter K48-verknüpfter Ubiquitinketten, in einem eisgekühlten Reaktionspuffer aus 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, wurden entweder 0,6 μg/μl BSA oder 0,45 μg/μl aufgereinigtes nicht-epitopmarkiertes Cue1 bzw. Cue1RGA gegeben. Entnahme einer Probe (Zeitpunkt 0). Zugabe von 33 ng/μl His₆-Otubain1 (K48-spezifisches DUB, human, recombinant, N-terminal mit 6xHis epitopmarkiert, Enzo Lifesciences) und Entnahme weiterer Proben zu den angegebenen Zeitpunkten. Analyse der mit Laemmli-Probenpuffer versehenen Proben durch SDS-PAGE und Immunoblotting.

4.15 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefezellen wurden entweder in YPD-Vollmedium (1 % Hefeextrakt, 2 % Bacto-Pepton, 2 % Glukose, pH 5,5 eingestellt mit HCl) oder SD-Minimalmedium (0,67 % Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 2 % Glucose, 20 mg/l L-Histidin-HCl, 30 mg/l L-Leucin, 30 mg/l L-Lysin, 20 mg/l L-Tryptophan, 20 mg/l Adeninsulfat, 20 mg/l Uracil) kultiviert. Für die Anzucht von Hefekolonien auf Nährplatten wurde dem YPD-oder SD-Flüssigmedium 2 % Agar-Agar beigefügt und in Petrischalen gefüllt.

4.16 Hefetransformation

Zu etwa 0,5 OD₆₀₀ exponentiell wachsender Hefezellen wurden 0,5-1 µg/µl Plasmid-DNA und 0,2 µg/µl denaturierte Heringssperm-DNA in 100 µl 100 mM LiAc, 1xTE gegeben und mit den Zellen gemischt, Nach Zugabe von 500 µl 40 %PEG, 100 µl 100 mM LiAc, 1xTE wurde die Suspension 30 min bei 30 °C inkubiert, danach folgte eine Temperaturerhöhung auf 42 °C für 15 min. Die pelletierten und in Wasser resuspendierten Zellen wurden auf SD-Selektionsmedium ausplattiert.

4.17 Verpaarung und Sporulation von Hefezellen mit anschließender Tetradenanalyse

Verpaarung von Hefezellen:

Aus Über-Nacht-Kulturen (ÜN) der zu verpaarenden Hefezellen unterschiedlicher Mating-Typen (a und alpha) wurden je 50µl der Suspensionen und 1,8 ml YPD-Flüssigmedium in ein 2 ml- Reaktionsgefäß gegeben und 6 - 8 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Kipp-Schüttler inkubiert. Von den beginnende Verpaarung gebildeten Zellaggregaten wurden etwa 20 µl auf Selektionsmedium (Selektion auf Eigenschaften beider Stämme) ausplattiert und bei 30 °C ÜN inkubiert

Ansatz zur Sporulation von Hefezellen:

Zellen aus einer YPD-ÜN-Kultur des diploiden Stammes wurden in 2 ml Pre-sporulationsmedium (PSPO) bei 30 °C für 6 - 8 h inkubiert. Es folgte das Pelletieren und Waschen der Zellen 2x mit Wasser, 2x mit Sporulations (SPO) -Medium. Nach Aufnahme der Zellen in 2 ml SPO-Medium wurden die Kulturen 2-3 Tage bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Die Sporulation wurde im Durchlichtmikroskop (100-fache Vergrößerung, Verwendung von Immersionsöl) kontrolliert. Bei guter Sporulationsrate wurden die Zellen pelletiert und in 1 ml SED aufgenommen.

Protoplastierung der Tetraden zur Tetradenanalyse:

200 µl der sporulierten Hefen in SED wurden mit 10 µl 1M DTT und 20 µl 10 mg/ml Novozym234 oder Zymolyase versetzt und für 20-30 min bei RT inkubiert. Nach dem Ausstreichen einer geringen Menge protoplastierter Zellen auf einer YPD- Platte, konnten die 4 Sporen einer Tetrade mit Hilfe eines Mikromanipulators, für die spätere Analyse der neuen Kombination an Eigenschaften der Sporen, auf einer YPD-Platte separiert werden.

PSPO: 0,8 % Bacto-yeast extract, 0,3% Bacto-peptone, 10% Glukose

SPO: 1 % KAc, 0,1 % Bacto-yeast extract, 0,05 % Glukose

SED: 36,4 g Sorbit, 10 ml 0,5 M EDTA auf 200 ml

Durch Auswertung des Tetradenwachstums auf Platten mit entsprechendem SD-Selektionsmedium wurden die genetischen Eigenschaften der haploiden Hefezellen ermittelt. Die Rekombination bestimmter Eigenschaften der verpaarten Hefen wurde darüberhinaus durch eine Analyse der synthetisierten Proteine in den Zellen mittels SDS-PAGE und Immunoblotting des Zellysats bestätigt.

4.18 Pulse-Chase-Experiment

Im Allgemeinen wurden die Pulse-Chase-Experimente wie in Biederer et al. 1996 [88] beschrieben, durchgeführt. Äquivalente Mengen von exponentiell in SD-Medium wachsenden Zellen wurden mit einem Mix aus ³⁵S radioaktiv markierten Methionin und Cystein (80 µCi / 10 OD₆₀₀ Zellen) versetzt und 5-12 min bei 30 °C inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in SD-Medium aufgenommen, dem 3.3 mM (NH₄)₃SO₄, 0.013% Methionin und 0.01% Cystein (nicht radioaktiv markiert) zugefügt war. In Versuchen mit Kupfersulfat-induzierter Überexpression von Genen enthielt dieses "Chase"-Medium darüberhinaus 100 µM CuSO₄. Nach angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots der Zellsuspension entnommen und die Zellen in 100 µl Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% SDS, 1 mM PMSF) mit Hilfe von Glaskugeln lysiert. Nach Zugabe von 900 µl Verdünnungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 11% Triton X-100, 165 mM NaCl, 5,5 mM EDTA, 1 mM PMSF) und Zentrifugation zur Abtrennung ungelöster Zellbestandteile, wurde der Überstand der Proben mit ProteinA-SepharoseTM 4FastFlow (GE-Healthcare) und Antikörpern zur Immunpräzipitation des zu betrachtenden Proteins versetzt. Es folgte die ÜN-Inkubation der Proben bei 4° C und anschließendes Waschen der SepharoseTM (1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA). Präzipitierte glykosylierte Proteine wurden durch Zugabe von 8 U/µl N-Glycosidase-F in 10 µl IP-Puffer

0.02% SDS (1 % Triton X-100, 0,02 % SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA) und 1 % β -Mercaptoethanol bei 37°C für 1 h deglykosyliert. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Autoradiographie.

4.19 Cycloheximid-Abbau-Experiment

Gleiche Mengen exponentiell wachsender Zellen wurden pelletiert und in YPD oder SD-Selektionsmedium resuspendiert, welches 0,3 mg/ml Cycloheximid enthielt. Inkubation der Zellen bei 30 °C. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden den Kulturen Teilmengen entnommen und die Zellen in 100 μ l 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 % SDS mit Hilfe von Glaskugeln aufgeschlossen. Nach Zugabe von 100 μ l SDS-Probenpuffer und dem Erhitzen der Proben, wurde der Überstand nach Zentrifugation per SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

4.20 Immunpräzipitation von 13xmyc-Doa10- bzw. 13xmyc-Doa10 C(93)S

Pro Stamm wurden 50-80 OD₆₀₀ exponentiell wachsender Hefezellen pelletiert, mit 10 mM NaN₃ gewaschen und in 500 – 800 μ l Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH7,5, 200 mM NaAc, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) mit Hilfe von Glaskugeln lysiert. Nach Zugabe weiterer 2 ml Aufschlusspuffer wurden zunächst größere Zellbestandteile und Glaskugeln abzentrifugiert und aus dem Überstand (2 ml) bei 21000 x g die Zellmembranen pelletiert. Die Resuspension und Solubilisierung der Membranen erfolgte in 500 μ l Solubilisierungspuffer (50 mM Tris-HCl pH7,5, 200 mM NaAc, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 % Digitonin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) für 1 h bei 4 °C. Nach erneuter Zentrifugation wurden 35 μ l als Kontrolle des eingesetzten Materials abgenommen, der restliche Überstand wurde mit 470 μ l Aufschlusspuffer (ohne DTT) sowie ProteinA-SepharoseTM4FastFlow und α -myc-Antikörper (SIGMA, M5546) versetzt. ÜN- Inkubation bei 4 °C mit anschließendem Waschen der SepharoseTM (50 mM Tris-HCl pH7,5, 200 mM NaAc, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 0,5 % Digitonin) und Elution der präzipitierten Protein durch Zugabe von Harnstoff-Probenpuffer Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblotting.

4.21 Immunpräzipitation von 6xHA-Hrd3

Der Vorgang der Probenaufarbeitung entspricht im Wesentlichen dem der Immunpräzipitation von 13xmyc-Doa10, jedoch unter Verwendung veränderter Pufferlösungen und Antikörper.

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris-HCl pH7,5, 200 mM NaAc, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF

Solubilisierungspuffer: 50 mM Tris-HCl pH7,5, 200 mM NaAc, 2,5 mM MgCl₂, 1 % Nonidet P40, 10 % Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF

Waschpuffer: 50 mM Tris-HCl pH7,5, 200 mM NaAc, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % Nonidet P40, 10 % Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF

Antikörper zur Präzipitation von 6xHA-Hrd3: α -HA (SIGMA, H9658)

4.22 Immunpräzipitation von ubiquitiniertem Deg1- β Gal

Expression des Deg1- β Gal durch Induktion mit 100 μ M CuSO₄. Aufschluss von 50 OD₆₀₀ Zellen in 700 μ l Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH7,5, 4 M Harnstoff, 0,3 % SDS, 1 mM PMSF, 20 mM NEM) durch Glaskugelaufschluss. Zugabe von 700 μ l Verdünnungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,1% Triton X-100, 165 mM NaCl, 5,5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 mM NEM) Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 21000 x g wurde der Überstand mit 500 μ l Verdünnungspuffer sowie 20 μ l ProteinA-SepharoseTM (GE Healthcare) und 1 μ l monoklonalem GFP-Antikörper (BD Living Colors) versetzt und ÜN bei 4 °C schwenkend inkubiert. Nach dem Waschen der Sepharose wurden die Proteine durch Zugabe von Harnstoff-Probenpuffer und Erhitzen bei 50 °C eluiert. Es folgte die Analyse der Proben durch SDS-PAGE und Immunoblotting.

4.23 Verwendete Antikörper

Antikörper, gerichtet gegen	Referenz	monoklonal/ polyklonal
Ubiquitin	Enzo Lifesciences, UG9510	polyklonal
Flag	SIGMA, F3165	monoklonal
myc	SIGMA, M5546	monoklonal
HA	SIGMA, H9658	monoklonal
GST	Rockland	polyklonal
penta-His	QIAGEN, 34660	monoklonal
GFP	BD Living Colors, JL-8	monoklonal
GFP	Invitrogen, A6455	polyklonal
beta-Galaktosidase	Promega, Z378B	monoklonal
Ubc6	Walter et al., 2001 [85]	polyklonal
Ubc7	Neuber et al., 2005 [51]	polyklonal
Cue1	Biederer et al., 1997 [89]	polyklonal
Doa10	Frühere Studien	polyklonal
Hrd1	Horn et al., 2009 [36]	polyklonal
Ubx2	Neuber et al., 2005 [51]	polyklonal
Cdc48	Neuber et al., 2005 [51]	polyklonal
Sec61	Biederer et al., 1997 [89]	polyklonal
PGK1	Molecular Probes, A6457	monoklonal
CPY	Invitrogen, A6428	monoklonal
Maus-IgG, HRP-konjugiert	SIGMA, A9044	polyklonal
Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert	SIGMA, A0545	polyklonal
Ziege-IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, sc-2020	polyklonal

4.24 Hefestämme

Hefestämme			
Hefe-Stamm	Genotyp	Mat	generiert für
YTX140	<u>prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	a	Biederer et al., 1997
YTX141	<u>Δcue1::HIS3, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	Biederer et al., 1997
YTX949	<u>prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX996	<u>Δubc6::HIS, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX190	<u>Δubc7::LEU2, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	Friedlander et al., 2000
YTX997	<u>Δubc6::HIS3, Δubc7::LEU2, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX951	<u>Δdoa10::HIS3, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX465	<u>Doa10-13xMyc(TRP1), prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	a	Diplomarbeit Katrin Bagola
YTX467	<u>Doa10-13Myc(TRP1), Δubc7::LEU2, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112,</u>	alpha	Diplomarbeit Katrin Bagola
YTX938	<u>Doa10-13xMyc:TRP, prc1-1, Δubc6::HIS3, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	a	diese Studie
YON26	<u>DOA10C93S-13xMyc(HIS3), trp1-1(am), ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	Doktorarbeit Oliver Neuber
YTX993	<u>DOA10C93S-13xMyc(HIS3), Δubc7::LEU2, trp1-1(am), ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	a	diese Studie
YTX1020	<u>DOA10C93S-13xMyc(HIS3), Δubc6::HIS3, trp1-1(am), ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX1021	<u>DOA10C93S-13xMyc(HIS3), Δubc6::HIS3, Δubc7::LEU2 trp1-1(am), ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	a	diese Studie
YTX954	<u>rpt4R, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX956	<u>Δubc6::TRP1, rpt4R, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX966	<u>Δubc7::LEU2, rpt4R, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX999	<u>Δubc7::LEU2, Δubc6::HIS, rpt4R, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX959	<u>Δdoa10::HIS3, rpt4R, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX736	<u>URA3:UBC7, Δubc7::LEU2, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX737	<u>URA3:UBC7Δal, Δubc7::LEU2, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX738	<u>URA3:UBC7D2, Δubc7::LEU2, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YTX739	<u>URA3:ubc7C(89)S, Δubc7::LEU2, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</u>	alpha	diese Studie
YRG131	<u>6xHA-HRD3, Δubc7::LEU2, prc1-1, trp1-1(am), his3-Δ200, leu2-3,-112, lys2-801, ura3-52</u>	a	Doktorarbeit Robert Gauss

4.25 Plasmid-DNA

Plasmide			
Plasmid	Vektor	Insertion	generiert für
pTX352	pQE60	Ubc6ΔTM; bp +1 bis +690 (NcoI, BamHI), mit C-terminaler His ₆ -Fusion	diese Studie
pTX401	pQE60	Ubc6ΔTM C(87)S wie pTX352, aber mit Mutation von TGC (bp +259 bis +261) nach TCC	diese Studie
pTX008	pSEY8	UBC6 (endogene HindIII-Schnittstellen)	Labor Prof. Sommer
pJU285	pRS425	UBC6, bp -376 bis +965	Labor Prof. Sommer
pJU267	pRS426	CUE1, UBC7	Labor Prof. Sommer
pJU379	pRS425	CUE1, UBC7	Labor Prof. Sommer
pJU220	pRS426	UBC6, CUE1, UBC7	Labor Prof. Sommer
pJU287	pRS425	UBC6, CUE1, UBC7	Labor Prof. Sommer
pTX397	pRS415	Cue1; bp -450 bis +609 (XhoI, NotI)	diese Studie
pTX386	pRS415	Cue1RGA; wie pTX397, aber Mutation von CTAGCCCCCT (bp +226 bis +234) nach CGAGGCGCT	diese Studie
pTX387	pRS415	Cue1ΔLAP; wie pTX397, aber Deletion von CTAGCCCCCT (bp +226 bis +234)	diese Studie
pTX398	pRS415	Cue1ΔCUE; wie pTX397, aber Deletion von bp +193 bis +318	diese Studie
pTX388	pRS415	Cue1LL(179,180)SS; wie pTX397, aber Mutation von TTGTTG (bp +535 bis +540) nach TCGTCCG	diese Studie
pSH008	pGex6P1	Cue1ΔTM; bp +70 bis +609 (BamHI, Sall); mit N-terminaler GST-Fusion	diese Studie
pSH004	pGex6P1	Cue1-115; bp +70 bis +345 (BamHI, Sall), mit N-terminaler GST-Fusion	diese Studie
pSH010	pGex6P1	Cue1-174; bp +70 bis +522 (BamHI, Sall), mit N-terminaler GST-Fusion	diese Studie
pSH014	pGex6P1	Cue1CUE; bp +192 bis +318 (BamHI, Sall), mit N-terminaler GST-Fusion	diese Studie
pSH019	pGex6P1	Cue1RGA; wie pSH008, aber Mutation von CTAGCCCCCT (bp +226 bis +234) nach CGAGGCGCT	diese Studie
pSH020	pGex6P1	Cue1ΔLAP; wie pSH008, aber Deletion von CTAGCCCCCT (bp +226 bis +234)	diese Studie
pTX349	pGex6P1	Cue1ΔCUE; wie pSH008, aber Deletion von bp +193 bis +318	diese Studie
pTX355	pGex6P1	Cue1LL(179,180)SS; wie pSH008, aber Mutation von TTGTTG (bp +535 bis +540) nach TCGTCCG	diese Studie
pTX371	pQE60	Cue1ΔTM; bp +70 bis +609 (NcoI, BamHI), mit C-terminaler His ₆ -Fusion	diese Studie
pSH006	pGex6P1	UBA-Dsk2; bp +723 bis +1119 (BamHI, Sall), mit N-terminaler GST-Fusion	diese Studie
pTX338	pRS414	PrA*; mutierte Form der ProteinaseA (XhoI, NotI) aus pES163	Kim et al., 2005
pUL 063	pQE70	Deg1-cNLS-GFP-GFP-His ₆	Labor Prof. Sommer
pUL 067	pQE70	Deg1-cNLS-GFP-GFP-Ub-His ₆	Labor Prof. Sommer
pUL 028	pRS426	Deg1-GFP-GFP; unter CUP1-Promotor	Lenk et al., 2000
pLU068	pRS426	Deg1-beta-Gal	Labor Prof. Sommer

Plasmide			
Plasmid	Vektor	Insertion	generiert für
pRH244		Hmg2; intern verkürzt und mit 6xmyc epitopmarkiert, unter GAPDH-Promotor	Hampton et al., 1996
pTX224	pRS416	Ubc7; bp -163 bis +639 (EcoRI, XhoI)	diese Studie
pTX225	pRS416	Ubc7 Δ al; wie pTX224, aber Deletion von bp +289 bis +324	diese Studie
pTX230	pRS416	Ubc7D2; wie pTX224, aber Mutation von GATGAT (bp +292 bis +297) nach GCTGCT	diese Studie
pTX293	pRS416	Ubc7E2; wie pTX224, aber Mutation von GAAGAA (bp +319 bis +324) nach GCAGCA	diese Studie
pTX294	pRS416	Ubc7D2E2; wie pTX224, aber Mutationen aus pTX230 und pTX293	diese Studie
pTX295	pRS416	Ubc7N(81)S; wie pTX224, aber Mutation von AAT (bp +241 bis +243) nach AGT	diese Studie
pTX296	pRS416	Ubc7C(89)S; wie pTX224, aber Mutation von TGC (bp +264 bis +267) nach TCC	diese Studie
pTX249	pGex6P1	Ubc7; bp +1 bis +495 (BamHI, XhoI), mit N-terminaler GST-Fusion	diese Studie
pTX250	pGex6P1	Ubc7 Δ al; wie pTX249, aber Deletion von bp +289 bis +324	diese Studie
pTX274	pGex6P1	Ubc7D2; wie pTX249, aber Mutation von GATGAT (bp +292 bis +297) nach GCTGCT	diese Studie
pTX275	pGex6P1	Ubc7D2E2; wie pTX249, aber Mutationen aus pTX294	diese Studie
pTX251	pGex6P1	Ubc7C(89)S; wie pTX249, aber Mutation von TGC (bp +264 bis +267) nach TCC	diese Studie
pTX315	pGex6P1	Hrd1; C-terminales Fragment mit RING-Domäne, bp +973 bis +1653, N-terminale GST-Fusion	diese Studie
pTX327	pGex6P1	Doa10; N-terminales Fragment mit RING-Domäne, bp +1 bis +375, N-terminale GST-Fusion	diese Studie
pUb39	YEp46	Ub; CUP1-Promotor, LYS-Selektionsmarker (statt TRP)	
pUb192	YEp46	Ub K6R; CUP1-Promotor, LYS-Selektionsmarker (statt TRP)	
pUb193	YEp46	Ub K11R; CUP1-Promotor, LYS-Selektionsmarker (statt TRP)	
pUb195	YEp46	Ub K27R; CUP1-Promotor, LYS-Selektionsmarker (statt TRP)	
pUb115	YEp46	Ub K48R; CUP1-Promotor, LYS-Selektionsmarker (statt TRP)	
pUb197	YEp46	Ub K63R; CUP1-Promotor, LYS-Selektionsmarker (statt TRP)	bereitgestellt von
pTX357		Ub; N-terminal epitopmarkiert mit RGS-8xHis, ADH1-Promotor, LEU-Selektionsmarker	M. Glickman,
pTX358		Ub K6 only; N-terminal epitopmarkiert mit RGS-8xHis, ADH1-Promotor, LEU-Selektionsmarker, 2 μ	Technion Haifa
pTX359		Ub K11 only; N-terminal epitopmarkiert mit RGS-8xHis, ADH1-Promotor, LEU-Selektionsmarker, 2 μ	
pTX 360		Ub K27 only; N-terminal epitopmarkiert mit RGS-8xHis, ADH1-Promotor, LEU-Selektionsmarker, 2 μ	
pTX363		Ub K48 only; N-terminal epitopmarkiert mit RGS-8xHis, ADH1-Promotor, LEU-Selektionsmarker, 2 μ	
pTX364		Ub K63 only; N-terminal epitopmarkiert mit RGS-8xHis, ADH1-Promotor, LEU-Selektionsmarker, 2 μ	
pTX402		p414MET25-Deg1-Vma12-PrA	Ravid et al., 2006

4.26 Oligonukleotide

Oligonukleotide				
Oligonukleotid	Ziel-Gen	Sequenz	Beschreibung	f / r
KB25	Cue1	GAAACAGTGCAAAAATCGAGCGCTAACTTACATCCTGAGC	Cue1RGA (bp +226 bis +234)	f
KB26	Cue1	GCTCAGGATGTAAGTTAGCGCCTCGATTTGCACCTGTTTC	Cue1RGA (bp +226 bis +234)	r
GSTCue1 CUE-LAP FW	Cue1	GTGGAACACAGTGCAAAAAT AACTTACATCCTGAGCAAAATTAGG	Cue1 Δ LAP (bp +226 bis +234)	f
GSTCue1 CUE-LAP REV	Cue1	CCTAAATTTGCTCAGGATGTAAGTTATTTTGCACACTGTTTTCCA C	Cue1 Δ LAP (bp +226 bis +234)	r
NtermCue1 E.coli FW- BamH1	Cue1	AAAGGATCCATG CAAAGTAATCAGCATCCCTCAG	Amplifikation von Cue1 ab bp +70, BamHI	f
NtermCue1 E.coli REV- Sal1	Cue1	AAAGTCGACTCAAGTCAGCAAACTTTGC	Amplifikation von Cue1 bis bp +609, SalI	r
3-Cue1-115-Sal1	Cue1	AAAGTCGACTCA CTAACAAACCCAGGTGGAAGC	Amplifikation von Cue1 bis bp +445, SalI	r
GSTCUE 65-106 FW	Cue1	AAAGGATCCATG GTGACTACTCAGATGTTGGA	Amplifikation von Cue1 ab bp +193, BamHI	f
GSTCUE 65-106 REV	Cue1	AAAGTCGACTCAATCACCACGCCAAGTACCT	Amplifikation von Cue1 bis bp +318, SalI	r
Cue1 Δ CUE rev	Cue1	GGGGTGACCTCCATTGAC	Deletion der CUE-Domäne	r
Cue1 Δ CUE fw+OL	Cue1	GGAGGTCACCCCGAATTCAGCTTTCCA	Deletion der CUE-Domäne	f
Cue1L179,180Sfw	Cue1	AGAAAGAGATCGTCGGTTTGCCAA	Cue1 LL(179,180)SS	f
Cue1L179,180Srev	Cue1	TTGCCAAACCCAGCATCTCTTCT	Cue1 LL(179,180)SS	r
Cue1 5'Xhofw	Cue1	AAACTCGAGGGGTAGCTGTCCGCCCAT	Aplifikation von Cue1 ab bp -150, XhoI	f
Cue1 Notrev	Cue1	AAAGCGGCCGCTCAAGTCAGCAAACTTTGCCAA	Aplifikation von Cue1 bis bp +609, NotI	r
KB48	Doa10	AAAGAATTCATGGATGTTGATTCT	Amplifikation von Doa10 ab bp +1, EcoRI	f
KB51	Doa10	AAAGTCGACGAAAAAATGTCAAGAT	Amplifikation von Doa10 bis bp +375, SalI	r
UBADsk2 E.coli FW- BamH1	Dsk2	AAAGGATCCATG GCGATGCTCCAGAGGA	Amplifikation der UBA-Domäne von Dsk2, BamHI	f
UBADsk2 E.coli REV- Sal1	Dsk2	AAAGTCGACTTAAACATCGCGGTTTCAGTAGTG	Amplifikation der UBA-Domäne von Dsk2, SalI	r
KB65	Hrd1	AAAGGATCCAAACAGCTCGACGACACTCTT	Amplifikation von Hrd1 ab bp +973, BamHI	f
KB67	Hrd1	AAAGCGCCCGGATATGCTGGATAAATTTATCTGG	Amplifikation von Hrd1 bis bp +1653, NotI	r
Ubc6 F1	Ubc6	CTAAAACCGCATTCGCAAATTCGCAAAACAAAGTACGTACAAT AGTA CGGATCCCCGGTTAATTA	Deletion von Ubc6 nach Longtime et al., 1998	f
Ubc6R2	Ubc6	CTGTGTTGTCAAAATTTATCTAAAAGTTTAGTTTCATTTAATGG CT GAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Deletion von Ubc6 nach Longtime et al., 1998	r
KB153F	Ubc6	AAACCATGGCTACAAAGCAGGCTCAC	Amplifikation von Ubc6 ab bp +1, NcoI	f
KB154	Ubc6	AAAGGATCCACTATCATTAGGTTCTTTG	Amplifikation von Ubc6 ab bp +690, BamHI	r

Oligonukleotide				
Oligonukleotid	Ziel-Gen	Sequenz	Beschreibung	f / r
Ubc6C87Sfw	Ubc6	CCCAACACACGATTAAGCCCTTCTATGAGTGAT	Ubc6 C(87)S	f
Ubc6C87Srev	Ubc6	ATCACTCATAGAAAAGGCTTAATCGTGTGTTGGG	Ubc6 C(87)S	r
KB21	Ubc7	CAGCTTATTGCTCGAGATCC	Amplifikation von Ubc7 ab bp -167; XhoI	f
KB24	Ubc7	GGAATGGTTTGAATTCCTGA	Amplifikation von Ubc7 bis bp +640; EcoRI	r
KB21	Ubc7	CAGCTTATTGCTCGAGATCC	Amplifikation von Ubc7 ab bp -167; XhoI	f
KB24	Ubc7	GGAATGGTTTGAATTCCTGA	Amplifikation von Ubc7 bis bp +640; EcoRI	r
KB22	Ubc7	TTCACACTTTGCACTGGCGACCATCTAGGGGAGTGTAGA ATGGATAT	Deletion der sauren Schleife	r
KB23	Ubc7	AGATGGTCGCCAGTGCAAA	Deletion der sauren Schleife	f
KB27	Ubc7	AAAGGATCCATGTCGAAAACCCGCTCAGAAA	Amplifikation von Ubc7 ab bp +1, BamHI	f
KB28	Ubc7	AAACTCGAGTCAGAAATCCTAATGATTTCAAAAT	Amplifikation von Ubc7 bis bp +495, XhoI	r
KB29	Ubc7	CTCCCTGGTGTCTGCTCCTAACATGTAC	Ubc7D2-Mutante (bp +292 bis 297)	f
KB30	Ubc7	GTACATGTTAGGAGCAGCACCAGGGGAG	Ubc7D2-Mutante (bp +292 bis 297)	r
KB31	Ubc7	TACGAATTAGCGGCAGCAAGATGGTCGCCA	Ubc7E2-Mutante (bp +319 bis 324)	f
KB32	Ubc7	TGGCGACCATCTTGCTGCCGCTAATTCGTA	Ubc7E2-Mutante (bp +319 bis 324)	r
KB36	Ubc7	ACTACATCCAAGTATTATCC	Ubc7 N(81)S	f
KB37	Ubc7	GGATAAATACTTGGATGTAGT	Ubc7 N(81)S	r
KB56	Ubc7	TGGGGAAGTGTCATATCCATTC	Ubc7 C(89)S	f
KB57	Ubc7	GAATGGATATGGACACTTCCCCA	Ubc7 C(89)S	r

Literaturverzeichnis

- [1] Voges, D.; Zwickl, P. und Baumeister, W. (1999): The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu Rev Biochem* (Band 68), Seite 1015-68
- [2] Ye, Y. und Rape, M. (2009): Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 10), Nr. 11, Seite 755-64
- [3] Weissman, A. M. (2001): Themes and variations on ubiquitylation, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 2), Nr. 3, Seite 169-78
- [4] Pickart, C. M. (2001): Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu Rev Biochem* (Band 70), Seite 503-33
- [5] Ozkan, E.; Yu, H. und Deisenhofer, J. (2005): Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 102), Nr. 52, Seite 18890-5
- [6] Das, R.; Mariano, J.; Tsai, Y. C.; Kalathur, R. C.; Kostova, Z.; Li, J.; Tarasov, S. G.; McFeeters, R. L.; Altieri, A. S.; Ji, X.; Byrd, R. A. und Weissman, A. M. (2009): Allosteric activation of E2-RING finger-mediated ubiquitylation by a structurally defined specific E2-binding region of gp78, *Mol Cell* (Band 34), Nr. 6, Seite 674-85
- [7] Clague, M. J. und Urbe, S. (2006): Endocytosis: the DUB version, *Trends Cell Biol* (Band 16), Nr. 11, Seite 551-9
- [8] Hicke, L. (2001): Protein regulation by monoubiquitin, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 2), Nr. 3, Seite 195-201
- [9] Petroski, M. D. und Deshaies, R. J. (2005): Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34, *Cell* (Band 123), Nr. 6, Seite 1107-20
- [10] Eddins, M. J.; Carlile, C. M.; Gomez, K. M.; Pickart, C. M. und Wolberger, C. (2006): Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation, *Nat Struct Mol Biol* (Band 13), Nr. 10, Seite 915-20
- [11] Jin, L.; Williamson, A.; Banerjee, S.; Philipp, I. und Rape, M. (2008): Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex, *Cell* (Band 133), Nr. 4, Seite 653-65
- [12] Hoppe, T. (2005): Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all, *Trends Biochem Sci* (Band 30), Nr. 4, Seite 183-7
- [13] Koegl, M.; Hoppe, T.; Schlenker, S.; Ulrich, H. D.; Mayer, T. U. und Jentsch, S. (1999): A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly, *Cell* (Band 96), Nr. 5, Seite 635-44
- [14] Tu, D.; Li, W.; Ye, Y. und Brunger, A. T. (2007): Structure and function of the yeast U-box-containing ubiquitin ligase Ufd2p, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 104), Nr. 40, Seite 15599-606
- [15] Pickart, C. M. und Fushman, D. (2004): Polyubiquitin chains: polymeric protein signals, *Curr Opin Chem Biol* (Band 8), Nr. 6, Seite 610-6
- [16] Thrower, J. S.; Hoffman, L.; Rechsteiner, M. und Pickart, C. M. (2000): Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal, *EMBO J* (Band 19), Nr. 1, Seite 94-102

- [17] Hofmann, R. M. und Pickart, C. M. (1999): Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair, *Cell* (Band 96), Nr. 5, Seite 645-53
- [18] Jacobson, A. D.; Zhang, N. Y.; Xu, P.; Han, K. J.; Noone, S.; Peng, J. und Liu, C. W. (2009): The lysine 48 and lysine 63 ubiquitin conjugates are processed differently by the 26 s proteasome, *J Biol Chem* (Band 284), Nr. 51, Seite 35485-94
- [19] Xu, P.; Duong, D. M.; Seyfried, N. T.; Cheng, D.; Xie, Y.; Robert, J.; Rush, J.; Hochstrasser, M.; Finley, D. und Peng, J. (2009): Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation, *Cell* (Band 137), Nr. 1, Seite 133-45
- [20] Geisler, S.; Holmstrom, K. M.; Skujat, D.; Fiesel, F. C.; Rothfuss, O. C.; Kahle, P. J. und Springer, W. (2010): PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1, *Nat Cell Biol* (Band 12), Nr. 2, Seite 119-31
- [21] Clague, M. J. und Urbe, S. (2010): Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways, *Cell* (Band 143), Nr. 5, Seite 682-5
- [22] Hurley, J. H.; Lee, S. und Prag, G. (2006): Ubiquitin-binding domains, *Biochem J* (Band 399), Nr. 3, Seite 361-72
- [23] Hicke, L.; Schubert, H. L. und Hill, C. P. (2005): Ubiquitin-binding domains, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 6), Nr. 8, Seite 610-21
- [24] Prag, G.; Misra, S.; Jones, E. A.; Ghirlando, R.; Davies, B. A.; Horazdovsky, B. F. und Hurley, J. H. (2003): Mechanism of ubiquitin recognition by the CUE domain of Vps9p, *Cell* (Band 113), Nr. 5, Seite 609-20
- [25] Kang, R. S.; Daniels, C. M.; Francis, S. A.; Shih, S. C.; Salerno, W. J.; Hicke, L. und Radhakrishnan, I. (2003): Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding, *Cell* (Band 113), Nr. 5, Seite 621-30
- [26] Klapisz, E.; Sorokina, I.; Lemeer, S.; Pijnenburg, M.; Verkleij, A. J. und van Bergen en Henegouwen, P. M. (2002): A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 34, Seite 30746-53
- [27] Polo, S.; Sigismund, S.; Faretta, M.; Guidi, M.; Capua, M. R.; Bossi, G.; Chen, H.; De Camilli, P. und Di Fiore, P. P. (2002): A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins, *Nature* (Band 416), Nr. 6879, Seite 451-5
- [28] Hoeller, D.; Crosetto, N.; Blagoev, B.; Raiborg, C.; Tikkanen, R.; Wagner, S.; Kowanetz, K.; Breitling, R.; Mann, M.; Stenmark, H. und Dikic, I. (2006): Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination, *Nat Cell Biol* (Band 8), Nr. 2, Seite 163-9
- [29] Ikeda, F.; Crosetto, N. und Dikic, I. (2010): What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling?, *Cell* (Band 143), Nr. 5, Seite 677-81
- [30] Kanayama, A.; Seth, R. B.; Sun, L.; Ea, C. K.; Hong, M.; Shaito, A.; Chiu, Y. H.; Deng, L. und Chen, Z. J. (2004): TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains, *Mol Cell* (Band 15), Nr. 4, Seite 535-48
- [31] Seibenhener, M. L.; Babu, J. R.; Geetha, T.; Wong, H. C.; Krishna, N. R. und Wooten, M. W. (2004): Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation, *Mol Cell Biol* (Band 24), Nr. 18, Seite 8055-68

- [32] Raasi, S.; Varadan, R.; Fushman, D. und Pickart, C. M. (2005): Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains, *Nat Struct Mol Biol* (Band 12), Nr. 8, Seite 708-14
- [33] Sasaki, T.; Funakoshi, M.; Endicott, J. A. und Kobayashi, H. (2005): Budding yeast Dsk2 protein forms a homodimer via its C-terminal UBA domain, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 336), Nr. 2, Seite 530-5
- [34] Bays, N. W.; Gardner, R. G.; Seelig, L. P.; Joazeiro, C. A. und Hampton, R. Y. (2001): Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation, *Nat Cell Biol* (Band 3), Nr. 1, Seite 24-9
- [35] Deak, P. M. und Wolf, D. H. (2001): Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 14, Seite 10663-9
- [36] Horn, S. C.; Hanna, J.; Hirsch, C.; Volkwein, C.; Schutz, A.; Heinemann, U.; Sommer, T. und Jarosch, E. (2009): Usa1 functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase, *Mol Cell* (Band 36), Nr. 5, Seite 782-93
- [37] Carvalho, P.; Goder, V. und Rapoport, T. A. (2006): Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins, *Cell* (Band 126), Nr. 2, Seite 361-73
- [38] Taxis, C.; Hitt, R.; Park, S. H.; Deak, P. M.; Kostova, Z. und Wolf, D. H. (2003): Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 38, Seite 35903-13
- [39] Vashist, S. und Ng, D. T. (2004): Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control, *J Cell Biol* (Band 165), Nr. 1, Seite 41-52
- [40] Swanson, R.; Locher, M. und Hochstrasser, M. (2001): A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation, *Genes Dev* (Band 15), Nr. 20, Seite 2660-74
- [41] Kreft, S. G.; Wang, L. und Hochstrasser, M. (2006): Membrane topology of the yeast endoplasmic reticulum-localized ubiquitin ligase Doa10 and comparison with its human ortholog TEB4 (MARCH-VI), *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 8, Seite 4646-53
- [42] Deng, M. und Hochstrasser, M. (2006): Spatially regulated ubiquitin ligation by an ER/nuclear membrane ligase, *Nature* (Band 443), Nr. 7113, Seite 827-31
- [43] Ravid, T. und Hochstrasser, M. (2007): Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue, *Nat Cell Biol* (Band 9), Nr. 4, Seite 422-7
- [44] Cook, W. J.; Martin, P. D.; Edwards, B. F.; Yamazaki, R. K. und Chau, V. (1997): Crystal structure of a class I ubiquitin conjugating enzyme (Ubc7) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.9 angstroms resolution, *Biochemistry* (Band 36), Nr. 7, Seite 1621-7
- [45] Shih, S. C.; Prag, G.; Francis, S. A.; Sutanto, M. A.; Hurley, J. H. und Hicke, L. (2003): A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain, *EMBO J* (Band 22), Nr. 6, Seite 1273-81
- [46] Friedlander, R.; Jarosch, E.; Urban, J.; Volkwein, C. und Sommer, T. (2000): A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response, *Nat Cell Biol* (Band 2), Nr. 7, Seite 379-84

- [47] Lenk, U. und Sommer, T. (2000): Ubiquitin-mediated proteolysis of a short-lived regulatory protein depends on its cellular localization, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 50, Seite 39403-10
- [48] Ravid, T.; Kreft, S. G. und Hochstrasser, M. (2006): Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways, *EMBO J* (Band 25), Nr. 3, Seite 533-43
- [49] Chen, P.; Johnson, P.; Sommer, T.; Jentsch, S. und Hochstrasser, M. (1993): Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor, *Cell* (Band 74), Nr. 2, Seite 357-69
- [50] Schuberth, C.; Richly, H.; Rumpf, S. und Buchberger, A. (2004): Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation, *EMBO Rep* (Band 5), Nr. 8, Seite 818-24
- [51] Neuber, O.; Jarosch, E.; Volkwein, C.; Walter, J. und Sommer, T. (2005): Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation, *Nat Cell Biol* (Band 7), Nr. 10, Seite 993-8
- [52] Ye, Y.; Meyer, H. H. und Rapoport, T. A. (2003): Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains, *J Cell Biol* (Band 162), Nr. 1, Seite 71-84
- [53] Park, S.; Isaacson, R.; Kim, H. T.; Silver, P. A. und Wagner, G. (2005): Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites, *Structure* (Band 13), Nr. 7, Seite 995-1005
- [54] Braun, S.; Matuschewski, K.; Rape, M.; Thoms, S. und Jentsch, S. (2002): Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates, *Embo J* (Band 21), Nr. 4, Seite 615-21
- [55] Anne Beskow, Kristian Björk Grimberg, Laura C. Bott, und Florian A. Salomons, Nico P. Dantuma and Patrick Young (2009): A Conserved Unfoldase Activity for the p97 AAA-ATPase in Proteasomal Degradation, *Journal of Molecular Biology* (Band 394), Seite 732-746
- [56] Richly, H.; Rape, M.; Braun, S.; Rumpf, S.; Hoegge, C. und Jentsch, S. (2005): A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting, *Cell* (Band 120), Nr. 1, Seite 73-84
- [57] Travers, K. J.; Patil, C. K.; Wodicka, L.; Lockhart, D. J.; Weissman, J. S. und Walter, P. (2000): Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation, *Cell* (Band 101), Nr. 3, Seite 249-58
- [58] Ron, D. und Walter, P. (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 8), Nr. 7, Seite 519-29
- [59] Gardner, R. G.; Swarbrick, G. M.; Bays, N. W.; Cronin, S. R.; Wilhovsky, S.; Seelig, L.; Kim, C. und Hampton, R. Y. (2000): Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p, *J Cell Biol* (Band 151), Nr. 1, Seite 69-82
- [60] Gauss, R.; Jarosch, E.; Sommer, T. und Hirsch, C. (2006): A complex of Yos9p and the HRD ligase integrates endoplasmic reticulum quality control into the degradation machinery, *Nat Cell Biol* (Band 8), Nr. 8, Seite 849-54

- [61] Denic, V.; Quan, E. M. und Weissman, J. S. (2006): A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation, *Cell* (Band 126), Nr. 2, Seite 349-59
- [62] Sidrauski, C.; Chapman, R. und Walter, P. (1998): The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features, *Trends Cell Biol* (Band 8), Nr. 6, Seite 245-9
- [63] Tsai, Y. C. und Weissman, A. M. (2010): The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer, *Genes Cancer* (Band 1), Nr. 7, Seite 764-778
- [64] Plemper, R. K. und Wolf, D. H. (1999): Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome, *Mol Biol Rep* (Band 26), Nr. 1-2, Seite 125-30
- [65] Schafer, A. und Wolf, D. H. (2009): Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery, *EMBO J* (Band 28), Nr. 19, Seite 2874-84
- [66] Tirosh, B.; Furman, M. H.; Tortorella, D. und Ploegh, H. L. (2003): Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 9, Seite 6664-72
- [67] Fei, W.; Wang, H.; Fu, X.; Bielby, C. und Yang, H. (2009): Conditions of endoplasmic reticulum stress stimulate lipid droplet formation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem J* (Band 424), Nr. 1, Seite 61-7
- [68] Robenek, H.; Buers, I.; Hofnagel, O.; Robenek, M. J.; Troyer, D. und Severs, N. J. (2009): Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis, *Biochim Biophys Acta* (Band 1791), Nr. 6, Seite 408-18
- [69] Li, W.; Tu, D.; Brunger, A. T. und Ye, Y. (2007): A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate, *Nature* (Band 446), Nr. 7133, Seite 333-7
- [70] Eletr, Z. M.; Huang, D. T.; Duda, D. M.; Schulman, B. A. und Kuhlman, B. (2005): E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer, *Nat Struct Mol Biol* (Band 12), Nr. 10, Seite 933-4
- [71] Kleiger, G.; Hao, B.; Mohl, D. A. und Deshaies, R. J. (2009): The acidic tail of the Cdc34 ubiquitin-conjugating enzyme functions in both binding to and catalysis with ubiquitin ligase SCFCdc4, *J Biol Chem* (Band 284), Nr. 52, Seite 36012-23
- [72] Kleiger, G.; Saha, A.; Lewis, S.; Kuhlman, B. und Deshaies, R. J. (2009): Rapid E2-E3 assembly and disassembly enable processive ubiquitylation of cullin-RING ubiquitin ligase substrates, *Cell* (Band 139), Nr. 5, Seite 957-68
- [73] Bazirgan, O. A. und Hampton, R. Y. (2008): Cue1p is an activator of Ubc7p E2 activity in vitro and in vivo, *J Biol Chem* (Band 283), Nr. 19, Seite 12797-810
- [74] Ikeda, F. und Dikic, I. (2008): Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series, *EMBO Rep* (Band 9), Nr. 6, Seite 536-42
- [75] Saeki, Y.; Kudo, T.; Sone, T.; Kikuchi, Y.; Yokosawa, H.; Toh-e, A. und Tanaka, K. (2009): Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome, *EMBO J* (Band 28), Nr. 4, Seite 359-71
- [76] Arai, R.; Yoshikawa, S.; Murayama, K.; Imai, Y.; Takahashi, R.; Shirouzu, M. und Yokoyama, S. (2006): Structure of human ubiquitin-conjugating enzyme

- E2 G2 (UBE2G2/UBC7), *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* (Band 62), Nr. Pt 4, Seite 330-4
- [77] Petroski, M. D.; Kleiger, G. und Deshaies, R. J. (2006): Evaluation of a diffusion-driven mechanism for substrate ubiquitination by the SCF-Cdc34 ubiquitin ligase complex, *Mol Cell* (Band 24), Nr. 4, Seite 523-34
- [78] Chen, B.; Mariano, J.; Tsai, Y. C.; Chan, A. H.; Cohen, M. und Weissman, A. M. (2006): The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 103), Nr. 2, Seite 341-6
- [79] Li, W.; Tu, D.; Li, L.; Wollert, T.; Ghirlando, R.; Brunger, A. T. und Ye, Y. (2009): Mechanistic insights into active site-associated polyubiquitination by the ubiquitin-conjugating enzyme Ube2g2, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 106), Nr. 10, Seite 3722-7
- [80] Lam, Y. A.; Xu, W.; DeMartino, G. N. und Cohen, R. E. (1997): Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome, *Nature* (Band 385), Nr. 6618, Seite 737-40
- [81] Morito, D.; Hirao, K.; Oda, Y.; Hosokawa, N.; Tokunaga, F.; Cyr, D. M.; Tanaka, K.; Iwai, K. und Nagata, K. (2008): Gp78 cooperates with RMA1 in endoplasmic reticulum-associated degradation of CFTRDeltaF508, *Mol Biol Cell* (Band 19), Nr. 4, Seite 1328-36
- [82] Kostova, Z.; Mariano, J.; Scholz, S.; Koenig, C. und Weissman, A. M. (2009): A Ubc7p-binding domain in Cue1p activates ER-associated protein degradation, *J Cell Sci* (Band 122), Nr. Pt 9, Seite 1374-81
- [83] Bazirgan, O. A.; Garza, R. M. und Hampton, R. Y. (2006): Determinants of RING-E2 fidelity for Hrd1p, a membrane-anchored ubiquitin ligase, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 51, Seite 38989-9001
- [84] Kreft, S. G. und Hochstrasser, M. (2011): An unusual transmembrane helix in the endoplasmic reticulum ubiquitin ligase Doa10 modulates degradation of its cognate E2 enzyme, *J Biol Chem* (Band 286), Nr. 23, Seite 20163-74
- [85] Walter, J.; Urban, J.; Volkwein, C. und Sommer, T. (2001): Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p, *Embo J* (Band 20), Nr. 12, Seite 3124-31
- [86] Jarosch, E.; Taxis, C.; Volkwein, C.; Bordallo, J.; Finley, D.; Wolf, D. H. und Sommer, T. (2002): Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48, *Nat Cell Biol* (Band 4), Nr. 2, Seite 134-9
- [87] Carroll, S. M. und Hampton, R. Y. (2010): Usa1p is required for optimal function and regulation of the Hrd1p endoplasmic reticulum-associated degradation ubiquitin ligase, *J Biol Chem* (Band 285), Nr. 8, Seite 5146-56
- [88] Biederer, T.; Volkwein, C. und Sommer, T. (1996): Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway, *Embo J* (Band 15), Nr. 9, Seite 2069-76
- [89] Biederer, T.; Volkwein, C. und Sommer, T. (1997): Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface, *Science* (Band 278), Nr. 5344, Seite 1806-9

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosin-5'monophosphat
ATP	Adenosin-5'triphosphat
BSA	bovine serum albumin
bp	base pairs (Basenpaare)
Brij58	Polyethylenglykol-hexadecylether
DNA	desoxyribunuceic acid
DTT	Dithiotreitol
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
E4	Ubiquitinketten-modifizierendes (-verlängerndes) Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation
GFP	green fluorescent protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Haemagglutinin
HRP	horserdish peroxidase
IB	Immunoblot
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-D-Thiogalaktosid
kb	kilo-Basen (1 kb=1000 bp)
Kd	Dissoziationskonstante
kD	kilo-Dalton
LB	Lysogeny Broth
Mat	mating type
NEM	N-Ethylmaleimid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PCR	polymerase chain reaction
PBS	phosphate-buffered saline
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid

Abkürzungsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SD	Synthetic drop-out
SDS	sodiumdodecylsulfate
TB	Terrific Broth
TBT	Tris buffer with Tween
TCA	Trichloracetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
Ub	Ubiquitin
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp
YPD	yeast extract - peptone - dextrose

Publikationen und Vorträge

Publikationen

1. Bagola, K., and Sommer, T. (2008). **Protein quality control: on IPODs and other JUNQ.** *Curr Biol* 18, R1019-1021.

Abstract: The accumulation of misfolded cytosolic or aggregation-prone proteins leads to cellular stress. To protect the cell, damaged or aggregated proteins are actively sequestered in two newly discovered quality control compartments, JUNQ and IPOD, which are highly conserved in evolution.

2. Bagola, K., Mehnert, M., Jarosch, E., and Sommer, T. (2011). **Protein dislocation from the ER.** *Biochim Biophys Acta* 1808, 925-936.

Abstract: Protein folding within the endoplasmic reticulum (ER) of eukaryotic cells is erroneous and often results in the formation of terminally misfolded species. A quality control system retards such molecules in the ER and eventually initiates their dislocation into the cytosol for proteolysis by 26S proteasomes. This process is termed ER associated protein degradation (ERAD). The spatial separation of ER based quality control and cytosolic proteolysis poses the need for a machinery that promotes the extraction of substrates from the ER. Due to the heterogeneous nature of the client proteins this transport system displays several unique features. Selective recognition of ERAD substrates does not involve transferable transport signals in the primary sequence and thus must follow other principles than established for proteins designated for the import into organelles. Moreover, an ER dislocation system must be capable to ship polypeptides, which may be at least partly folded and are in most cases covalently modified with bulky and hydrophilic glycans, through a membrane without disrupting the integrity of the ER. In this review we present current ideas on the highly dynamic and flexible nature of the dislocation apparatus and speculate on the mechanism that removes aberrant polypeptides from the ER in the course of ERAD. This article is part of a Special Issue entitled Protein translocation across or insertion into membranes.

Vorträge

1. Bagola, K., Sommer, T.: ***In vitro* ubiquitination experiments reveal an important function of Cue1 for Ubc7-dependent ubiquitin chain assembly.**

Tagung der DIP (Deutsch-Israelische-Projektkooperation) 11.-14. April 2011, Haifa, Israel

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich zur Kenntnis genommen.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Titel.

Danksagung

Zunächst möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen des Sommer-Labors für ihr Mitwirken bei der Schaffung einer so angenehmen und freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre danken. Ich habe mich in der Arbeitsgruppe immer sehr wohl gefühlt.

Danken möchte ich vor allem Prof. Dr. Thomas Sommer für die außergewöhnlich gute Betreuung und Unterstützung meiner Doktorarbeit sowie für die zahlreichen kreativen Gedanken und Anregungen zur Gestaltung meines Forschungsprojektes.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Ernst Jarosch und Dr. Christian Hirsch für ihre fortwährende Hilfe bei der Erörterung und Klärung genetischer und biochemischer Fragestellungen sowie für die vielen spannenden und unterhaltsamen Diskussionen.

Gedankt sei auch Corinna Volkwein und Angelika Wittstruck für ihren täglichen Einsatz zur Aufrechterhaltung eines funktionierenden Laboralltages und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung von Pulse-Chase-Experimenten, kniffligen Klonierungen oder bei der Antikörperaufreinigung.

Den Doktoranden Franziska Zimmermann, Holger Brendebach, Sabine Horn, Martin Mehnert, Anett Köhler, Maximilian von Delbrück und Marcel Nowak sei gedankt für den regen Austausch von Gedanken, für die gegenseitige Hilfe bei kleineren oder größeren Problemen, die aufbauenden Worte nach einem misslungenen Experiment und für die vielen gemeinsamen Wartezeiten bei Kaffee oder Tee zwischen den Experimenten.

Für die technische Hilfe bei der Durchführung von massenspektrometrischen Analysen, der Messung von Bindungskinetiken sowie bei der Erarbeitung eines *in vitro* Reaktionssystems möchte ich Dr. Gunnar Dittmar, Florian Mayr und Prof. Dr. Udo Heinemann sowie Prof. Dr. Martin Scheffner danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mir diesen Weg ermöglichte, die stets geduldig und verständnisvoll war, die mich bei meinem Vorhaben unterstützt und mir in schwierigen Phasen den nötigen Rückhalt gegeben hat.