

REGULATION DER TRANSKRIPTION DURCH DAS UBIQUITIN/PROTEASOM- SYSTEM

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für
Biologie, Chemie und Geowissenschaften der
Universität Bayreuth**

**vorgelegt von
Diplom-Biochemiker
Michael Rape**

September 2002

julia und
onkel georg gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen November 1999 und September 2002 unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Teile der Dissertation sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Hoppe T., Matuschewski K., **Rape M.**, Schlenker S., Ulrich H.D., und Jentsch S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577-586.

Rape M., Hoppe T., Gorr I., Kalocay M., Richly H., und Jentsch S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48^{UFD1/NPL4}, a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-677

Braun S., Matuschewski K., **Rape M.**, Thoms S., und Jentsch S. (2002). Role of the ubiquitin-selective CDC48^{UFD1/NPL4} chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J.* 21, 615-621.

Hoppe T., **Rape M.**, und Jentsch S. (2001). Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 344-348.

Rape M., und Jentsch S. (2002). Taking a bite: proteasomal protein processing. *Nature Cell Biol.* 4, E113-116.

Promotionsgesuch eingereicht am 2. Oktober 2002.

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 19. Dezember 2002

Erster Gutachter: Prof. Dr. Christian Lehner

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Stefan Jentsch

Ich möchte mich ganz herzlich bei Stefan Jentsch bedanken, in dessen Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit erstellt wurde. Er hat am hoffentlichen Gelingen dieser Arbeit durch stete Diskussionsbereitschaft, konstruktive Kritik und seinen leicht ansteckenden Enthusiasmus großen Anteil. Er hat mir durch vielerlei Unterstützung eine spannende, abwechslungs- und lehrreiche Doktorarbeitszeit ermöglicht, wofür ich sehr dankbar bin.

Ich möchte mich auch bei Prof. Christian Lehner für die Betreuung meiner Promotion an der Universität Bayreuth und für die Unterstützung für meine postdoktorale Zeit sehr herzlich bedanken.

Die Arbeitsgruppe von Stefan Jentsch ist mittlerweile wohl zu groß, um sich bei jedem Einzelnen zu bedanken. Sollte meine Promotion konstruktiv verlaufen sein, so lag das aber sicher zu keinem kleinen Teil am positiven, manchmal auch etwas verrückten Klima in dieser Arbeitsgruppe. Es macht viel Spaß, dort zu forschen. Besonders zu Dank verpflichtet bin ich unter Vielen Dr. Michael Knop, Dr. Thorsten Hoppe, Dr. Alexander Buchberger, Sigurd Braun, Carsten Höge, Georg Dönges, Holger Richly, Ingo Gorr und Marian Kalocay. Bei Holger Richly möchte ich mich ganz herzlich für viele Kilogramm gereinigter Proteine bedanken. Manuela Kost bin ich für ihre exzellente technische Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Ich möchte mich auch bei der Boehringer-Ingelheim-Stiftung für ihre großzügige Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Die Doktorarbeitszeit birgt viele Besonderheiten. Julia hat meine diesbezüglichen Skurrilitäten nicht nur geduldig ertragen, sondern mich wo immer es ging und wie immer es ging unterstützt. Für all dies möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	2
1. Das Ubiquitin-Konjugationssystem	2
1.1 Eine enzymatische Kaskade steuert die Ubiquitinierung eines Substratproteins	2
1.2 Ubiquitin-Ligasen bestimmen die Substratspezifität der Ubiquitinierung	4
1.3 E4-Enzyme katalysieren die Ausbildung langer Multiubiquitinketten	6
1.4 Ubiquitinierung kann verschiedene Konsequenzen haben	6
2. Das 26S-Proteasom	8
2.1 Das 26S-Proteasom kann Ubiquitinkonjugate erkennen und degradieren	8
2.2 Das 26S-Proteasom kann Proteine prozessieren	9
3. Der OLE-Weg in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
3.1 SPT23 und MGA2 sind membranständige, proteasomal prozessierte Transkriptionsaktivatoren	10
3.2 Der OLE-Weg der Hefe ist streng reguliert	11
Zielsetzung der Arbeit	13
Ergebnisse	14
1. Regulation der SPT23-Prozessierung durch Dimerisierung	14
1.1 SPT23 interagiert direkt mit der Ubiquitin-Ligase RSP5	14
1.2 Die zentrale IPT-Domäne wird für die Dimerisierung und Prozessierung von SPT23 benötigt	16
1.3 Dimerisierung und Prozessierung führen zur Bildung stabiler SPT23 p90/p120-Komplexe	17

2. CDC48 ^{UFD1/NPL4} mobilisiert den prozessierten Transkriptionsfaktor SPT23 p90	20
2.1 UFD1 interagiert mit CDC48 und NPL4	20
2.2 Der CDC48 ^{UFD1/NPL4} -Komplex findet sich im Zytoplasma und an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums	22
2.3 Alle Komponenten des CDC48 ^{UFD1/NPL4} -Komplexes sind Bestandteile des Ubiquitin/Proteasom-Systems	23
2.4 CDC48, UFD1 und NPL4 sind Komponenten des OLE-Wegs	25
2.5 Der CDC48 ^{UFD1/NPL4} -Komplex ist für die Prozessierung von SPT23 nicht essentiell	26
2.6 Der CDC48 ^{UFD1/NPL4} -Komplex ist für die Mobilisierung von prozessiertem SPT23 essentiell	28
3. CDC48 ^{UFD1/NPL4} bindet Ubiquitin	32
3.1 CDC48 ^{UFD1/NPL4} bindet ubiquitinierte Proteine <i>in vivo</i>	32
3.2 CDC48 bindet ubiquitinierte Proteine <i>in vitro</i>	34
3.3 UFD1 und NPL4 regulieren die Bindung von CDC48 an Ubiquitinkonjugate <i>in vivo</i>	35
4. Der CDC48 ^{UFD1/NPL4} -Komplex vermittelt die Bindung des E4-Enzyms UFD2 an Substrate	37
4.1 Die U-Box ist für die UFD2-vermittelte Multiubiquitinierung essentiell	37
4.2 Die Inaktivierung von UFD2 kann Mutationen im CDC48 ^{UFD1/NPL4} -Komplex partiell supprimieren	39
4.3 Substratbeladenes CDC48 rekrutiert das E4-Enzym UFD2	40
4.4 Die Bindung an CDC48 erhöht die Affinität von UFD2 für Substrate	42
4.5 Die inhibierte Bindung an CDC48 führt zur vermehrten Selbstubiquitinierung des E4-Enzyms	43
4.6 CDC48 ^{UFD1/NPL4} reguliert UFD2-vermittelte Multiubiquitinierung	46
5. UFD2 wird für die effiziente Inaktivierung des SPT23 p90 Transkriptionsfaktors benötigt	48
5.1 Die gestörte Interaktion von CDC48 und UFD2 führt zu Mislokalisierung von UFD2	48
5.2 UFD2 bindet prozessiertes SPT23	50
5.3 SPT23 p90 wird proteasomal abgebaut	50
5.4 UFD2 wird für den effizienten Abbau von SPT23 p90 benötigt	52

5.5 Stabilisiertes SPT23 p90 akkumuliert im Zellkern	53
5.6 <i>ufd2</i> -Mutanten sind gegenüber Ölsäure hypersensitiv	54
6. UFD3 wird analog zu UFD2 über CDC48 ^{UFD1/NPL4} reguliert	56
6.1 UFD3 bindet CDC48 in Abhängigkeit von UFD1	56
6.2 Die Lokalisation von UFD3 ist abhängig von funktionellem CDC48 ^{UFD1/NPL4}	57
1.3 UFD3 kann am Abbau des SPT23 p90-Transkriptionsfaktors beteiligt sein	58
Diskussion	60
1. Die Ähnlichkeit der SPT23-Prozessierung zu NF- κ B gibt Hinweise auf den Mechanismus der Prozessierungsreaktion	60
2. CDC48 ^{UFD1/NPL4} wirkt als ubiquitin-selektive Segregase	64
3. CDC48 wirkt als Organisator ubiquitinabhängiger Prozesse	67
4. Der OLE-Weg verdeutlicht die Funktion der Ubiquitinierung in der Transkription	69
Material und Methoden	72
Literaturverzeichnis	86
Abkürzungsverzeichnis	100

Summary

The majority of eukaryotic proteins is degraded by the 26S proteasome after modification with ubiquitin. In a few cases, however, recognition by this protease does not result in complete degradation. Instead, proteins such as the mammalian transcription factor NF- κ B or the related transcription factors SPT23 and MGA2 of *S. cerevisiae*, are only partially degraded or processed.

Initially, the focus of the work was on the mechanism of proteasomal processing of transcription factor SPT23. SPT23 is synthesized as an inactive precursor that is anchored to the membrane of the endoplasmic reticulum (SPT23 p120). After ubiquitination mediated by the ubiquitin ligase RSP5 the precursor is processed into a shortened 90 kDa form by the 26S proteasome. Processing depends on formation of SPT23 homodimers and results in a membrane-associated dimer of an unprocessed precursor and a processed molecule (SPT23 p90). Importantly, SPT23 p90 has retained its ubiquitin modification after the processing reaction. We have identified a chaperone-like enzyme (segregase), CDC48^{UFD1/NPL4}, that is able to unravel membrane-bound SPT23 dimers in an ATP-dependent fashion thereby mobilizing SPT23 p90 for nuclear translocation. Intriguingly, CDC48^{UFD1/NPL4} preferentially recognizes ubiquitinated proteins, and, hence, it is a ubiquitin-selective enzyme.

SPT23 p90 controls transcription of *OLE1* encoding Δ^9 -fatty acid desaturase. We were able to demonstrate that SPT23 p90 is inactivated in the nucleus by proteolysis involving the E4 enzyme UFD2. This factor mediates multiubiquitination of SPT23 p90, thereby triggering its proteasomal degradation. Thus, SPT23 p90 is the first identified physiological substrate of E4 in *S. cerevisiae*. Interestingly, UFD2 is recruited by CDC48 into a ternary complex containing the substrate. In this complex, CDC48 apparently controls the multiubiquitination activity of UFD2.

In summary, the work has revealed a novel mechanism of transcriptional regulation by the ubiquitin/proteasome-system. A key component of this pathway is CDC48^{UFD1/NPL4}, a chaperone-like enzyme that is able to orchestrate ubiquitin-dependent activation and degradation of the transcription factor.

Zusammenfassung

Ein Großteil eukaryontischer Proteine wird nach regulierter Modifikation mit Ubiquitin durch das 26S-Proteasom abgebaut. In wenigen bisher bekannten Fällen wird ein ubiquitiniertes Protein durch diese Protease zwar erkannt, jedoch nur teilweise degradiert. Diese regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung (RUP) wurde bei den Transkriptionsfaktoren NF- κ B aus Säugerzellen sowie SPT23 und MGA2 aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae* beobachtet.

In dieser Arbeit wurde zunächst der Mechanismus der proteasomalen Prozessierung des Transkriptionsfaktors SPT23 analysiert. SPT23 wird als integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Dort wird es durch die Ubiquitin-Ligase RSP5 ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom in eine verkürzte 90kDa-Form prozessiert. Die proteasomale Prozessierung von SPT23 setzt die Ausbildung von Homodimeren voraus und resultiert in einem stabilen Komplex aus Prozessierungssubstrat (SPT23 p90) und Dimerisierungspartner (SPT23 p120). In diesem Komplex liegt SPT23 p90 als monoubiquitiniertes Protein vor und wird so durch die konservierte CDC48^{UFD1/NPL4}-Segregase, die in dieser Arbeit für *S. cerevisiae* beschrieben wurde, erkannt. CDC48^{UFD1/NPL4} entwindet in einer ATP-abhängigen Reaktion den membranständigen Komplex und ermöglicht den Transport von SPT23 p90 in den Zellkern. Interessanterweise erkennt CDC48^{UFD1/NPL4} präferentiell ubiquitinierte Proteine und ist daher ein ubiquitin-selektives Enzym.

SPT23 p90 kontrolliert die Transkription der 9-Fettsäuredesaturase *OLE1*. Es konnte gezeigt werden, daß die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors im Zellkern mit Hilfe des E4-Enzyms UFD2 erfolgt. Dieser Ubiquitinierungsfaktor fördert die Multiubiquitinierung von SPT23 p90 und führt es dem proteasomalen Abbau zu. Mit SPT23 p90 konnte damit das erste natürliche Substrat des E4-Enzyms UFD2 in *S. cerevisiae* identifiziert werden. Interessanterweise wird UFD2 mit dem Substrat und der Segregase CDC48 in einen ternären Komplex rekrutiert. In diesem Komplex kann CDC48 die Aktivität des Multiubiquitinierungsfaktors UFD2 regulieren.

Die beobachteten Reaktionen sind von physiologischer Relevanz. Ist die durch UFD2 vermittelte Inaktivierung von SPT23 p90 gestört, können Zellen die *OLE1*-Transkription in Gegenwart ungesättigter Fettsäuren nicht reprimieren. Diese Produkte der von *OLE1* katalysierten Reaktion sind dadurch für *UFD2*-Deletionsmutanten toxisch.

Die vorgestellten Daten veranschaulichen, wie ein Transkriptionsfaktor mit Hilfe des Ubiquitin/Proteasom-Systems reguliert werden kann. Das bereits synthetisierte Protein kann durch Prozessierung und Mobilisierung schnell aktiviert werden, wobei gleichzeitig die Lebensdauer der aktiven Form begrenzt wird. Dies gibt der Hefezelle die Möglichkeit, sich effizient variablen Umweltbedingungen anzupassen.

Einleitung

Die fehlerfreie Vererbung des genetischen Materials von der Mutter- zur Tochterzelle wird in Eukaryonten durch viele, sich ergänzende Kontrollmechanismen sichergestellt. Wird das Erbmaterial durch Umwelteinflüsse, z.B. durch UV-Licht oder cancerogene Substanzen, geschädigt, arretieren die betroffenen Zellen zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus und verhindern so die möglicherweise fatale Vererbung mutierter DNA. Im Anschluß versuchen mehrere Reparatursysteme, die entstandenen Schäden zu beseitigen. Erweisen sich diese jedoch als irreparabel, eliminiert sich die für die Gesamtheit des Organismus potentiell gefährliche Zelle selbst. Solch komplex miteinander vernetzte Kontrollsysteme sind für den Menschen überlebenswichtig. Mutationen in Genen, die Reparatur- oder Kontrollproteine kodieren, sind die häufigste Ursache von Krebserkrankungen.

Dieses Beispiel verdeutlicht, daß die Zellen eines Organismus auf Signale ihrer Umwelt in angemessener Form reagieren müssen. Nicht mehr benötigte oder beschädigte Enzyme müssen inaktiviert und neue, unter den gegebenen Bedingungen wichtige Faktoren bereitgestellt werden. Die Aktivität eines Proteins kann durch posttranslationale Modifikationen, regulierte intrazelluläre Lokalisation oder spezifische Bindungspartner beeinflusst werden. Zusätzlich wird die Konzentration eines Proteins in der Zelle durch gesteuerte Veränderungen in Synthese- und Abbaurate den Notwendigkeiten angepaßt. Da durch ein Signal der Umgebung nur bestimmte Proteine abgebaut werden dürfen, erfordert dies die streng regulierte Markierung des Substrates. In eukaryontischen Zellen geschieht dies meist durch kovalente Modifikation mit dem hochkonservierten, 76 Aminosäure langen Protein Ubiquitin.

1. Das Ubiquitin-Konjugationssystem

1.1 Eine enzymatische Kaskade steuert die Ubiquitinierung eines Substratproteins

Die Modifikation eines Proteins mit Ubiquitin („Ubiquitinierung“) bezeichnet einen Vorgang, in dessen Verlauf Ubiquitin kovalent mit dem Substratprotein verknüpft wird. Hierfür wird zwischen der Carboxylgruppe des carboxy-(C)-terminalen Glycins des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins des Substrates eine Isopeptidbindung ausgebildet. Diese Verknüpfung kann gleichermaßen zwischen Ubiquitinmolekülen erfolgen, was zur Ausbildung langer Multiubiquitinketten führt. Die Ubiquitinierung ist analog der Phosphorylierung oder Acetylierung eine reversible

Reaktion, die durch Ubiquitin-Hydrolasen rückgängig gemacht werden kann (Wilkinson und Hochstrasser, 1998; Pickart, 2001; Yao und Cohen, 2002).

Im ersten Schritt der Ubiquitinierungsreaktion wird die chemisch inerte Carboxylfunktion des Ubiquitins aktiviert. Dies katalysiert in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wie in der Mehrzahl aller Eukaryonten ein einziges Enzym, UBA1, (*ubiquitin activating enzyme 1*), welches ATP-abhängig einen Thioester zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und einem konservierten Cysteinrest seines aktiven Zentrums ausbildet (McGrath et al., 1991). Aktiviertes Ubiquitin wird in einer Umesterungsreaktion auf einen Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (UBC) übertragen. In *S. cerevisiae* existieren 13 UBC-Proteine, die Ubiquitin oder die Ubiquitin-ähnlichen Proteine SUMO (UBC9) und RUB1 (UBC12) konjugieren (Johnson und Blobel, 1997; Schwarz et al., 1998; Liakopoulos et al., 1998). UBC-Proteine können Ubiquitin direkt auf Substratproteine übertragen, wie dies in der RAD6 (UBC2)-abhängigen Monoubiquitinierung des Histons H2B nachgewiesen wurde (Jentsch et al., 1987). Meist benötigen UBC-Proteine jedoch zusätzliche Faktoren, die Ubiquitin-Ligasen, um spezifische Ubiquitinierungsreaktionen zu vermitteln. Ubiquitin-Ligasen sind weitverbreitete, oft modular aufgebaute Proteine oder Proteinkomplexe, die sowohl das Substrat als auch das erforderliche UBC-Protein erkennen können (Jackson et al., 2000). In manchen Fällen, in denen Ubiquitin-Ligasen alleine keine Ubiquitinketten ausbilden können, wirken zusätzliche Multiubiquitinierungsfaktoren (Koegl et al., 1999; Imai et al., 2002).

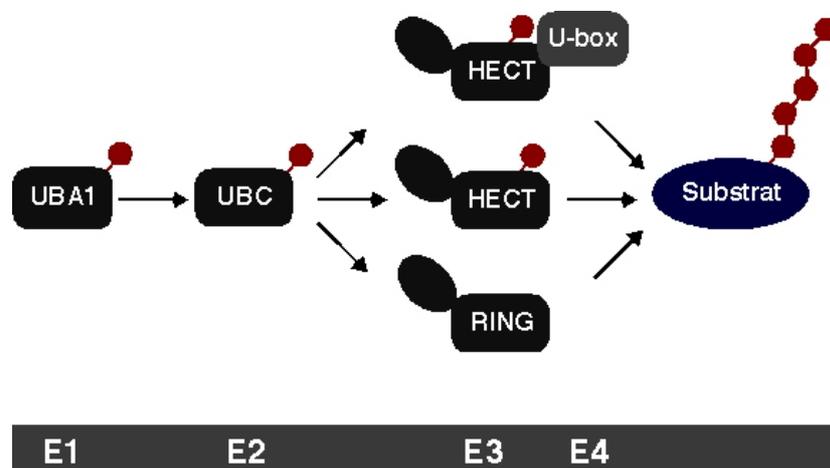


Abbildung 1-1: Spezifische Ubiquitinierung von Substratproteinen bedarf einer enzymatischen Kaskade von E1-, E2-, E3- und in manchen Fällen von E4-Enzymen.

Der Mechanismus der Ubiquitinierung lässt sich daher als hierarchisch organisierte enzymatische Kaskade beschreiben, in deren Verlauf Ubiquitin sequentiell aktiviert und spezifisch auf ein Substrat übertragen wird. Aufgrund ihrer Stellung in dieser Kaskade werden die einzelnen Enzyme als E1- (UBA1), E2- (UBC), E3- (Ubiquitin-

Ligasen) und E4-Enzyme (Multiubiquitinierungsfaktoren) bezeichnet. Im Prinzip könnte jeder dieser Faktoren einer stringenten Regulation unterliegen. Da die Substratspezifität in der Regel durch Ubiquitin-Ligasen vermittelt wird, beschränkt sich die Regulation der Ubiquitinierung jedoch im Wesentlichen auf E3-Enzyme (Pickart, 2001).

1.2 Ubiquitin-Ligasen bestimmen die Substratspezifität der Ubiquitinierung

Speziell Ubiquitin-Ligasen müssen den hohen Anforderungen einer Ubiquitinierungsreaktion genügen. Sie müssen sowohl das Substrat als auch das Ubiquitin-konjugierende Enzym binden, um spezifische Ubiquitinierung zu ermöglichen. Um dieser Komplexität zu begegnen, sind Ubiquitin-Ligasen modular aufgebaut. Spezifische Substratbindungsmodul wurden mit den E3-charakteristischen HECT- bzw. RING-Finger-Domänen kombiniert, um ein breites Substratspektrum abdecken zu können (Abb. 1-2).

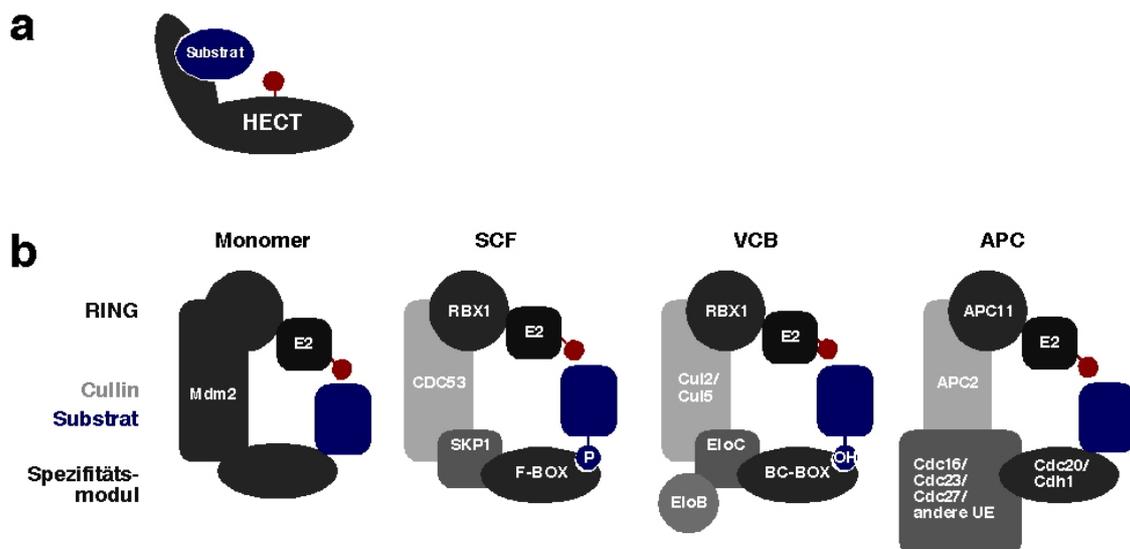


Abbildung 1-2: Ubiquitin-Ligasen bestimmen die Substratspezifität der Ubiquitinierung. a. Die monomeren HECT E3-Enzyme übertragen Ubiquitin (rot) direkt von einem Cysteinrest ihres aktiven Zentrums auf das Substrat. b. RING-Finger E3-Enzyme organisieren ubiquitinbeladene E2-Enzyme und Substrat in einem Komplex und katalysieren so die spezifische Ubiquitinierung des Substrates. RING-Finger E3-Enzyme finden sich als monomere Proteine (z.B. Mdm2) oder in hochmolekularen Komplexen (z.B. SCF-, VCB- oder APC-Komplex).

Sämtliche HECT-(„Homologous to E6-AP-C-terminus“)-E3-Enzyme wirken als Monomere. Sie besitzen eine konservierte, C-terminale HECT-Domäne, die erstmals im Protein E6-AP beschrieben wurde (Scheffner et al., 1995; Huibregtse et al., 1995). Nach Infektion von Zellen mit onkogenen Formen des Humanen Papillomavirus

bindet E6-AP das virale E6-Protein und fördert im Verbund mit diesem den proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors p53 (Scheffner et al., 1993). *S. cerevisiae* verfügt über fünf E3 Enzyme dieser Klasse, von denen allein das in dieser Arbeit beschriebene RSP5 lebensnotwendig ist. HECT-E3-Enzyme besitzen etwa 35 Aminosäuren vom C-Terminus entfernt einen strikt konservierten Cysteinrest, auf welchen Ubiquitin in einer Umesterungsreaktion von einem UBC-Protein übertragen wird. Die Substraterkennung der HECT-E3-Enzyme erfolgt über nicht konservierte N-terminale Substratbindungsdomänen. In RSP5 sowie in dessen Säugerhomologen hRPF1 und Nedd4 sind dies WW-Domänen, die prolinreiche Sequenzmotive erkennen können (Imhof et al., 1996; Lu et al., 1999; Chang et al., 2000).

Daneben existiert die Klasse der RING-Finger- oder RING-Finger-ähnlichen E3-Enzyme, die monomer oder in hochmolekularen Komplexen vorkommen. Die RING (*Really Interesting New Gene*)-Finger-Domäne wird durch die konservierte Anordnung von Cystein- und Histidinresten charakterisiert, die die Koordination zweier Zink-Ione erlaubt. Der RING-Finger fungiert als Plattform zur Bindung des UBC-Proteins und als dessen allosterischer Aktivator, während andere Domänen des Proteins bzw. andere Untereinheiten des Komplexes Substrate rekrutieren (Joazeiro and Weissman, 2000; Xie and Varshavsky, 1999). RING-Finger gehen keine Thioesterbindung mit Ubiquitin ein. Kürzlich wurde auch die zur RING-Finger-Domäne homologe PHD-Domäne als Ubiquitinierungsmodul identifiziert (Lu et al., 2002).

Monomere RING-Finger Ubiquitin-Ligasen besitzen charakteristische Substratbindungsmotive innerhalb der gleichen Polypeptidkette. So bindet Mdm2 den Tumorsuppressor p53 durch eine N-terminale Domäne, während der C-terminale RING-Finger für die p53-Ubiquitinierung essentiell ist (Haupt et al., 1997). Die RING-Finger Ubiquitin-Ligase c-Cbl erkennt dagegen das Substrat EGFR (*epidermal growth factor receptor*) ausschließlich nach Phosphorylierung eines kritischen EGFR-Tyrosins durch eine SH2-Domäne (Levkowitz et al., 1999).

RING-Finger Ubiquitin-Ligasen existieren auch als hochmolekulare Komplexe, wie der SCF-, APC/C- (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) oder VCB-Komplex. Diese verfügen über ein zentrales Cullin-Molekül, dessen Funktion als struktureller Organisator durch die Kristallstruktur des SCF-Komplexes unterstrichen wurde (Zheng et al., 2002; Abb. 1-2b). Cullin bindet im SCF-Komplex an entgegengesetzten Polen das RING-Finger-Protein RBX1 sowie das Protein SKP1, mit welchem die für den SCF-Komplex charakteristischen F-Box-Proteine assoziieren. Die Spezifität dieser Ubiquitinierungsmaschinerien basiert auf der geregelten Wechselwirkung mit einer Reihe von Substratadaptoren: Der SCF-Komplex rekrutiert Substrate nach deren Phosphorylierung durch sogenannte F-Box-Proteine (Bai et al., 1996; Skowyra et al., 1997). Der APC/C benötigt zur Substraterkennung die homologen Proteine CDC20 und HCT1, über deren

Regulation wenig bekannt ist (Zachariae et al., 1997; Pflieger et al., 2000; Schwab und Seufert, 2001). Der VCB-Komplex hingegen bindet seine Substrate durch die Untereinheit VHL. VHL erkennt den Transkriptionsfaktor HIF-1 ausschließlich nach dessen Prolylhydroxylierung (Jaakkola et al., 2001; Hon et al., 2002).

1.3 E4-Enzyme katalysieren die Ausbildung langer Multiubiquitinketten

In wenigen bisher beschriebenen Fällen wird zur Ausbildung langer Multiubiquitinketten ein weiterer Faktor, ein sogenanntes E4-Enzym, benötigt. In *S. cerevisiae* wurde diese Funktion dem Protein UFD2 zugeschrieben (Koegl et al., 1999). UFD2 wurde als Bindungspartner eines oligoubiquitinierten Substrates isoliert und fördert *in vitro* und *in vivo* dessen Multiubiquitinierung (Johnson et al., 1995; Koegl et al., 1999). Auch das Säugerprotein CHIP, welches den proteasomalen Abbau des Membranproteins Pael-R fördert, wurde als E4-Enzym identifiziert (Imai et al., 2002). Beide Multiubiquitinierungsfaktoren besitzen am C-Terminus eine charakteristische sogenannte U-Box-Domäne, die strukturell mit dem RING-Finger-Motiv verwandt ist (Aravind und Koonin, 2000). Zusätzlich wird ein E3-Enzym benötigt. Daher kooperiert UFD2 mit der HECT-Ubiquitin-Ligase UFD4, während CHIP des RING-Finger-Proteins Parkin bedarf. Ob, wie aufgrund der Homologie der U-Box zum RING-Finger vorgeschlagen wurde, diese Proteine auch als E3-Enzyme fungieren können, ist in Ermangelung eines gut charakterisierten Substrates unklar (Hatekayama et al., 2001; Cyr et al., 2002).

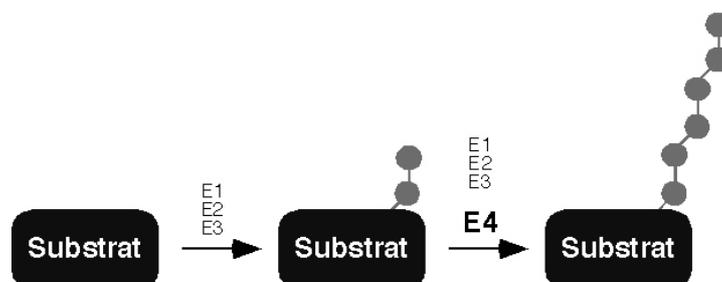


Abbildung 1-3: E4-Enzyme können die Multiubiquitinierung von Substraten fördern.

1.4 Ubiquitinierung kann verschiedene Konsequenzen haben

Die Ubiquitinierung eines Proteins kann vielfältige Konsequenzen nach sich ziehen. Die am besten charakterisierte Funktion der Ubiquitinierung ist die Markierung des Substrates für proteasomalen Abbau. Das 26S-Proteasom ist eine ubiquitin-abhängige Protease, die den Abbau des Großteils aller Proteine in eukaryontischen Zellen katalysiert (Hochstrasser, 1996). Während der letzten Jahre wurden jedoch

weitere, nonkonventionelle Funktionen der Ubiquitinierung beschrieben, die das konjugierte Protein nicht der proteasomale Degradation zuführen.

Besonders interessant ist die Rolle der Ubiquitinierung während der Endozytose und lysosomalen Zielsteuerung mehrerer Plasmamembranproteine (Hicke, 2001). Diese assoziieren in monoubiquitiniertes Form mit Rezeptoren des Endozytoseapparates, wie etwa Epsin (Hicke und Riezman, 1996; Polo et al., 2002). Die Substraterkennung des Epsins erfolgt über ein kurzes UIM-(*ubiquitin interacting motif*)-Motiv, welches direkt Ubiquitin bindet (Hofmann und Falquet, 2001; Shih et al., 2002). Nach Sortierung in Endosomen werden die ubiquitinierten Membranproteine zu Lysosomen geleitet, in deren Lumen sie nach Invagination der Membran in multivesikuläre Teilchen (MVB; *multivesicular bodies*) durch lysosomale Proteasen abgebaut werden. Die Inkorporation eines Proteins in MVBs erfordert die sequentielle Erkennung der Ubiquitinmodifikation durch drei ESCRT-Komplexe (Katzmann et al., 2001; Babst et al., 2002a; Babst et al., 2002b). Interessanterweise beruht der entgegengesetzte Prozeß, die Knospung von Viren aus der Plasmamembran, ebenso auf vorheriger Erkennung monoubiquitiniertes Proteine durch Proteine der Wirtszelle (Garrus et al., 2001).

Ubiquitinierung kann Proteine auch positiv regulieren. So beruht die Aktivierung einer Kinase des NF- κ B-Signaltransduktionsweges, TAK1, auf Autoubiquitinierung des Interaktors TRAF6 (Wang et al., 2001). Die Ausbildung der an TRAF6 konjugierten Multiubiquitinkette benötigt das UBC13/MMS2-Heterodimer und führt nicht zum proteasomalen Abbau des Konjugates (Deng et al., 2000). Stattdessen bindet eine Untereinheit der I κ B-Kinase (IKK), NEMO, die Ubiquitinketten und ermöglicht so TAK1-vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung der IKK (J. Chen, pers. Mitteilung). Auch Transkriptionsfaktoren werden in ihrer Aktivität durch Ubiquitinierung beeinflusst. Der heterologe Transkriptionsfaktor VP16 ist in *S. cerevisiae* nur nach SCF^{MET30}-vermittelter Ubiquitinierung aktiv (Salghetti et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor MET4 wird hingegen nach SCF^{MET30}-vermittelter Ubiquitinierung durch Inhibition einer Koaktivatorbindung oder durch proteasomalen Abbau abgeschaltet (Kaiser et al., 2000; Kuras et al., 2002).

Eine in ihrem Mechanismus noch unverstandene, aber essentielle Funktion kommt der Ausbildung von speziellen, über das Lysin K63 des Ubiquitins verknüpften Ketten während der DNA-Reparatur zu (Spence et al., 1996). Nach DNA-Schädigung wird das schon erwähnte UBC13/MMS2-Heterodimer in den Zellkern transportiert, wo es in einen heteromeren Komplex mit den RING-Finger-Proteinen RAD5 und RAD18 sowie dem UBC-Protein RAD6 inkorporiert wird (Ulrich und Jentsch, 2000). Dies führt zur regulierten Ubiquitinierung des Polymerase-Kooperativitätsfaktors PCNA und könnte für die Rekrutierung spezieller Polymerasen verantwortlich sein (Höge et al., 2002).

2. Das 26S-Proteasom

2.1 Das 26S-Proteasom kann Ubiquitinkonjugate erkennen und abbauen

Obwohl die genannten Beispiele verdeutlichen, daß die Ubiquitinierung eines Proteins nicht zwangsläufig dessen Abbau nach sich ziehen muß, kommt diesem Vorgang eine zentrale Bedeutung zu. Der Großteil aller Proteine wird in Eukaryonten nach Ubiquitinierung durch das 26S-Proteasom abgebaut (Hochstrasser, 1996). Das Proteasom ist eine selbstkompartimentalisierte Protease, die aus einem 20S-Kernpartikel und zwei axialen 19S-Regulatorkappen besteht (Baumeister et al., 1998). Das 20S-Kernpartikel konstituiert sich aus vier gestapelten Ringen mit je sieben zueinander homologen Untereinheiten (Groll et al., 1997). Während die katalytisch aktiven Threoninreste in β -Typ-Untereinheiten der beiden mittleren Ringe zu finden sind, beschränken N-terminale Extensionen der äußeren α -Typ-Untereinheiten den Zugang zur proteolytischen Kammer (Groll et al., 2001). Der zentrale Kanal des Proteasoms wird ATP-abhängig durch die AAA-ATPase RPT2 des 19S-Aufsatzes geöffnet (Köhler et al., 2001). Dies erklärt zusammen mit der energiegetriebenen Entfaltung ubiquitinerter Proteine und deren RPN11-abhängigen Deubiquitinierung den ATP-Verbrauch des eigentlich exergonischen Proteinabbaus (Braun et al., 1999; Yao und Cohen, 2002).

In der Regel degradiert das 26S-Proteasom Proteine, die über eine mindestens vier Moleküle lange Ubiquitinkette verfügen (Chau et al., 1989; Thrower et al., 2000). Ubiquitinkonjugate können durch mehrere Untereinheiten des 19S-Regulators erkannt werden. Sowohl gereinigtes RPN10-Protein als auch die AAA-ATPase RPT5 konnten mit photoreaktiven Ubiquitinkonjugaten quervernetzt werden (van Nocker et al., 1996; Lam et al., 2002; Elsasser et al., 2002). RPN10 verliert jedoch nach Inkorporation in das 26S-Proteasom seine hohe Ubiquitinaffinität, sodaß stattdessen RPT5 als primärer proteasomaler Akzeptor ubiquitinerter Proteine angesehen wird (Lam et al., 2002; Elsasser et al., 2002). Der 19S-Aufsatz des Proteasoms vermittelt neben der Erkennung der Ubiquitinkonjugate zugleich deren Entfaltung und ermöglicht so den spezifischen Transfer eines entfalteten Substratproteins in die proteolytische Kammer (Braun et al., 1999; Strickland et al., 2000). Innerhalb des Proteasoms wird das Substrat üblicherweise zu Peptiden mit einer Länge von etwa 10 Aminosäuren verdaut. Die Ubiquitinkette wird zuvor durch Ubiquitin-Hydrolasen abgespalten, damit Ubiquitin effektiv wiederverwendet werden kann (Wilkinson und Hochstrasser, 1998; Yao und Cohen, 2002; Verma et al., 2002).

Es wurden bereits viele Substrate des proteasomalen Abbaus beschrieben. Falsch gefaltete Proteine des Zytosols werden durch Chaperone der Hsp70-Familie

erkannt und können über das Adaptorprotein CHIP dem Ubiquitin/Proteasom-System zugeführt werden (Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001). Ebenso werden fehlerhaft gefaltete oder kurzlebige Proteine des Endoplasmatischen Retikulums nach Retrotranslokation ins Zytoplasma Ubiquitin/Proteasom-abhängig abgebaut (Sommer und Jentsch, 1993; Ye et al., 2001; Braun et al., 2002). Der Zellzyklus wird unter anderem durch zeitlich regulierten, APC/C- und SCF-Komplex-kontrollierten proteasomalen Abbau der Zykline und des Anaphase-Inhibitors Securin gesteuert (Peters, 2002; Wäsch und Cross, 2002). Auch die Aktivität mehrerer Transkriptionsfaktoren wie p53, MAT 2 oder MET4 unterliegt der Kontrolle des Ubiquitin/Proteasom-Systems (Chen et al., 1993; Honda et al., 1997; Kurras et al., 2002). Dies verdeutlicht, daß der proteasomale Abbau von Proteinen einen zentralen Aspekt zellulärer Regulation darstellt.

2.2 Das 26S-Proteasom kann Proteine prozessieren

Das 26S-Proteasom ist eine hochkooperative Protease, die ihre Substratproteine zu kurzen Oligopeptiden verdaut. Umso überraschender war der Befund, daß manche ubiquitinierte Proteine zwar vom Proteasom erkannt, aber nur partiell abgebaut werden. Dies wurde zuerst beim heterodimeren Transkriptionsfaktor NF- κ B beschrieben, dessen eine Untereinheit als inaktives 105 kDa-Vorläuferprotein (p105) synthetisiert wird (Fan und Maniatis, 1991; Palombella et al., 1994). NF- κ B p105 kann ko- und posttranslational in einer ubiquitinabhängigen Reaktion durch das 26S-Proteasom zu einer kürzeren 50 kDa-Form prozessiert werden (Lin et al., 1998; Lin et al., 2000; Xiao et al., 2001). Während die N-terminale transkriptionsaktivierende Domäne des Proteins vor proteasomalem Verdau geschützt ist, kann der prozessierte C-Terminus aufgrund des effektiven Abbaus nicht detektiert werden. Es wurde eine interne, glycinreiche und vermutlich unstrukturierte Region identifiziert, die für die proteasomale Prozessierung benötigt wird (Lin und Ghosh, 1996; Betts und Nabel, 1996). Zunächst wurden Modelle diskutiert, die von einem vektorialen Transfer des p105-Vorläufers in das Proteasom ausgehen, der durch eine undefinierte „Stop-Transfer-Sequenz“ abgebrochen wird (Orion et al., 1999; Ciechanover et al., 2001). Dies ist jedoch aufgrund der beobachteten kotranslationalen Prozessierung, in deren Verlauf der C-Terminus noch nicht synthetisiert ist bzw. im Ribosom geschützt vorliegt, unwahrscheinlich.

Neben NF- κ B wurden weitere durch das Proteasom prozessierte Proteine identifiziert (Ingham, 1998; Hoppe et al., 2000; Nourredine et al., 2002). Diese wurden in unterschiedlichen Organismen wie *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* oder *H. sapiens* gefunden. Da NF- κ B auch bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* korrekt prozessiert wird, ist der Mechanismus dieser Reaktion vermutlich konserviert (Sears

et al., 1998). Interessanterweise handelt es sich bei allen bisher bekannten Prozessierungssubstraten um Transkriptionsfaktoren: NF- κ B, Cubitus interruptus in *Drosophila melanogaster* und die im Zentrum dieser Arbeit stehenden SPT23 und MGA2 in *S. cerevisiae*.

3. Der OLE-Weg in *Saccharomyces cerevisiae*

3.1 SPT23 und MGA2 sind membranständige, proteasomal prozessierte Transkriptionsaktivatoren

SPT23 und MGA2 sind zueinander homologe Proteine der Bäckerhefe, die neben einer zentralen IPT-Domäne zwei Ankyrin-Wiederholungen und eine C-terminale Transmembranhelix besitzen (Abb. 1-4a). Beide Proteine werden als 120 kDa-Vorläuferformen synthetisiert und in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert (Hoppe et al., 2000). Da SPT23 und MGA2 jedoch als Transkriptionsaktivatoren im Zellkern wirken (Zhang et al., 1999), müssen sie durch membranständige Prozessierung aktiviert werden.

Es wurden bereits mehrere membranverankerte Transkriptionsaktivatoren beschrieben, die durch regulierte, in der Membranhelix stattfindende Prozessierung (RIP, *regulated intramembrane proteolysis*) aktiviert werden (Brown et al., 2000; Hoppe et al., 2001). Dieser Prozeß wurde zuerst bei SREBP-1 (*sterol response element binding protein-1*) charakterisiert. Sterolmangel induziert eine Konformationsänderung des Sensors SCAP, der dadurch von seinem Inhibitor INSIG-1 dissoziiert (Yang et al., 2002, Brown et al., 2002). SCAP bindet das integrale Membranprotein SREBP-1 und fördert dessen Transport zum Golgi-Apparat, wo SREBP-1 durch zwei sequentiell wirkende Proteasen gespalten wird (Sakai et al., 1998; Brown et al., 2000). Das von der Membran freigesetzte N-terminale SREBP-1-Fragment aktiviert im Nukleus die Transkription von Genen, die für die Synthese von Membranlipiden benötigt werden. Ähnlich regulierte Proteine, deren durch RIP erzeugte, lösliche Fragmente als Transkriptionsfaktoren wirken, sind Notch, APP und der ER-Streßfaktor ATF6 (Schroeter et al., 1998; Zhang et al., 2000; Ye et al., 2000; Cao und Sudhoff, 2001; Ebinu und Yankner, 2002).

Im Gegensatz dazu werden SPT23 und MGA2 nicht durch RIP, sondern durch regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung (RUP) aktiviert (Hoppe et al., 2000; Abb. 1-4). SPT23 und MGA2 werden durch die HECT-Ubiquitin-Ligase RSP5 an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums erkannt und ubiquitiniert. Dies führt zur proteasomalen Spaltung der Vorläuferproteine, wodurch ein lösliches 90 kDa großes Fragment (p90) von der Membran freigesetzt wird. SPT23 p90 wird in den Zellkern transportiert, wo es die Transkription des essentiellen Gens *OLE1*

aktiviert (Zhang et al., 1999). *OLE1* kodiert eine 9-Fettsäuredesaturase, die Doppelbindungen in gesättigte Fettsäuren einführt und damit die Fluidität intrazellulärer Membransysteme reguliert (Stukey et al., 1989). Interessanterweise wird die Prozessierung von SPT23 durch Produkte der von *OLE1*-katalysierten Reaktion, ungesättigte Fettsäuren (UFAs), inhibiert (Abb. 1-4b). Dieses von SPT23 und MGA2 kontrollierte Regulon wird im folgenden als *OLE*-Weg bezeichnet.

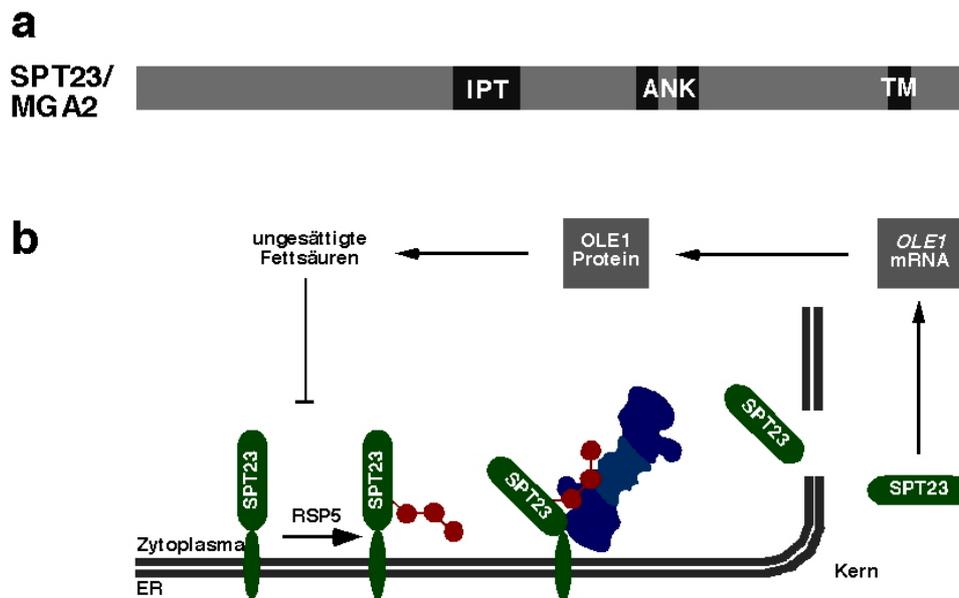


Abbildung 1-4: Der *OLE*-Weg der Bäckerhefe. **a.** Domänenstruktur der homologen Transkriptionsfaktoren SPT23 und MGA2 (IPT: *Ig-like/Plexins/Transcription factors*; ANK: Anykrin-Wiederholungen; TM: Transmembranhelix). **b.** Die Expression der essentiellen Fettsäuredesaturase *OLE1* wird durch den Transkriptionsfaktor SPT23 und dessen Homologes MGA2 kontrolliert. SPT23/MGA2 sind ursprünglich integrale Proteine der ER-Membran und werden nach RSP5-abhängiger Ubiquitinierung durch das 26S-Proteasom prozessiert. Der prozessierte Transkriptionsfaktor wird anschließend in den Zellkern transportiert. Die Produkte der von *OLE1* katalysierten Reaktion, ungesättigte Fettsäuren (UFAs), inhibieren die Prozessierung von SPT23.

3.2 Der *OLE*-Weg der Hefe ist streng reguliert

Das durch SPT23 regulierte Protein *OLE1* ist die einzige Fettsäuredesaturase in *S. cerevisiae*. Das ER-ständige Protein führt Doppelbindungen an der C9,10-Stelle des Fettsäurerückgrates der Membranlipide ein und katalysiert so die Bildung ungesättigter Fettsäuren (Stukey et al., 1989). Die korrekte Lipidzusammensetzung intrazellulärer Membransysteme ist essentiell für viele wichtige Prozesse, unter anderem für die intrazelluläre Zielsteuerung von Proteinen, für die geregelte Auslösung der Hitzeschockantwort und die Aktivität integraler Membranproteine (Carratù et al., 1996; van der Heide und Poolman, 1998; Vigh et al., 1998). *OLE1* ist daher ein essentielles Gen, dessen Misregulation pleiotrope Defekte im

Kerntransport, der Verteilung von Mitochondrien oder in der Funktion des Endoplasmatischen Retikulums verursacht. Die Aktivität von OLE1 ist deshalb streng reguliert.

Bei niedrigen Temperaturen ist die *OLE1*-Transkription gesteigert, da vermehrt hergestellte ungesättigte Fettsäuren die Membranflexibilität erhöhen (Nakagawa et al., 2002). In gleicher Weise wirkt sich ein Mangel des Kofaktors Sauerstoff auf die SPT23/MGA2-gesteuerte Transkription von *OLE1* aus, da die spezifische Aktivität des Enzyms OLE1 unter diesen Bedingungen erniedrigt ist. (Jiang et al., 2001). Im Gegensatz dazu wird bei guter Versorgung mit ungesättigten Fettsäuren die SPT23-Prozessierung inhibiert, um die Menge des aktiven Transkriptionsfaktors im Zellkern zu erniedrigen (Hoppe et al., 2000). Dennoch synthetisierte *OLE1* mRNA wird in Gegenwart erhöhter UFA-Konzentrationen schnell abgebaut, während sie bei UFA-Mangel stabiler ist (Gonzalez und Martin, 1996). Zusätzlich ist OLE1 ein kurzlebiges Protein, dessen proteasomale Degradation ebenfalls durch die Lipidzusammensetzung der Membranen reguliert zu sein scheint (Braun et al., 2002). Aufgrund dieses komplexen Netzwerks, des OLE-Wegs, vermag es die Hefezelle, die Menge an OLE1-Protein und damit die Beschaffenheit der Membranen schnell den gegebenen Umweltbedingungen anzupassen.

Zielsetzung der Arbeit

Die Transkriptionsfaktoren SPT23 und MGA2 werden als ER-ständige, inaktive Vorläuferproteine synthetisiert und durch regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung (RUP) aktiviert. Dieser ungewöhnliche Aktivierungsweg wurde bisher nur für wenige Proteine beschrieben und war in seinem Mechanismus noch wenig verstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die mechanistische Grundlage der proteasomalen Prozessierung zu analysieren.

Es sollten zunächst SPT23-Bindungspartner isoliert und auf ihre Funktion bei der Prozessierung des Transkriptionsfaktors untersucht werden. Im Zuge dieser Arbeiten wurde schnell deutlich, daß die Aktivierung von SPT23 eng mit dessen proteasomaler Degradation verknüpft ist. Es sollte daher zusätzlich die enzymatische Maschinerie des Abbauweges näher beleuchtet und in Bezug zur Aktivierungsreaktion gesetzt werden.

Ergebnisse

1. Regulation der SPT23-Prozessierung durch Dimerisierung

1.1 SPT23 interagiert direkt mit der Ubiquitin-Ligase RSP5

Der Transkriptionsfaktor SPT23 wird als integrales ER-Membranprotein synthetisiert und durch regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung (RUP) aktiviert (Hoppe et al., 2000). SPT23 kontrolliert die Transkription von *OLE1*, der essentiellen 9-Fettsäuredehydratase der Hefe (Stukey et al., 1989; Zhang et al., 1999). Die Produkte der von *OLE1* katalysierten Reaktion, ungesättigte Fettsäuren (UFAs), inhibieren die SPT23-Prozessierung. Um den Mechanismus dieser ungewöhnlichen Reaktion genauer zu verstehen, wurde nach Interaktionspartnern von SPT23 im Zwei-Hybrid-System gesucht (James et al., 1996). Vollängen-SPT23 ist im Zwei-Hybrid-System autoaktivierend. Es wurde daher ein Konstrukt verwendet, dessen beschriebene Transkriptionsaktivierungsdomäne, die Transmembranhelix, sowie die ER-lumenale Domäne deletiert waren (SPT23^{TAD}TM). Nach Testen von SPT23^{TAD}TM gegen eine Hefegenbank konnten mehrere Interaktoren isoliert werden (Tab. 2-1). Für die nachfolgenden Studien waren vor allem die Interaktion von SPT23 mit der Ubiquitin-Ligase RSP5 und die Wechselwirkung von SPT23 mit sich selbst von Bedeutung.

Tabelle 2-1: SPT23-Interaktoren, die in einem Zwei-Hybrid-Screen isoliert wurden.

Interaktor	Zelluläre Funktion (wenn bekannt)
RSP5	HECT-Ubiquitin-Ligase
SPT23	Membranständiger Transkriptionsfaktor (Zhang et al., 1999; Hoppe et al., 2000)
CK11	Cholin-Kinase; reguliert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese des Glyzeridrückgrates der Membranlipide (Kim et al., 1999)
RGA2	Rho-GTPase-aktivierendes Protein, besitzt LIM-Domänen

Die essentielle Ubiquitin-Ligase RSP5 ist für die Prozessierung von SPT23 an der ER-Membran notwendig (Hoppe et al., 2000). RSP5 besitzt eine N-terminale C2-Domäne, drei zentrale WW-Domänen, und eine C-terminale, katalytisch aktive HECT-Domäne (Abb. 2-1). C2-Domänen interagieren Ca^{2+} -abhängig mit Membranlipiden, während WW-Domänen als Substratbindestellen mehrerer Proteine

charakterisiert wurden (Rizo und Südhof, 1998; Lu et al., 2002; Chang et al., 2000). Alle im Zwei-Hybrid-Screen isolierten *RSP5*-Klone enthielten die dritte WW- sowie die HECT-Domäne (Abb. 2-1a). Da die isolierten WW-Domänen von *RSP5* mit *SPT23*^{TAD}TM wechselwirken, wird die HECT-Domäne für die Interaktion des E3s mit dem Substrat *SPT23* nicht benötigt. Damit konnte die dritte WW-Domäne von *RSP5*, die die einzig essentielle Substratbindedomäne dieser Ubiquitin-Ligase ist (Matuschewski, 1998), als *SPT23*-Erkennungsdomäne identifiziert werden. *RSP5*-Deletionsmutanten können durch die Endprodukte des OLE-Wegs, ungesättigte Fettsäuren, gerettet werden (Hoppe et al., 2000). Bindung und Ubiquitinierung des *SPT23*-Transkriptionsfaktors stellen daher die essentielle Funktion der *RSP5*-Ubiquitin Ligase unter normalen Wachstumsbedingungen dar.

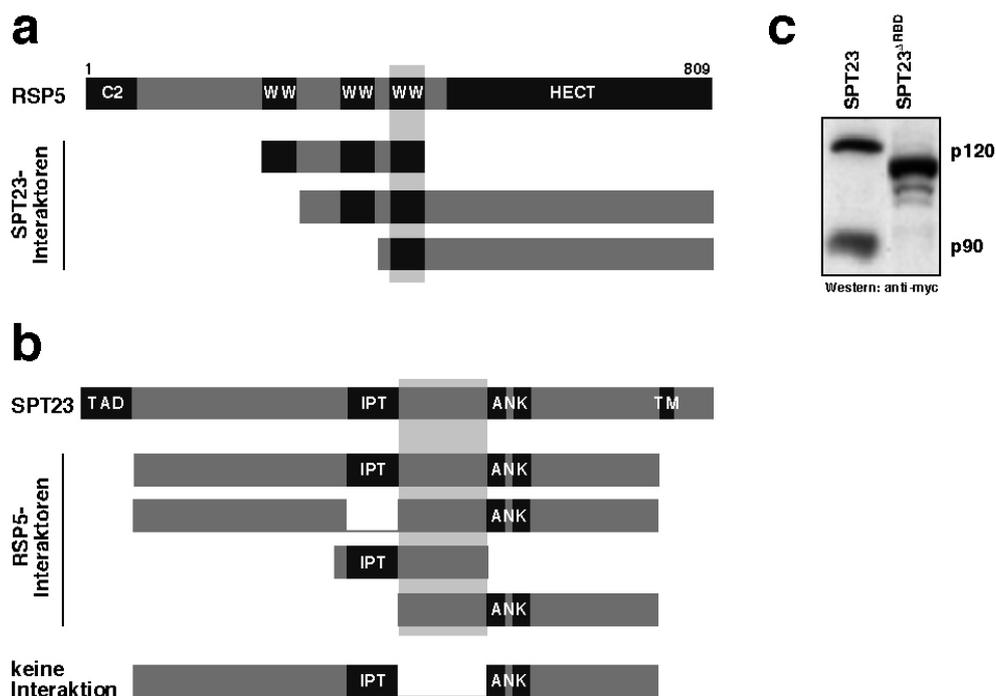


Abbildung 2-1: SPT23 interagiert mit der Ubiquitin-Ligase RSP5. **a.** *RSP5* wurde als Interaktor von *SPT23* in einem Zwei-Hybrid-Screen isoliert. Anschließend wurden verkürzte *RSP5*-Konstrukte gegen *SPT23*^{TAD}TM getestet. Die allen mit *SPT23* wechselwirkenden Konstrukten gemeinsame dritte WW-Domäne von *RSP5* ist grau hinterlegt. **b.** *RSP5* erkennt eine Sequenz in *SPT23*, die zwischen den konservierten IPT- und Ankyrin-Domänen liegt. Die angegebenen *SPT23*-Deletionskonstrukte wurden im Zwei-Hybrid-System gegen die isolierten WW-Domänen von *RSP5* getestet. Die für die Interaktion mit *RSP5* wichtige *SPT23*-Domäne ist grau hinterlegt. **c.** Deletion der *RSP5*-Bindestelle verhindert die proteasomale Prozessierung von *SPT23*. MycSPT23 bzw. mycSPT23^{RBD} wurden in Wildtyphefen exprimiert und nach denaturierender Gelelektrophorese im anti-myc-Immunoblot analysiert.

In einer begleitenden Studie wurde die *SPT23*-Region charakterisiert, die von *RSP5*

erkannt wird (Abb. 2-1b). Deletionsanalysen zeigen, daß RSP5 eine SPT23-Sequenz zwischen den konservierten IPT- und Ankyrin-Domänen bindet. Interessanterweise ist diese Region reich an Prolin- und Serin/Threoninresten und ähnelt dem für die WW-Domänen der Prolyl-Isomerase Pin1 beschriebenen Substratbindungsmotiv (Lu et al., 1999). Wird diese Domäne, im folgenden als RBD (RSP5-Bindungsdomäne) bezeichnet, in einem SPT23-Expressionskonstrukt deletiert, kann kein prozessiertes SPT23 p90 nachgewiesen werden (Abb. 2-1c). Die spezifische Erkennung einer prolin- und serin- / threoninreichen Region von SPT23 durch die dritte WW-Domäne von RSP5 ist daher für die SPT23-Prozessierung essentiell.

1.2 Die zentrale IPT-Domäne wird für die Dimerisierung und Prozessierung von SPT23 benötigt

Als weiterer Interaktor des SPT23^{TAD™}-Konstruktes wurden mehrere N-terminal verkürzte SPT23-Klone isoliert. Sämtliche im Zwei-Hybrid-Screen identifizierte SPT23-Konstrukte enthielten die zentrale IPT-(*Ig-like/plexin/transcription factor*)-Domäne, deren Deletion zum Verlust der Dimerisierung führt (Abb. 2-2a). Im Gegensatz dazu interagieren zwei isolierte IPT-Domänen. Dies bedeutet, daß SPT23 über direkte IPT-IPT-Wechselwirkung dimerisieren kann.

Um die Bedeutung der Dimerisierung für die Prozessierung zu untersuchen, wurde SPT23 mit deletierter IPT-Domäne (SPT23^{IPT}) in Hefezellen exprimiert (Abb. 2-2b). In Kontrast zum Wildtyp wird SPT23^{IPT} nicht prozessiert. SPT23^{IPT} wird jedoch korrekt in Membranen inseriert, interagiert im Zwei-Hybrid-System mit der Ubiquitin-Ligase RSP5 und wird durch das 26S-Proteasom ohne Intermediate abgebaut (Abb. 2-2c; Daten nicht gezeigt). Diese Daten legen daher den Schluß nahe, daß die Dimerisierung die N-terminale Domäne des Proteins vor proteasomalem Abbau schützt.

Die für Dimerisierung und Prozessierung von SPT23 essentielle IPT-Domäne ist zu einem Bereich der Rel-Homologie-Domäne in NF- κ B homolog (Abb. 2.2d). In der Kristallstruktur von NF- κ B p50 wurde dieser Bereich als Dimerisierungsoberfläche identifiziert (Müller et al., 1995). Deletionen in dieser Region verhindern ebenso die Prozessierung von NF- κ B (Lin et al., 2000). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß Dimerisierung auch für die NF- κ B-Prozessierung notwendig ist. Der Mechanismus proteasomaler Prozessierung scheint zwischen SPT23 und NF- κ B konserviert zu sein.

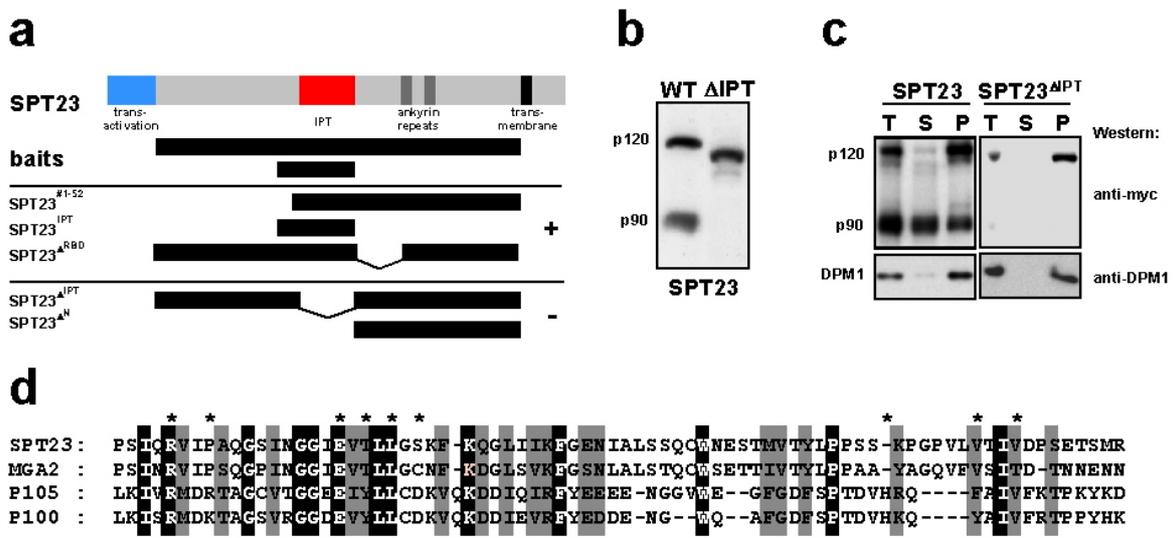


Abbildung 2-2: Die Dimerisierung von SPT23 ist für die Prozessierung essentiell. a. Charakterisierung der SPT23-Selbstinteraktion im Zwei-Hybrid-System. Die Interaktion erfolgt durch Wechselwirkung der konservierten IPT-Domäne. Mehrere SPT23-Deletionskonstrukte wurden gegen SPT23^{TADTM} bzw. gegen die isolierte IPT-Domäne getestet. Interaktoren sind durch + gekennzeichnet. Konstrukte, die keine Wechselwirkung zeigten, sind durch - markiert. **b.** Die Deletion der für die Dimerisierung essentiellen IPT-Domäne verhindert die Prozessierung von SPT23. *myc*SPT23^{HA} und *myc*SPT23^{IPT/HA} wurden in Wildtyphefen exprimiert und nach denaturierender Gelelektrophorese im anti-myc-Immunoblot detektiert. **c.** SPT23^{IPT} wird korrekt in Membranen inseriert. Membranfraktionen von *myc*SPT23^{HA}- und *myc*SPT23^{IPT/HA}-exprimierenden Hefezellen wurden durch Zentrifugation isoliert und im anti-myc-Immunoblot analysiert. Als Marker des Endoplasmatischen Retikulums wurde das integrale Membranprotein DPM1 detektiert. *T* bezeichnet das Gesamtlysate, *S* die lösliche Fraktion und *P* das isolierte Membranpellet. **d.** Die Dimerisierungsdomäne von SPT23 ist homolog zur IPT-Domäne von NF- κ B1 (p105) und NF- κ B2 (p100). Aus der Kristallstruktur von NF- κ B1 p50 bestimmte Aminosäuren, die zur Dimerisierung beitragen, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Deletion von NF- κ B1-Regionen, die dessen Prozessierung verhindern, sind durch den Balken markiert (Müller et al., 1995; Lin et al., 2000).

1.3 Dimerisierung und Prozessierung führen zur Bildung stabiler SPT23 p90/p120-Komplexe

Die Prozessierung von SPT23 führt zum Abbau des Membranankers und ist daher eine Voraussetzung für den Transport des Transkriptionsfaktors in den Zellkern. Dementsprechend kann der prozessierte Transkriptionsfaktor in Membranfraktionierungen in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 2-3a). Überraschenderweise wurde jedoch ein beträchtlicher Anteil von SPT23 p90 weiterhin in der Membranfraktion gefunden. Diese SPT23 p90-Subpopulation war peripher mit der Membran assoziiert, da sie neben Detergenzbehandlung auch durch Karbonatpuffer von der Membran gewaschen werden konnte. Interessanterweise

wurde membranassoziiertes SPT23 p90 nicht durch Inkubation in Hochsalzpuffern (bis zu 2.5M Natriumchlorid) von der Membran losgelöst (Abb. 2-3b). Dies deutet auf eine außerordentlich stabile, möglicherweise hydrophobe Wechselwirkung als Ursache der Membranassoziation hin.

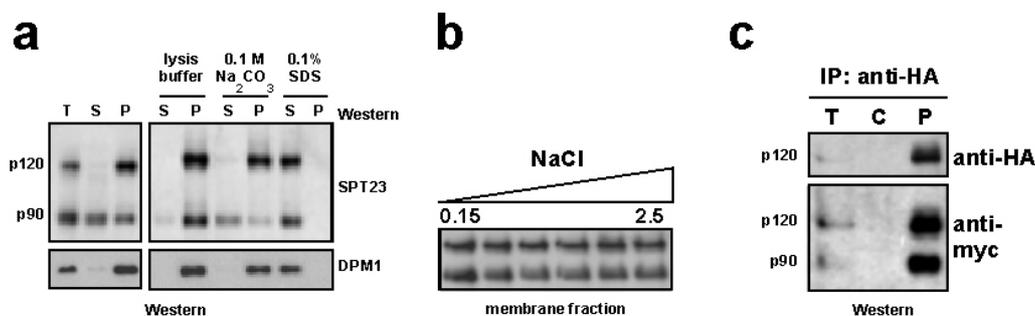


Abbildung 2-3: SPT23 p90 assoziiert stabil mit Vollängen-SPT23 an der ER-Membran. a. Membranfraktionierung von $^{myc}SPT23^{HA}$. SPT23 p90 wurde im anti-myc-Immunoblot sowohl in der löslichen Fraktion (S) als auch im Membranpellet (P) detektiert. Alkalische Extraktion und Detergenzbehandlung der Membranfraktion zeigt, daß SPT23 p90 peripher mit der Membran assoziiert ist. Als Marker der Membranfraktionen wurde das integrale ER-Membranprotein DPM1 im anti-DPM1-Immunoblot nachgewiesen. **b.** SPT23 p90 ist stabil an die ER-Membran gebunden. Membranfraktionen von $^{myc}SPT23^{HA}$ -exprimierenden Zellen wurden durch Zentrifugation isoliert und mit Puffern mit steigenden NaCl-Konzentrationen (0.15 - 2.5M) gewaschen. Dadurch läßt sich $^{myc}SPT23^{HA}$ p90, das im anti-myc-Immunoblot detektiert wurde, nicht von der Membran lösen. **c.** SPT23 p90 bindet SPT23 p120. $^{myc}SPT23^{HA}$ p120 wurde spezifisch mit anti-HA-Antikörpern aus solubilisierten Membranfraktionen gefällt. In anti-myc-Immunoblots läßt sich äquimolar p90 nachweisen, welches daher durch die Interaktion mit SPT23 p120 an der Membran zurückgehalten wird. *T* zeigt 10 % des eingesetzten Zellysats. *C* zeigt eine Immunpräzipitation aus gleichen Zellextrakten, die mit unspezifischen IgGs durchgeführt wurde.

Die Interaktion von SPT23 im Zwei-Hybrid-System, die Notwendigkeit der Dimerisierung für die Prozessierung und die stabile Assoziation bereits prozessierter SPT23-Moleküle mit der ER-Membran ließen vermuten, daß SPT23 p90 durch Interaktion mit Vollängen-SPT23 an der Membran zurückgehalten wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Transkriptionsfaktor aus Membranfraktionen immunpräzipitiert. SPT23 wurde N-terminal mit einem myc- und C-terminal mit einem HA-Epitop markiert. Anti-HA-Antikörper erkennen nur Vollängen-SPT23, während anti-myc-Antikörper Vollängen- und prozessiertes SPT23 detektieren. Es wurden Membranen aus $^{myc}SPT23^{HA}$ -exprimierenden Hefezellen isoliert und mit N-Dodecyl-Maltosid schonend solubilisiert (Seelert et al., 2000). SPT23 p120 wurde anschließend spezifisch durch anti-HA-Antikörper gefällt. Die Immunpräzipitate, die in anti-myc-Immunoblots analysiert wurden, enthielten Vollängen- und prozessiertes SPT23 in ungefähr äquimolaren Mengen (Abb. 2-3c). SPT23 p90 wird demnach

durch eine stabile Wechselwirkung mit SPT23 p120 an der Membran zurückgehalten. Eine Störung dieser Wechselwirkung inhibiert die SPT23-Prozessierung, so daß diese Komplexe bereits vor der Prozessierungsreaktion existieren müssen. Das Proteasom ist nicht in der Lage, die stabilen SPT23-Komplexe zu disassemblieren, wodurch die N-terminale Domäne des Transkriptionsfaktors vor Abbau geschützt ist. Die proteasomale Prozessierung allein genügt daher nicht, um SPT23 zu aktivieren. Dies wirft die interessante Frage auf, welche zelluläre Aktivität für die Loslösung von SPT23 p90 von der ER-Membran benötigt wird.

One Ring to rule them all, One Ring to find them,
One Ring to bring them all and in the darkness bind them.

(J.R.R. Tolkien)

2. CDC48^{UFD1/NPL4} mobilisiert den prozessierten Transkriptionsfaktor SPT23 p90

2.1 UFD1 interagiert mit CDC48 und NPL4

Die Identifizierung eines Proteins mit SPT23 p90-mobilisierender Aktivität wurde durch die Geschichte der Entdeckung der SPT23-Prozessierung erleichtert. Überexprimiertes und C-terminal verkürztes SPT23 wurde als Suppressor der *ufd1-2*-Mutante identifiziert (Hoppe et al., 2000). *UFD1* ist ein lebensnotwendiges Gen der Bäckerhefe, über dessen Funktion neben der Beteiligung am Abbau eines Ubiquitin-Fusionsproteins (UFD, *ubiquitin fusion degradation*) wenig bekannt war (Johnson et al., 1995). Als UFD1-Interaktoren waren allerdings die Proteine CDC48 (T. Hoppe, pers. Mitteilung) und NPL4 identifiziert worden (Uetz et al., 2000).

Vor allem die AAA-ATPase CDC48 war im Hinblick auf die gesuchte SPT23 p90-Mobilisierungsaktivität von Interesse. CDC48 sowie dessen Säugerorthologes p97 wurden in der Membranfusion und in Ubiquitin/Proteasom-abhängigen Prozessen beschrieben (Gishlain et al., 1996; Kondo et al., 1997). Es wurde vorgeschlagen, daß CDC48 stabile Komplexe der für die Membranfusion essentiellen SNARE-Proteine disassemblieren kann (Patel et al., 1998; Rabouille et al., 1998). Das essentielle Protein CDC48 wird in der Zelle in großen Mengen gebildet und besitzt eine ringförmige, hexamere Struktur (Fröhlich et al., 1991; Zhang et al., 2000). Es wurden mehrere Interaktoren identifiziert, die spezifisch im Ubiquitin/Proteasom-System (UFD1, UFD2, UFD3) oder bei Membranfusionsereignissen (SHP1/p47) mit CDC48 wechselwirken und für die Substratspezifität der AAA-ATPase verantwortlich sein könnten (Ghislain et al., 1996; Kondo et al., 1997; Koegl et al., 1999; Meyer et al., 2000). Über die Funktion von NPL4 war indessen nichts bekannt. Mutanten in *NPL4* weisen Defekte im Kernimport auf, die jedoch sekundärer Natur sein können (DeHoratius und Silver, 1996).

Die Frage, ob CDC48, UFD1 und NPL4 *in vivo* eine funktionelle Einheit darstellen, wurde zunächst genetisch untersucht. Dafür wurden Hefestämme mit einer Mutation in je einem der drei Gene miteinander gekreuzt und auf synthetische Wachstumsdefekte untersucht (Abb. 2-4a). Einzelmutanten in *CDC48* (*cdc48-6*) und *UFD1* (*ufd1-2*) sind bei 34°C, eine *NPL4*-Mutante (*npl4-1*) ist bei 37°C nicht mehr

lebensfähig. In sämtlichen Doppelmutanten ist die permissive Wachstumstemperatur auf unter 30 °C gesenkt. Die beobachtete synthetische Lethalität deutet darauf hin, daß die *in vivo*-Funktion der drei Gene eng miteinander verknüpft ist.

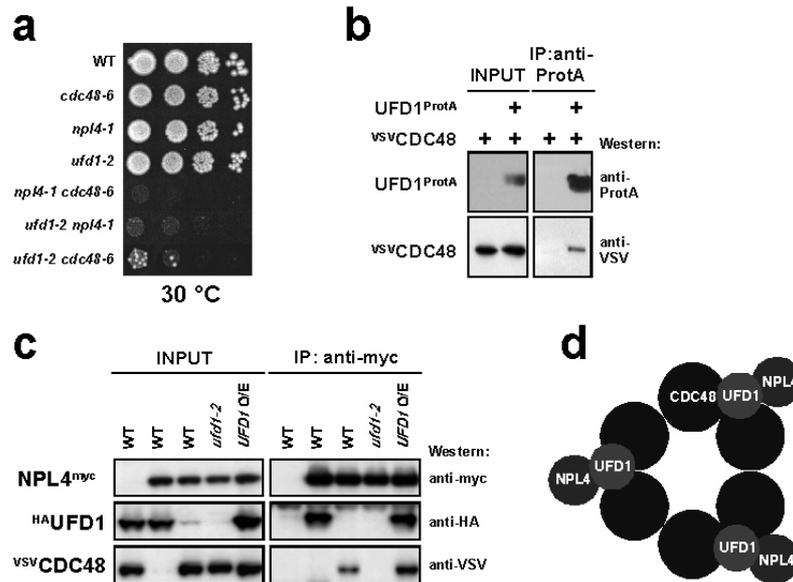


Abbildung 2.4: Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex. **a.** Mutanten in *UFD1*, *NPL4* und *CDC48* zeigen nach Kreuzung synthetische Wachstumsdefekte. Die angegebenen Hefestämme wurden in serieller Verdünnung auf YPD-Platten ausplattiert und drei Tage bei 30°C inkubiert. Alle Hefestämme sind bei Raumtemperatur lebensfähig. **b.** UFD1 interagiert mit CDC48. UFD1^{ProtA} wurde aus Lysaten von Wildtyphefen durch IgG-Sepharose gefällt (IP). Kopräzipitiertes VSV-CDC48 konnte im anti-VSV-Immunoblot nachgewiesen werden. INPUT zeigt 10% des eingesetzten Zellysats. **c.** NPL4 interagiert mit UFD1 und CDC48. NPL4^{myc} wurde aus Lysaten der angegebenen Hefestämme durch anti-myc-Antikörper gefällt und auf kopräzipitiertes UFD1 oder CDC48 untersucht. Eine Wechselwirkung von NPL4 und CDC48 kann in *ufd1-2*-Hefezellen nicht detektiert werden. Überexpression von UFD1 (*UFD1 O/E*) fördert dagegen die Bildung des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes. **d.** Hypothetisches Modell des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes.

Die genetische Interaktion von *CDC48*, *UFD1* und *NPL4* führte zu der Annahme, daß diese Proteine einen ternären Komplex ausbilden. Um dies zu überprüfen, wurden Koimmunpräzitationsanalysen durchgeführt (Abb. 2-4b,c). *UFD1* wurde chromosomal mit einem Protein A-Epitop markiert. Da UFD1^{ProtA}-exprimierende Hefezellen keinen Wachstumsdefekt zeigten, wurde die essentielle Funktion von UFD1 durch die Epitopmarkierung nicht gestört. Gleiches gilt für die später beschriebenen Hefezellen, in denen *UFD1*, *NPL4* und *CDC48* mit verschiedenen Epitopen markiert wurden (Daten nicht gezeigt). UFD1^{ProtA} wurde mittels IgG-Sepharose aus Lysaten von Wildtyphefen gereinigt. In den Immunpräzipitaten kann VSV-CDC48 detektiert werden, was die bekannte Wechselwirkung von UFD1 und CDC48 bestätigt (Abb. 2-4b).

NPL4^{3myc}-exprimierende Zellen wurden zusätzlich mit einem ^{3HA}UFD1- und/oder mit einem ^{VSV}CDC48- exprimierenden Plasmid transformiert. Anschließend wurde NPL4^{3myc} durch anti-myc-Immünpräzipitation aus den entsprechenden Zellysaten isoliert und auf gebundenes UFD1 bzw. CDC48 überprüft. Dabei wurde deutlich, daß neben UFD1 auch CDC48 mit NPL4 interagiert (Abb. 2-4c). Die Wechselwirkung von NPL4 und CDC48 ist in *ufd1-2*-Mutanten gestört und bei UFD1-Überexpression vermehrt zu beobachten. Dies bedeutet, daß NPL4 mit UFD1 und CDC48 einen ternären Komplex ausbildet, in den es durch UFD1 rekrutiert wird. Da CDC48 vermutlich die katalytische Aktivität des Komplexes bestimmt (siehe Abb. 2-10), wird dieser im folgenden als CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex bezeichnet. Eine schematische Darstellung des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes zeigt Abbildung 2-4d.

2.2 Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex findet sich im Zytoplasma und an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums

Wie bereits erwähnt, ist CDC48 für die homotypische Fusion von ER-Membranen essentiell. Während dieses Vorgangs bindet CDC48 stabil an ER-Membranen (Latterich et al., 1995; Patel et al., 1998). CDC48 lokalisiert zudem im Nukleus, was durch Phosphorylierung eines C-terminalen Tyrosinrestes reguliert werden könnte (Madeo et al., 1998; Meyer et al., 2000). Dagegen war über die Lokalisation von UFD1 und NPL4 wenig bekannt.

Um die zelluläre Lokalisation dieser Proteine zu untersuchen, wurden *UFD1* und *NPL4* in WT-Zellen, in *ufd1-2*- (nur *NPL4*), *npl4-1*- (nur *UFD1*) und in *cdc48-6*-Mutanten chromosomal mit einem myc-Epitop fusioniert. Die entsprechenden Hefestämme wurden in der exponentiellen Wachstumsphase mit Formaldehyd fixiert und durch indirekte anti-myc-Dekonvolutionsimmunfluoreszenz analysiert (Abb. 2-5a). UFD1^{3myc} akkumuliert im Zellkern, während NPL4^{3myc} sich im Zellkern sowie unregelmäßig an der Peripherie des Nukleus befindet. Die Lokalisation von NPL4 stimmt mit der beschriebenen Assoziation des Proteins mit der Kernpore überein (DeHoratius und Silver, 1996; Hitchcock et al., 2001). Im Gegensatz zu UFD1^{3myc} ist die zelluläre Lokalisation von NPL4^{3myc} in *ufd1-2*- sowie in *cdc48-6*-Mutanten verändert. NPL4^{3myc} zeigt in *cdc48-6*-Mutanten eine diffuse Akkumulation innerhalb des Zellkerns, während in *ufd1-2*-Mutanten ein auffällige zytoplasmatische Mislokalisierung des Proteins zu beobachten ist. Die Bindung an UFD1 bestimmt daher die intrazelluläre Lokalisation von NPL4 und erlaubt dessen Rekrutierung in den CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex.

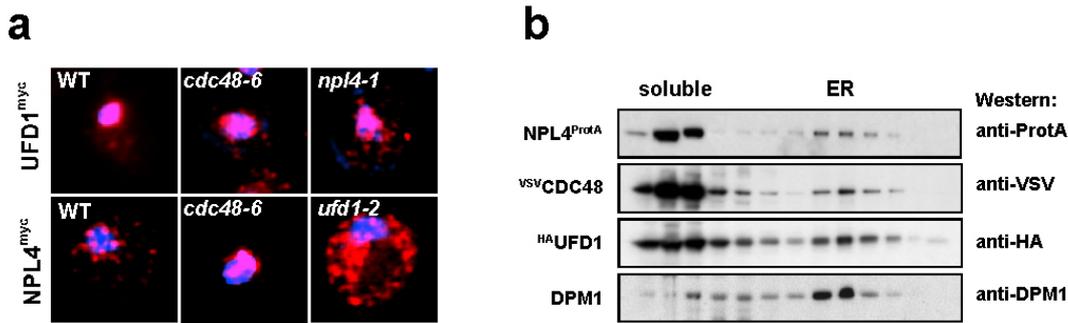


Abbildung 2-5: Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex lokalisiert vermehrt im Zellkern und an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. a. Intrazelluläre Lokalisation von UFD1 und NPL4. UFD1 und NPL4 wurden in den angegebenen Hefestämmen mit einem myc-Epitop fusioniert und nach Fixierung durch indirekte anti-myc-Dekonvolutionsimmunfluoreszenzmikroskopie detektiert. b. Lokalisation des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes im Sukrosegradienten. Die Fraktionen eines 18-54%-Sukrosegradienten wurden auf Epitop-markierte Proteine des Komplexes mit Hilfe spezifischer Immunoblots untersucht. Fraktionen des Endoplasmatischen Retikulums wurden aufgrund der Immunreaktivität gegen das integrale ER-Membranprotein DPM1 identifiziert.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzdaten konnte eine Assoziation des gesamten CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes mit der ER-Membran nicht geklärt werden. Es wurden daher Lysate von ^{HA}UFD1-, ^{VSV}CDC48- und NPL4^{ProtA}-exprimierenden Hefezellen im Sukrosegradienten aufgetrennt. Alle Proteine des Komplexes kofraktionierten (Abb. 2.5b). Sie wurden in löslichen Fraktionen und in Fraktionen, die immunreaktiv gegen das integrale ER-Membranprotein DPM1 sind, detektiert. Der ternäre CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex findet sich daher im Zytoplasma sowie an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Somit kolokalisiert CDC48^{UFD1/NPL4} mit SPT23 p120/p90-Komplexen.

2.3 Alle Komponenten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes sind Bestandteile des Ubiquitin/Proteasom-Systems

UFD1 und CDC48 werden für den Abbau des synthetischen Substrates Ubiquitin-Prolin-Galaktosidase (Ubi-Pro gal) benötigt (Johnson et al., 1995; Ghislain et al., 1996). Durch den Prolinrest wird die Abspaltung des N-terminal fusionierten Ubiquitins durch Ubiquitin-Hydrolasen verlangsamt, sodaß Ubi-Pro gal als monoubiquitiniertes Protein in *S. cerevisiae* exprimiert wird (Bachmair et al., 1986). Es wird jedoch schnell durch Komponenten des UFD-Weges erkannt, multiubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom abgebaut (Johnson et al., 1995). Um zu überprüfen, ob neben UFD1 und CDC48 auch NPL4 für den Abbau von Ubi-Pro gal benötigt wird, wurden *Pulse-Chase*-Experimente durchgeführt. Die Menge an ³⁵S-markiertem Ubi-Pro gal wurde in einer *Chase*-Periode von 30 Minuten durch Immunpräzipitation gegen Galaktosidase analysiert (Abb. 2-6a). Ubi-Pro gal ist in

npl4-1-Mutanten analog zu *ufd1-2*-Mutanten in ubiquitiniertes Form stabilisiert. Dies wurde ebenso für *cdc48-6*-Mutanten beschrieben (Ghislain et al., 1996; Koegl et al., 1999). Dies bedeutet, daß der gesamte CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex für den Abbau dieses Substrats benötigt wird.

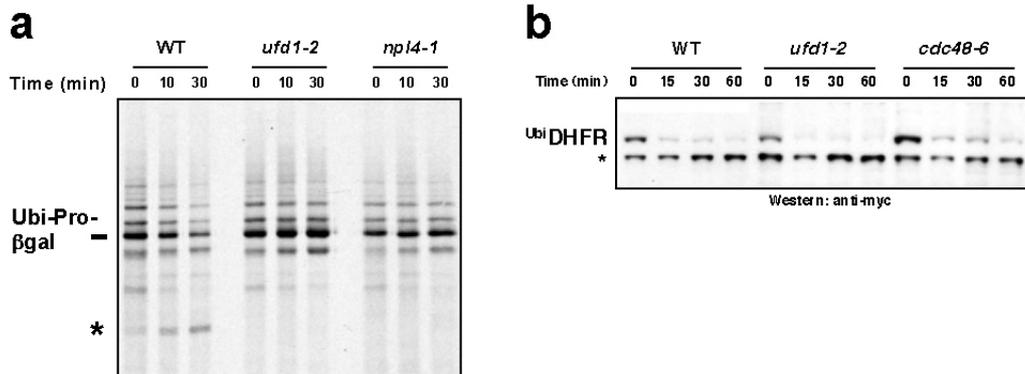


Abbildung 2-6: Der gesamte CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex wird zum Abbau eines oligomeren Modellsubstrates benötigt. a. Pulse-Chase-Analyse der Stabilität des oligomeren Proteins Ubi-Pro gal in WT-Zellen und in *ufd1-2*- und *npl4-1*-Mutanten. ³⁵S-markiertes Ubi-Pro gal wurde nach Zugabe nichtradioaktiven Methionins zu verschiedenen Zeitpunkten mit anti-gal-Antikörpern immunpräzipitiert und nach denaturierender Gelelektrophorese im Autoradiogramm analysiert. Der Stern markiert ein charakteristisches Zwischenprodukt des Abbaus von Ubi-Pro gal. **b.** Promoter-Shutoff-Analyse der Stabilität des monomeren Modellsubstrates Ubi-DHFR^{myc} in WT, *ufd1-2*- und *cdc48-6*-Hefezellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Wechsel zu glukosehaltigem Medium wurden Proben entnommen und nach denaturierender Proteinfällung und Gelelektrophorese im anti-myc-Immunoblot analysiert. Der Stern markiert eine kreuzreaktive Bande des anti-myc-Antikörpers.

Die Funktion des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes im Abbau ubiquitiniertes Substrate wurde mit Hilfe eines weiteren artifiziellen Substrates, Ubi-DHFR, untersucht. Im Gegensatz zur tetrameren Galaktosidase ist die Dihydrofolatreduktase (DHFR) ein monomeres Protein. Ubi-DHFR wurde unter Kontrolle des *GAL1,10*-Promotors in galaktosehaltigem Medium exprimiert. Dieser Promotor wird durch Zugabe von Glukose zum Wachstumsmedium effizient reprimiert (*Promoter-Shutoff*). Zusätzlich wird die Translation bereits vorhandener mRNA durch Zugabe von Cycloheximid inhibiert. Untersucht man unter diesen Bedingungen den Abbau von Ubi-DHFR, so erkennt man, daß es weder in *ufd1-2*- noch in *cdc48-6*-Mutanten signifikant stabilisiert wird (Abb. 2-6b). Die Deletion des für den Abbau von Ubi-DHFR benötigten E3-Enzyms *UFD4* stabilisiert das Protein (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung damit wird CDC48^{UFD1/NPL4} auch für den Abbau des monomeren Substrats Ubi-GFP nicht benötigt (Bays et al., 2001). Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex wirkt im Ubiquitin/Proteasom-System daher als funktionelle Einheit, deren Aktivität primär gegen oligomere Proteine gerichtet sein könnte.

2.4 CDC48, UFD1 und NPL4 sind Komponenten des OLE-Wegs

Aufgrund der genetischen Daten wurde bereits vermutet, daß CDC48 membranständige SPT23 p90/p120-Komplexe disassemblieren könnte. Es wurde deshalb untersucht, ob alle Komponenten der CDC48-Maschinerie für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors benötigt werden. SPT23 und MGA2 wurden als Überexpressions-Suppressoren der *ufd1-2*-Mutante identifiziert (Hoppe et al., 2000). In gleicher Weise ließen sich *npl4-1*-Mutanten durch Überexpression von C-terminal verkürzten SPT23- und MGA2-Konstrukten retten (Abb. 2-7a). Der *npl4-1*-Hefestamm kann zusätzlich durch heterologe Expression von *OLE1* oder durch Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium supprimiert werden, sodaß *NPL4* eindeutig dem OLE-Weg zugeordnet werden kann (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise lassen sich weder *npl4-1*- noch *ufd1-2*-Mutanten durch Überexpression von Vollängen-SPT23 retten, was auf eine essentielle Funktion des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes während oder nach der Prozessierung des Transkriptionsfaktors schließen läßt. CDC48 besitzt hingegen neben seiner Funktion im Ubiquitin/Proteasom-System eine essentielle Aufgabe in der homotypischen Membranfusion (Latterich et al., 1995). Daher reicht die Überexpression von *SPT23* oder *OLE1* bzw. die Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium nicht aus, um die *cdc48-6*-Mutante zu retten. Kreuzt man allerdings den *cdc48-6*-Hefestamm mit thermosensitiven Mutanten der für die SPT23-Aktivierung essentiellen Ubiquitin-Ligase RSP5 (*rsp5-2*), so beobachtet man einen synthetischen Wachstumsdefekt der Doppelmutante. Dieser synthetische Effekt konnte durch Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium unterdrückt werden konnte (Abb. 2-7b), wodurch auch CDC48 als Komponente des OLE-Wegs identifiziert wurde. Dies bedeutet, daß der gesamte CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex für die Aktivierung des SPT23-Transkriptionsfaktors benötigt wird.

Um dies direkt zu untersuchen, wurde ein *OLE1*-Reporterkonstrukt hergestellt (Abb. 2-7c). In diesem befindet sich *lacZ*, das das bakterielle Enzym Galaktosidase kodiert, unter Kontrolle des *OLE1*-Promotors. Analog zur Transkription von *OLE1 in vivo*, wird die enzymatische Aktivität des Reporters durch Zugabe von ungesättigten Fettsäuren zum Wachstumsmedium unterdrückt (Gonzalez und Martin, 1996; Gorr, 2001). Zudem wird die Aktivität des Reporters durch Überexpression von SPT23 oder MGA2 deutlich verstärkt (Gorr, 2001). Das *OLE1*-Reporterkonstrukt kann demnach als Maß der SPT23-Aktivität dienen. Thermosensitive *ufd1-2*-, *npl4-1*- und *cdc48-6*-Mutanten wurden mit dem Reporterkonstrukt transformiert und auf Expression des Reportergens *lacZ* im anti-Galaktosidase-Immunoblot untersucht (Abb. 2-7d). Die Expression des Reporters ist in allen Mutanten nach einem Wechsel von der permissiven (23°C) zur restriktiven (37°C) Wachstumstemperatur deutlich

verringert. Gleiches lässt sich weder in Wildtyp-Zellen noch bei Genen, die nicht durch SPT23 reguliert werden (*PGK1*), beobachten. Dies bestätigt, daß alle Komponenten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes für die Aktivierung von SPT23 und damit für die Transkription von *OLE1* benötigt werden.

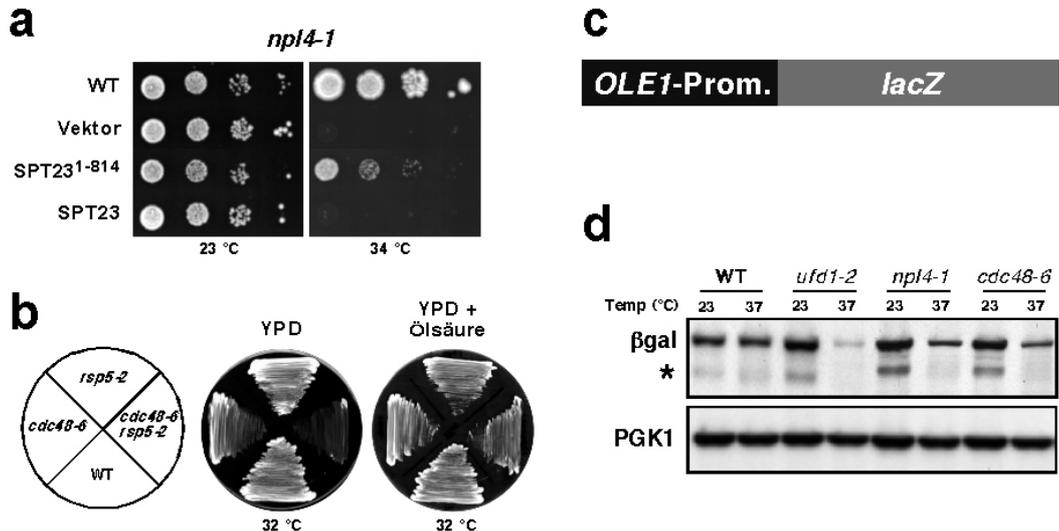


Abbildung 2-7: Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex besitzt eine essentielle Funktion im OLE-Weg. a. *npl4-1*-Mutanten lassen sich durch Überexpression C-terminal-verkürzter SPT23-Konstrukte (z.B. SPT23¹⁻⁸¹⁴) retten. Vollängen-SPT23 hat keinen supprimierenden Effekt. Die mit den entsprechenden Konstrukten transformierten *npl4-1*-Zellen wurden auf YPGal-Platten für 3 Tage bei 23°C bzw. bei 34°C inkubiert. Mit leerem Plasmid transformierte WT-Hefezellen dienten als Wachstumskontrolle. **b.** *cdc48-6* und *rsp5-2*-Mutanten zeigen nach Kreuzung einen synthetischen Wachstumsdefekt, der durch Zugabe von Ölsäure zum Medium supprimiert wird. Die angegebenen Hefestämme wurden drei Tage bei 32°C auf YPD- bzw. YPD+Ölsäure-Platten inkubiert. Alle Hefestämme sind bei Raumtemperatur lebensfähig. **c.** Das *OLE1*-Reporterkonstrukt *lacZ*, das Gen des bakteriellen Enzyms Galaktosidase, wird unter Kontrolle des *OLE1*-Promotors exprimiert. **d.** Die Expression des Reporters *lacZ*, die im anti-gal-Immunoblot detektiert wurde, ist in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes bei der restriktiven Temperatur (37°C) verringert. Bei permissiver Temperatur (23°C) ist kein Unterschied zu Wildtyphefen zu beobachten. Als Kontrolle wurde die Immunreaktivität gegen die SPT23-unabhängig regulierte Phosphoglyceratkinase (PGK1) untersucht.

2.5 Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex ist für die Prozessierung von SPT23 nicht essentiell

Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex ist demnach für die Synthese des aktiven SPT23-Transkriptionsfaktors in einem eng mit dessen proteasomaler Prozessierung verknüpften Schritt essentiell. Alternativ zu einer aktiven Beteiligung an der Prozessierung könnte CDC48 die Loslösung des prozessierten SPT23 p90 aus den stabilen, membranständigen SPT23 p120/p90-Komplexen vermitteln.

Um diese Möglichkeiten voneinander zu unterscheiden, wurden Zellextrakte aus Mutanten der CDC48-Maschinerie sowie aus Deletionsmutanten der Ubiquitin-Ligase *RSP5* in Immunoblots gegen ^{myc}SPT23^{HA} untersucht. Da die durch *RSP5* katalysierte Ubiquitinierung für die Prozessierung von SPT23 essentiell ist, kann in Extrakten der Δ *rsp5*-Hefezellen kein SPT23 p90 detektiert werden (Abb. 2-8a). Im Gegensatz dazu ist die Menge des prozessierten Transkriptionsfaktors in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes im Vergleich zu Wildtyphefen kaum verringert. Allerdings reichert sich in *ufd1-2*-, *npl4-1*- und *cdc48-6*-Mutanten Vollängen-SPT23 etwas an. Interessanterweise beobachtet man hier zusätzlich eine modifizierte Form von SPT23 p120 (siehe später). Die Expressionsstudien deuten darauf hin, daß der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex an der SPT23-Prozessierung beteiligt sein könnte, dort aber keine essentielle Funktion einnimmt.

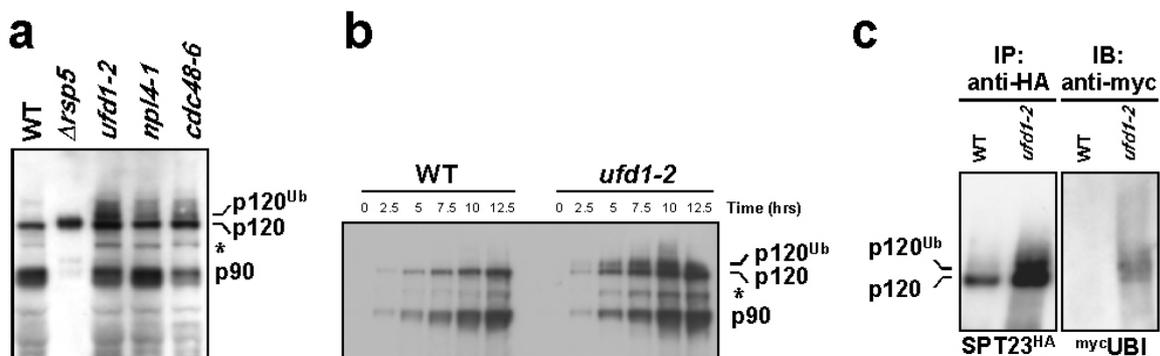


Abbildung 2-8: Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex ist für die SPT23-Prozessierung nicht essentiell. a. Expression von ^{myc}SPT23^{HA} in der Deletionsmutante der Ubiquitin-Ligase *RSP5* (Δ *rsp5*) sowie in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes. SPT23 p90 kann in Mutanten der CDC48-Maschinerie, nicht aber im Δ *rsp5*-Hefestamm im anti-myc-Immunoblot detektiert werden. **b.** Induktion der SPT23-Expression nach *UFD1*-Inaktivierung. Die Expression von ^{myc}SPT23^{HA} in WT sowie im *ufd1-2*-Stamm wurde bei 37°C (d.h. der restriktiven Temperatur des *ufd1-2*-Stammes) durch Zugabe von Galaktose induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proteinproben entnommen und im anti-myc-Immunoblot auf SPT23 hin untersucht. Im *ufd1-2*-Stamm wird eine modifizierte Form des nicht-prozessierten Transkriptionsfaktors detektiert. **c.** SPT23 p120 akkumuliert mono/oligoubiquitiniert in *ufd1-2*-Zellen. SPT23^{HA} und ^{myc}Ubiquitin wurden in WT- und *ufd1-2*-Hefezellen bei 37°C exprimiert. SPT23^{HA} wurde aus Lysaten dieser Hefestämme unter stringenten Bedingungen durch anti-HA-Antikörper gefällt und auf ^{myc}Ubiquitin hin untersucht. Die modifizierte Bande von SPT23 p120 ist reaktiv gegen Ubiquitin und zeigt daher mono/oligoubiquitiniertes SPT23 p120.

Diese Vermutung wurde durch Induktionsexperimente bestätigt (Abb. 2-8b). Wildtyp-Hefen sowie *ufd1-2*-Mutanten wurden mit einem ^{myc}SPT23^{HA}-Expressionskonstrukt unter der Kontrolle des *GAL1,10*-Promotors transformiert und in raffinosehaltigem Wachstumsmedium bei der für *ufd1-2*-Mutanten restriktiven Temperatur (37°C) inkubiert. Um sekundäre Effekte auszuschließen, wurde dem Wachstumsmedium

Ölsäure zugegeben, sodaß *ufd1-2*-Mutanten trotz des Fehlens funktionellen UFD1-Proteins lebensfähig sind. Anschließend wurde die Expression von SPT23 durch Wechsel zu galaktosehaltigem Wachstumsmedium induziert. Auch unter Bedingungen, in denen UFD1 bereits zu Beginn der SPT23-Expression inaktiviert ist, ist die Menge an prozessiertem SPT23 im Vergleich zu Wildtyphefen nicht verringert. CDC48^{UFD1/NPL4} ist daher für die Prozessierung des Transkriptionsfaktors nicht essentiell und wird für nachfolgende Schritte benötigt.

Interessanterweise wurde in *ufd1-2*-Mutanten eine modifizierte Form des nicht-prozessierten Transkriptionsfaktors beobachtet. Diese Spezies ist insensitiv gegenüber Behandlung mit Alkalischer Phosphatase und repräsentiert demnach keine phosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors (Daten nicht gezeigt). Expression von ^{myc}Ubiquitin und anschließende stringente Immunpräzipitation von SPT23^{HA} mit Hilfe monoklonaler anti-HA-Antikörper zeigte dagegen, daß es sich hierbei um mono/oligoubiquitiniertes SPT23 p120 handelt (Abb. 2-8c). Die Funktion der Mono/Oligoubiquitinierung ist gegenwärtig jedoch unklar.

2.6 Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex ist für die Mobilisierung von prozessiertem SPT23 p90 essentiell

Die bisher gezeigten Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen: SPT23 wird an der ER-Membran nach Dimerisierung durch das 26S-Proteasom prozessiert. Dies resultiert in ER-ständigen, stabilen SPT23 p90/p120-Komplexen. CDC48^{UFD1/NPL4} bindet an ER-Membranen und wird für die vollständige Aktivierung des Transkriptionsfaktors, nicht aber für dessen Prozessierung benötigt. Es liegt daher nahe, daß CDC48^{UFD1/NPL4} den prozessierten Transkriptionsfaktor aus dessen membranständigem Komplex mobilisieren könnte.

Einen deutlichen Hinweis darauf lieferte die Analyse der intrazellulären Lokalisierung von SPT23 p90 (Abb. 2-9a,b). Nach Expression von ^{myc}SPT23^{HA} kann der prozessierte Transkriptionsfaktor durch eine gegen das N-terminale myc-Epitop gerichteten Immunfluoreszenz detektiert werden. Mit Hilfe des C-terminalen HA-Epitops läßt sich dagegen spezifisch SPT23 p120 nachweisen (Abb. 2-9a). Während der prozessierte Transkriptionsfaktor in Wildtypzellen im Zellkern akkumuliert, bestätigt die gegen den C-Terminus gerichtete anti-HA-Immunfluoreszenz die ER-Lokalisation der Vollängenversion p120 (Abb. 2-9a). Obwohl SPT23 in *ufd1-2*-, *npl4-1*- und *cdc48-6*-Mutanten prozessiert wird, kann die prozessierte Form des Transkriptionsfaktors nicht im Zellkern beobachtet werden (Abb. 2-9b). Stattdessen akkumuliert SPT23 p90 in allen Mutanten an der ER-Membran und ist dadurch in Übereinstimmung mit den genetischen Experimenten inaktiv. CDC48^{UFD1/NPL4} wird für die Translokation von SPT23 p90 in den Zellkern benötigt.

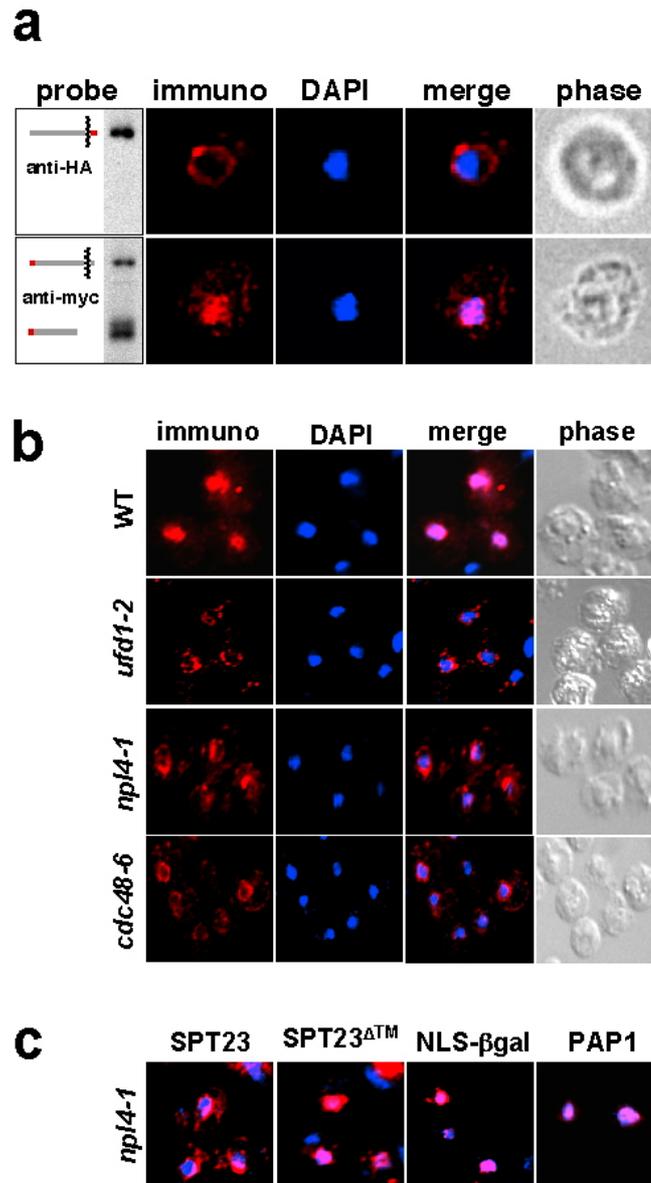


Abbildung 2-9: CDC48^{UFD1/NPL4} ist für die Lokalisierung des prozessierten SPT23 p90 im Zellkern essentiell. **a.** Lokalisierung von ^{myc}SPT23^{HA}. Vollängen-SPT23 kann durch Immunfluoreszenz gegen das C-terminale HA-Epitop am ER detektiert werden. Prozessiertes SPT23 p90 wird mit Hilfe des N-terminalen myc-Epitops im Zellkern nachgewiesen. **b.** Lokalisierung von SPT23 p90 in WT, *ufd1-2*-, *npl4-1*- und *cdc48-6*-Zellen. ^{myc}SPT23^{HA} wurde in den entsprechenden Mutanten exprimiert und mit Hilfe des myc-Epitops durch indirekte Immunfluoreszenz detektiert. SPT23 p90 akkumuliert in WT-Zellen im Zellkern, in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes dagegen an der ER-Membran. **c.** Lokalisierung mehrerer Kernimportsubstrate in *npl4-1*-Mutanten. ^{myc}SPT23TM, NLS-βgal und PAP1^{myc} wurden durch indirekte Immunfluoreszenz gegen das myc-Epitop bzw. gegen βgal detektiert. Die Ergebnisse gleichen sich in *ufd1-2*-, *npl4-1*- und *cdc48-6*-Hefestämmen (Daten nicht gezeigt). Der Kernimport ist in den Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes nicht generell inhibiert.

Die Mislokalisierung von SPT23 p90 kann durch gestörten Kerntransport oder durch inhibierte Mobilisierung aus ER-ständigen SPT23 p90/p120-Komplexen erklärt werden. Da *npl4-1* als Mutante mit defektem Kernimport isoliert wurde (DeHoratius und Silver, 1996), wurde zunächst die Funktion des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes in Kerntransportprozessen untersucht (Abb.2-9c). Sekundäre Effekte, die aufgrund der Veränderung der Membranzusammensetzung nach Abschalten des OLE-Wegs auftreten könnten, wurden durch Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium zurückgedrängt.

Es wurde die Lokalisation mehrerer Konstrukte in *ufd1-2*-, *npl4-1*- und *cdc48-6*-Mutanten analysiert: (a) NLS- gal, in dem eine klassische Kernimportsequenz mit dem heterologen Protein Galaktosidase fusioniert wurde (Nehrbass et al., 1993). (b) SPT23TM, in dem der Membrananker von SPT23 deletiert und der Transkriptionsfaktor damit von der Notwendigkeit der Prozessierung befreit wurde (Hoppe et al., 2000). (c) PAP1^{3myc}, die in Wildtyphefen sich im Zellkern befindende PolyA-Polymerase (Preker et al., 1997). Alle untersuchten Protein akkumulieren in Wildtyphefen im Zellkern (Daten nicht gezeigt). Diese Lokalisation ist weder in *ufd1-2*-, *npl4-1*- noch *cdc48-6*-Mutanten verändert, wodurch eine essentielle Funktion des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes im Kerntransport der untersuchten Substrate ausgeschlossen werden kann (Abb. 2-9c). Während prozessiertes SPT23 p90 in Mutanten der CDC48-Maschinerie an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums akkumuliert, ist der Kerntransport von SPT23TM unter diesen Bedingungen nicht inhibiert. Die durch den CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex vermittelte Reaktion in der Reifung des SPT23-Transkriptionsfaktors findet daher an der ER-Membran statt. Da die SPT23-Prozessierung in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes nicht inhibiert ist, deutet dies stark auf eine CDC48-Aktivität in der Mobilisierung des membrangebundenen, prozessierten SPT23 p90 hin.

Um die vermutete SPT23 p90-Mobilisierungsaktivität des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes zu analysieren, wurde ein *in vitro*-Mobilisierungssystem etabliert. ER-Membranen aus ^{myc}SPT23^{HA}-exprimierenden Hefezellen wurden durch Zentrifugation isoliert. Sowohl UFD1 als auch NPL4 sind in diesen Membranpräparationen vorhanden (s. Abb. 2-13). Die Membranen wurden in Gegenwart von ATP mit steigenden CDC48-Konzentrationen kurz inkubiert und erneut zentrifugiert. Der Anteil an gelöstem und an in der Membran zurückgehaltenem SPT23 p90 wurde anschließend in einem anti-myc-Immunoblot analysiert (Abb. 2-10). Die Experimente zeigen, daß sowohl Lysat von CDC48-exprimierenden Insektenzellen als auch aus Bakterien gereinigtes CDC48 in der Lage sind, SPT23 p90 dosisabhängig von der ER-Membran zu mobilisieren (Abb. 2-10a, b). Die Reaktion ist ATP-abhängig, da sie durch Apyrase-vermittelte ATP-Depletion inhibiert werden kann. Ebenso kann N-Ethylmaleimid, ein potenter Inhibitor NSF-homologer AAA-ATPasen, die

Mobilisierungsreaktion vollständig blockieren. Hohe Konzentrationen an Lysat von Insektenzellen, die kein CDC48 exprimierten, oder des CDC48-Homologen VAT zeigen keine Aktivität (Abb. 2-10a *control* ; Daten nicht gezeigt). Werden Membranen aus *npl4-1*-Mutanten isoliert, so ist alleinige Zugabe von CDC48 weit weniger effizient (Abb. 2-10b). Dies bedeutet, daß der gesamte CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex für die vollständige Aktivität benötigt wird. SPT23 p90 wird durch die stabile Interaktion mit Vollängen-SPT23 an der ER-Membran zurückgehalten. Die Daten deuten darauf hin, daß CDC48^{UFD1/NPL4} in der Lage ist, ATP-abhängig diese SPT23-Komplexe zu disassemblieren. Aufgrund dieser Eigenschaft kann CDC48^{UFD1/NPL4} als Segregase bezeichnet werden.

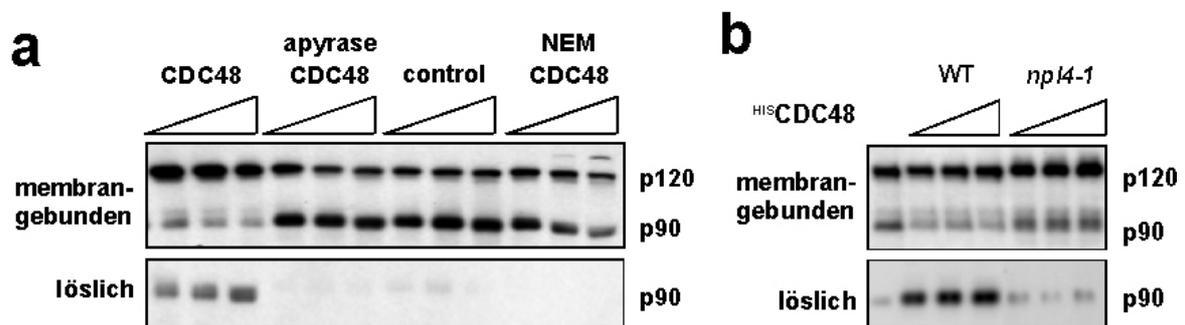


Abbildung 2-10: Mobilisierung von SPT23 p90 durch CDC48. **a.** Membranständige SPT23 p120/p90-Komplexe werden CDC48-abhängig disassembliert. ER-Membranen wurden durch Zentrifugation isoliert und mit steigenden Konzentrationen CDC48 aus Insektenzellysate in Gegenwart von ATP inkubiert. Nachdem die Reaktionen erneut in lösliche und membranassoziierte Fraktion aufgetrennt worden waren, wurde SPT23 p90 im anti-myc-Immunoblot detektiert. Zugabe von steigenden Mengen des Lysats CDC48-exprimierender Insektenzellen führte zu einem Transfer des membrangebundenen SPT23 p90 in die lösliche Fraktion. CDC48 konnte durch Behandlung mit Apyrase (d.h. durch ATP-Depletion) oder NEM inhibiert werden. Ein Kontrolleextrakt hatte keine Mobilisierungsaktivität. **b.** Bakteriell gereinigtes CDC48 wurde mit Membranen aus WT- oder *npl4-1*-Hefezellen inkubiert. In *npl4-1*-Mutanten ist die Mobilisierung durch gereinigtes CDC48 deutlich ineffizienter.

3. CDC48^{UFD1/NPL4} bindet Ubiquitin

3.1 CDC48^{UFD1/NPL4} bindet ubiquitinierte Proteine *in vivo*

Als Transkriptionsfaktor wird SPT23 *in vivo* nur in geringer Menge synthetisiert. Im Gegensatz dazu gehört CDC48 zu den am stärksten exprimierten Proteinen der Bäckerhefe (Fröhlich et al., 1991). Diese Diskrepanz lässt die Erkennung von SPT23 durch CDC48 mittels eines SPT23-spezifischen Merkmals unwahrscheinlich erscheinen und legt die Vermutung eines redundanteren Erkennungsmotivs, z.B. Ubiquitin, nahe.

SPT23 wird durch RSP5 ubiquitiniert und durch proteasomale Prozessierung aktiviert. CDC48^{UFD1/NPL4} mobilisiert anschließend SPT23 p90 aus stabilen membranständigen Komplexen. Um zu überprüfen, ob das von CDC48 erkannte SPT23 p90 noch ubiquitiniert ist, wurden His-Ubiquitin und mycSPT23^{HA} in Hefezellen koexprimiert. Die Hefezellen wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen, Ubiquitinkonjugate durch Bindung an magnetische NiNTA-Perlen in Gegenwart des Denaturierungsmittels isoliert und folgend im anti-myc-Immunoblot auf mycSPT23^{HA} hin untersucht. Sowohl SPT23 p120 als auch SPT23 p90 sind in den angereicherten Ubiquitinkonjugaten nachweisbar und liegen daher zumindest teilweise ubiquitiniert vor (Abb. 2-11a). Im Vergleich zum Totalextrakt sind beide Gelbanden zu geringerer Mobilität verschoben, was durch die Anreicherung von konjugiertem SPT23 im Vergleich zum nicht-konjugierten Protein bzw. durch die His-Markierung des Ubiquitins erklärt werden kann. Interessanterweise zeigen sowohl SPT23 p120 als auch SPT23 p90 im anti-myc-Immunoblot relativ distinkte Banden, die eine heterogene Multiubiquitinierung beider SPT23-Formen unwahrscheinlich erscheinen lassen. SPT23 p90 behält die Ubiquitinmodifikation auch nach der Prozessierung und wird als mono/oligoubiquitiniertes Protein von CDC48 erkannt.

Die Ubiquitinierung von SPT23 p90 könnte jedoch erst nach der Mobilisierung erfolgt sein, um den Abbau des löslichen SPT23 p90 zu vermitteln. Um dies zu untersuchen, wurden SPT23 p90 und p120 aus der solubilisierten Membranfraktion gefällt und mit Hilfe von Ubiquitin-Antikörpern analysiert. Es zeigte sich erneut die Ubiquitinierung von SPT23 p90 (Abb. 2-11b). Dagegen kann ubiquitiniertes SPT23 p120, das während der Fällung gegen Ubiquitin-Hydrolasen anfälliger zu sein scheint, nicht mehr detektiert werden. SPT23 p90 ist demnach bereits an der ER-Membran ubiquitiniert und wird von CDC48 als Ubiquitinkonjugat erkannt.

Um zu überprüfen, ob CDC48 ubiquitiniertes SPT23 p90 direkt erkennt, wurde mobilisiertes SPT23 p90 nach Abtrennung der Membranfraktion durch anti-myc-Antikörper gefällt. In den Immunpräzipitaten konnte gebundenes vsvCDC48 nachgewiesen werden (Abb. 2-11c). Wird die Immunpräzipitation mit nicht

prozessiertem und vermutlich nicht ubiquitiniertem SPT23TM durchgeführt, so findet sich deutlich weniger CDC48 in den Präzipitaten. CDC48 interagiert daher vorwiegend mit prozessiertem, ubiquitiniertem SPT23. Dies deutet auf eine Erkennung der Ubiquitinmodifikation durch CDC48 hin.

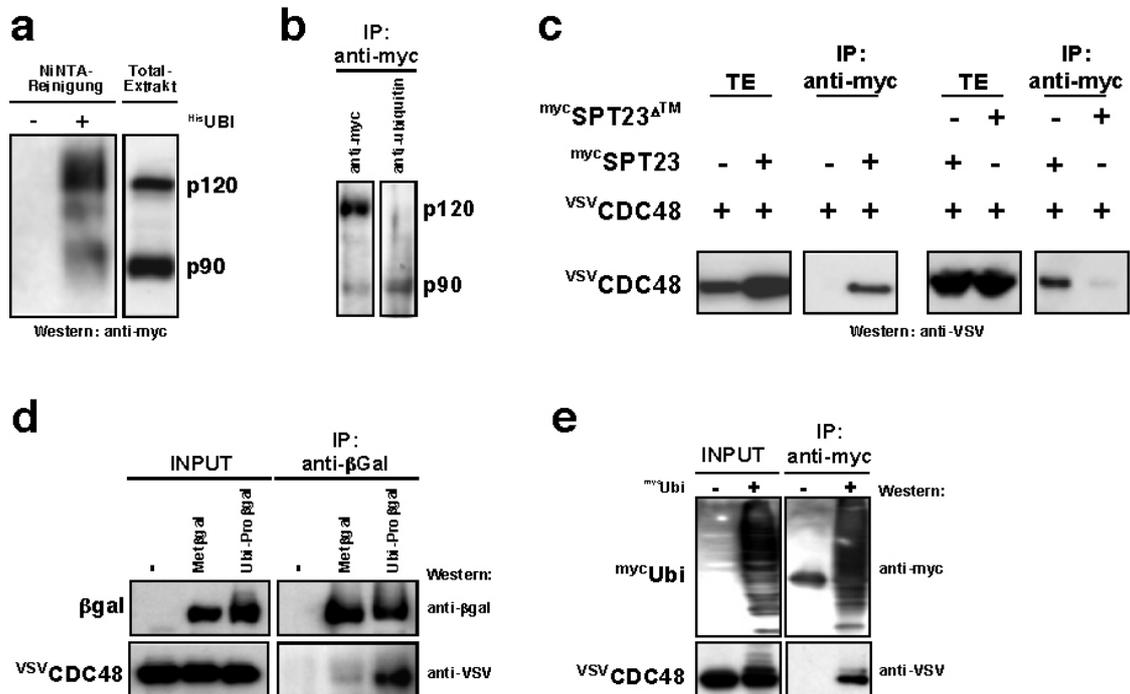


Abbildung 2-11: CDC48 bindet ubiquitinierte Proteine. **a.** SPT23 p90 ist ubiquitiniert. Mit ^{His}Ubiquitin konjugierte Proteine wurden denaturierend über NiNTA-Perlen gereinigt und nachfolgend im anti-myc-Immunoblot auf ^{myc}SPT23^{HA} hin untersucht. SPT23 p90 sowie p120 sind in den Ubiquitinkonjugatreinigungen enthalten und zeigen relativ distinkte Banden. **b.** Membranständiges SPT23 p90 ist ubiquitiniert. ^{myc}SPT23^{HA} p90 und p120 wurden aus Membranfraktionen durch anti-myc-Antikörper gefällt und im anti-Ubiquitin-Immunoblot analysiert. SPT23 p90 ist stabil ubiquitiniert. **c.** CDC48 interagiert mit ubiquitiniertem SPT23 p90 und kaum mit nicht-ubiquitiniertem SPT23TM. ^{myc}SPT23 p90 bzw. ^{myc}SPT23TM wurden nach Abtrennung der Membranfraktion mit Hilfe des N-terminalen myc-Epitops gefällt. Die Präzipitate wurden auf gebundenes ^{VSV}CDC48 im anti-VSV-Immunoblot untersucht. CDC48 interagiert effizienter mit SPT23 p90 als mit SPT23TM. **d.** CDC48 interagiert mit Ubi-Pro gal und kaum mit Met gal. Ubi-Pro gal und Met gal, dessen N-terminales Ubiquitin kotranslational abgespalten wird, wurden mit anti- gal-Antikörpern gefällt und auf gebundenes ^{VSV}CDC48 im anti-VSV-Immunoblot untersucht. **e.** CDC48 interagiert mit Ubiquitin-Konjugaten *in vivo*. Ubiquitinkonjugate wurden nach Expression von ^{myc}Ubiquitin mit anti-myc-Antikörpern präzipitiert und auf gebundenes ^{VSV}CDC48 hin untersucht.

Der Einfluß der Ubiquitinierung eines Substrates auf dessen Erkennung durch CDC48 konnte mit Hilfe artifizierlicher Substrate des Ubiquitin/Proteasom-Systems studiert werden. Im Unterschied zum bereits beschriebenen, ubiquitinierten Substrat Ubi-Pro Gal wird N-terminal fusioniertes Ubiquitin in Ubi-Met Gal kotranslational durch Ubiquitin-Hydrolasen abgespalten (Bachmair et al., 1986). Gegen

Galaktosidase gerichtete Antikörper fällen daher ubiquitiniertes Ubi-Pro Gal und nicht-ubiquitiniertes Met Gal (Abb. 2-11d). Während ^{VSV}CDC48 in den Ubi-Pro Gal-Immunpräzipitaten nachgewiesen werden kann, wird es in Met Gal-Immunfällungen kaum detektiert. CDC48^{UFD1/NPL4} scheint *in vivo* Substrate anhand deren Ubiquitinmodifikationen zu diskriminieren.

Die generelle Assoziation von CDC48 mit ubiquitinierten Proteinen wurde mit Hilfe einer gegen Ubiquitinkonjugate gerichteten Immunpräzipitation analysiert (Abb. 2-11e). Konjugate wurden aus Lysaten von Wildtyphefzellen nach Überexpression von N-terminal myc-markiertem Ubiquitin durch anti-myc-Antikörper isoliert. Da CDC48 spezifisch in den gegen Ubiquitin gerichteten Präzipitaten nachgewiesen werden kann, assoziiert es *in vivo* mit ubiquitinierten Proteinen.

3.2 CDC48 bindet ubiquitinierte Proteine *in vitro*

Die Interaktion von CDC48 mit seinem Kofaktor SHP1/p47 erfolgt über dessen UBX-Domäne, die eine ubiquitinähnliche Struktur besitzt (Buchberger et al., 2001; Braun et al., 2002). Dies legt den Schluß nahe, daß CDC48 direkt Ubiquitin binden kann, was *in vitro* unter Verwendung gereinigter Proteine untersucht wurde (Abb. 2-12). GST bzw. ^{Ubi}GST wurden immobilisiert und in Gegenwart von ATP mit gereinigtem CDC48 inkubiert. In diesen Experimenten bindet CDC48 an ^{Ubi}GST, wogegen parallel inkubiertes GST kein CDC48 zurückhalten konnte. Die Bindungsreaktion konnte durch einen Überschuß an freiem Ubiquitin kompetiert werden. CDC48 erkennt daher *in vitro* direkt die Ubiquitinierung des Fusionsproteins. Werden UFD1 und NPL4 zur Bindungsreaktion gegeben, wird die Affinität von CDC48 zu Ubiquitinkonjugaten zusätzlich gesteigert (Daten nicht gezeigt).

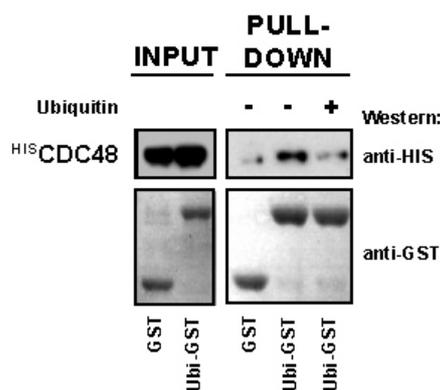


Abbildung 2-12: Gereinigtes CDC48 bindet Ubiquitin *in vitro*. GST bzw. ^{Ubi}GST wurden an Glutathionsepharose gekoppelt und mit gereinigtem ^{HIS}CDC48 inkubiert. Die Bindung der Proteine wurde durch anti-His- bzw. anti-GST-Immunoblots untersucht. ^{HIS}CDC48 wird durch Ubi-GST-Sepharose spezifisch zurückgehalten. Hohe Konzentrationen an freiem Ubiquitin inhibieren die Bindungsreaktion.

3.3 UFD1 und NPL4 regulieren die Bindung von CDC48 an Ubiquitinkonjugate *in vivo*

Die durch Kofaktoren modulierte Substratbindung einer AAA-ATPase wurde bereits beim CDC48-Homologen NSF beschrieben (Clary und Rothman, 1990). Um *in vivo* stabil mit SNARE-Proteinen zu interagieren, benötigt NSF SNAP-(soluble NSF adaptor proteins)-Proteine. Es wird ein multimerer 20S-Komplex aus NSF, SNAP und mehreren SNARE-Proteinen ausgebildet (Whiteheart et al, 1993; Söllner et al., 1993). Dies erinnert an CDC48^{UFD1/NPL4}, da CDC48 im Abbau von Ubi-Pro Gal sowie in der Mobilisierung von SPT23 p90 funktionelles UFD1 und NPL4 benötigt. Es wurde daher in unterschiedlichen Ansätzen getestet, ob CDC48 zur Substraterkennung *in vivo* der Kofaktoren UFD1 und NPL4 bedarf. Da sich viele CDC48-Substrate an der ER-Membran befinden, wurde zunächst die Assoziation des Enzyms mit intrazellulären Membransystemen in *ufd1-2*- und *npl4-1*-Mutanten analysiert. Anschließend wurde die Bindung von CDC48 an Ubiquitinkonjugate in Immunpräzipitationen analysiert.

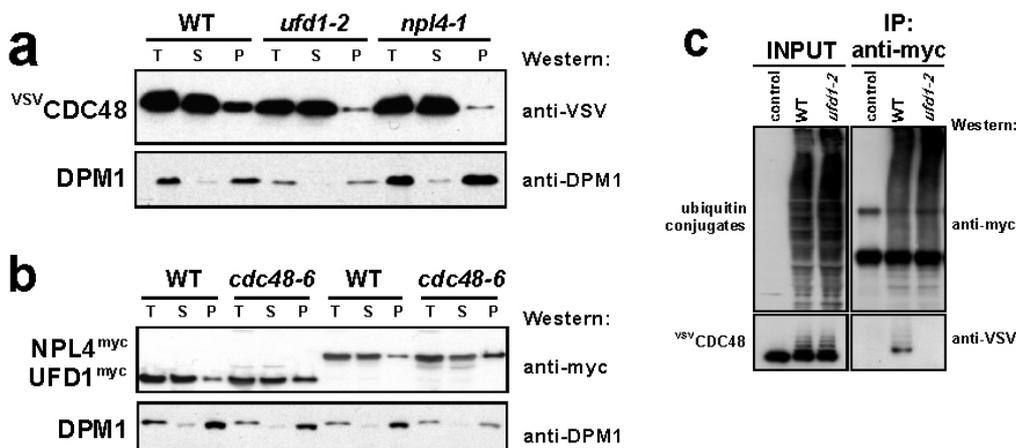


Abbildung 2-13: UFD1 und NPL4 regulieren die Substraterkennung von CDC48 *in vivo*. **a.** UFD1 und NPL4 werden für die Assoziation von CDC48 mit intrazellulären Membransystemen benötigt. Membranfraktionen wurden aus ^{vsv}CDC48 exprimierenden WT-, *ufd1-2*- und *npl4-1*-Hefezellen isoliert. Das Gesamtlysate (T) wurde in lösliche (S) und membranassoziierte (P) Fraktion durch Zentrifugation aufgetrennt und im anti-VSV-Immunoblot auf ^{vsv}CDC48 hin untersucht. Als Marker der Membranfraktionierung wurde das integrale ER-Membranprotein DPM1 detektiert. **b.** UFD1 und NPL4 akkumulieren an Membranen *in cdc48-6*-Mutanten. Die Membranfraktionierung wurde mit WT- bzw. *cdc48-6*-Hefezellen, die chromosomal myc-markiertes UFD1 oder NPL4 exprimierten, durchgeführt. UFD1^{myc} und NPL4^{myc} wurden im anti-myc-Immunoblot nachgewiesen. Als Membranmarker wurde erneut DPM1 detektiert. **c.** CDC48 bindet *in vivo* Ubiquitinkonjugate in Abhängigkeit von UFD1. Ubiquitinkonjugate wurden nach Expression von ^{myc}Ubiquitin aus Lysaten von WT- oder *ufd1-2*-Hefezellen mit anti-myc-Antikörpern gefällt. Die Immunpräzipitate wurden im anti-VSV-Immunoblot auf gebundenes CDC48 hin untersucht.

CDC48 kann nach Zentrifugation in der Membranfraktion nachgewiesen werden (Latterich et al., 1995; Abb. 2-13a). Die Menge an membranassoziiertem CDC48 ist jedoch in *ufd1-2*- und *npl4-1*-Mutanten deutlich reduziert. Interessanterweise zeigt sich ein reziprokes Verhältnis bei Analyse der Membranassoziation von UFD1 und NPL4 (Abb. 2-13b). Beide Kofaktoren sind peripher membranassoziiert und können im Gegensatz zu SPT23 p90 durch niedrige NaCl-Konzentrationen abgelöst werden (Daten nicht gezeigt). UFD1 und NPL4 finden sich reproduzierbar in *cdc48-6*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyphefen in der Membranfraktion angereichert. Diese Experimente legen den Schluß nahe, daß die Erkennung membranständiger CDC48-Substrate durch UFD1 und NPL4 reguliert wird. Nach Bindung der Substrate durch CDC48 scheinen UFD1 und NPL4 von der Membran losgelöst zu werden.

Analoge Ergebnisse wurden in Bindungsstudien von CDC48 an Ubiquitinkonjugate erhalten. Ubiquitinkonjugate wurden nach Expression von ^{myc}Ubiquitin durch anti-myc-Antikörper isoliert. CDC48 läßt sich in diesen Immunfällungen nur in Wildtyphefen, nicht aber in *ufd1-2*-Mutanten nachweisen (Abb. 2-13b). Dies bestätigt die Vermutung, daß UFD1 und NPL4 die Substratbindung von CDC48 *in vivo* vermitteln.

Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex verbindet daher zwei interessante Eigenschaften: Ubiquitinerkennung und Komplexdisassemblierung. Da viele Proteine, wie etwa Zykline, Sekurin oder I B spezifisch aus Komplexen entfernt und abgebaut werden müssen, könnte dies eine zentrale enzymatische Aktivität sein (Glotzer et al., 1991; Chen et al., 1995). Dies mag die starke Expression von CDC48 in Hefezellen und die hervorragende Konservierung des gesamten Komplexes in höheren Eukaryoten erklären.

4. Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex vermittelt die Bindung des E4-Enzyms UFD2 an Substrate

4.1 Die U-Box ist für die UFD2-vermittelte Multiubiquitinierung essentiell

Stellt das Herauslösen ubiquitinerter Proteine aus oligomeren Komplexen die alleinige Funktion von CDC48 dar oder kann die Segregase auch nachfolgende Reaktionen koordinieren? CDC48 bindet neben mono/oligoubiquitinierten Proteinen auch den Multiubiquitinierungsfaktor UFD2 (Koegl et al., 1999; Meyer et al., 2000). Es ist daher vorstellbar, daß CDC48 auf die UFD2-gesteuerte Verlängerung von Ubiquitinketten Einfluß nehmen könnte.

Das prototypische E4-Enzym der Hefe UFD2 ist in höheren Eukaryonten konserviert und besitzt am C-Terminus eine RING-Finger-ähnliche U-Box-Domäne (Koegl et al., 1999; Aravind und Konin, 2000). Trotzdem wird für die UFD2-katalysierte Multiubiquitinierung ein E3-Enzym benötigt, weshalb die Bedeutung der U-Box-Domäne umstritten ist. Es wurde daher zunächst die Funktion dieser Domäne untersucht, bevor der Einfluß der Segregase auf E4-vermittelte Multiubiquitinierung analysiert werden konnte.

Ein Charakteristikum von RING-Finger Ubiquitin-Ligasen ist die Autoubiquitinierung des RING-Fingers (Fang et al., 2000; Yang et al., 2000; Chen et al., 2002). Inkubiert man die gereinigte U-Box-Domäne mit E1- und E2-Enzym *in vitro*, so wird diese ebenfalls ubiquitiniert (Abb. 2-14a). Die Effizienz dieser Reaktion wird durch zugegebenes E3-Enzym nicht gesteigert. Eine schwächer ausgeprägte Autoubiquitinierung wird auch bei Vollängen-UFD2 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die U-Box-Domäne in UFD2 scheint daher ähnlich zum RING-Finger Ubiquitinierungsreaktionen katalysieren zu können.

Dies läßt vermuten, daß die U-Box-Domäne für die katalytische Aktivität des E4-Enzyms essentiell ist. Tatsächlich ist gereinigtes UFD2, dessen U-Box deletiert wurde (UFD2^{UBOX}), in einem *in vitro*-Multiubiquitinierungsexperiment inaktiv (Abb. 2-14b). Die durch Inkubation mit E1, E2 und E3 gebildete Oligoubiquitinkette des Substrates Ubi-lacI-Protein A (ULA) wird nur durch Vollängen-UFD2, nicht aber durch das UFD2^{UBOX}-Konstrukt oder die isolierte U-Box-Domäne verlängert. Die U-Box ist daher für UFD2-vermittelte Multiubiquitinierung essentiell, aber nicht ausreichend.

Die durch die U-Box-Domäne vermittelte Aktivität wird auch *in vivo* benötigt (Abb. 2-14c). UFD2 katalysiert die Multiubiquitinierung des artifiziellen Substrates Ubi-Pro gal und beschleunigt dadurch dessen proteasomalen Abbau in der

Hefezelle (Johnson et al., 1995; Koegl et al., 1999). Die Stabilität von Ubi-Pro gal wurde in *Pulse-Chase*-Experimenten in WT-Zellen sowie in einem Hefestamm, dessen UFD2-U-Box auf chromosomaler Ebene deletiert wurde ($ufd2^{\Delta UBOX}$), untersucht. Die Deletion der U-Box-Domäne gleicht der des gesamten UFD2-Gens (Abb. 2-14c). Ubi-Pro gal wird in $ufd2^{\Delta UBOX}$ -Hefezellen weder multiubiquitiniert noch proteasomal abgebaut.

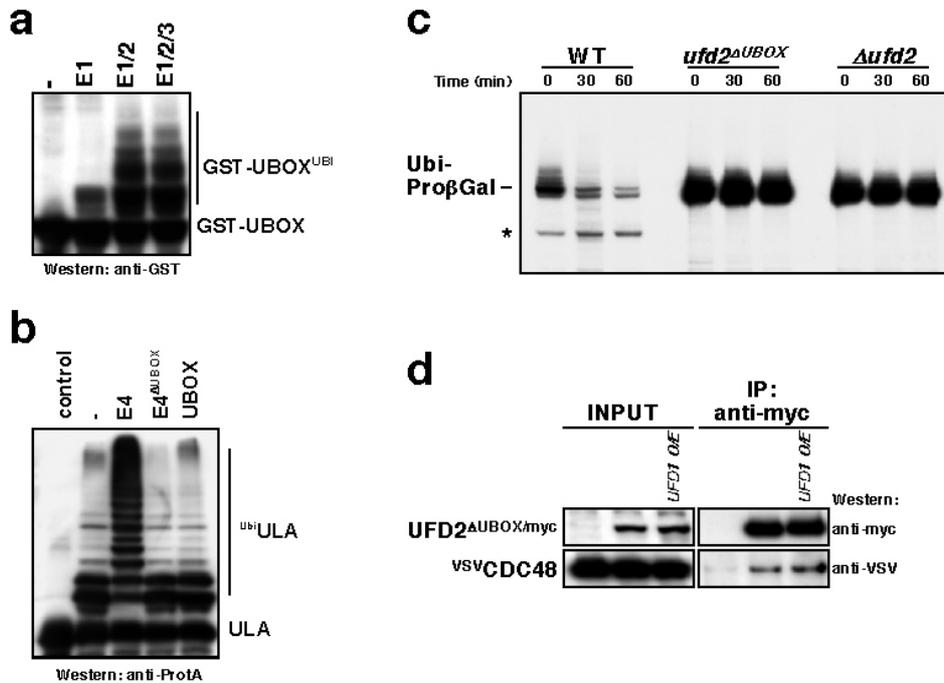


Abbildung 2-14: Die U-Box ist für die Multiubiquitinierungsaktivität des E4-Enzyms UFD2 essentiell. **a.** Die Autoubiquitinierung der U-Box benötigt *in vitro* kein E3-Enzym. Gereinigtes GST-UBOX-Protein wurde *in vitro* mit E1, E1 und E2, oder E1, E2 und E3 inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden in denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt und im anti-GST-Immunoblot analysiert. **b.** Die U-Box wird *in vitro* für die E4-Aktivität benötigt. Ubi-lacI-ProteinA (ULA) wurde mit E1, E2, und E3, sowie zusätzlich mit diversen E4-Konstrukten inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden nach denaturierender Gelelektrophorese im anti-Protein A-Immunoblot analysiert. Vollängen-E4 ist im Gegensatz zu UFD2^{UBOX} oder GST-UBOX in der Lage, die durch E1/E2/E3 hergestellte Ubiquitinkette zu verlängern. **c.** Die durch die U-Box-Domäne vermittelte Aktivität wird *in vivo* für den Abbau von Ubi-Pro gal benötigt. Die Stabilität von Ubi-Pro gal wurde in WT-, $ufd2^{\Delta UBOX}$ - und $\Delta ufd2$ -Stämmen durch *Pulse-Chase*-Analyse untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe nicht-radioaktiven Methionins wurden Proben entnommen und Ubi-Pro gal durch anti-gal-Antikörper gefällt. Die Reaktionsprodukte wurden im Autoradiogramm analysiert. Der Stern markiert das charakteristische Abbauprodukt von Ubi-Pro gal. **d.** Die U-Box-Domäne wird nicht zur Bindung von UFD2 an CDC48 benötigt. UFD2^{UBOX/myc} wurde aus Lysaten von Wildtyphefen, die fakultativ UFD1 überexprimierten, durch anti-myc-Antikörper gefällt und im anti-VSV-Immunoblot auf gebundenes VSV-CDC48 hin untersucht.

Um auszuschließen, daß die Deletion der U-Box-Domäne das E4-Enzym unspezifisch inaktiviert, wurde die Bindung von UFD2^{UBOX} an CDC48 analysiert.

Epitop markiertes UFD2^{UBOX} wurde aus Hefezelllysaten mit anti-myc-Antikörpern gefällt und auf gebundenes^{VSV} CDC48 hin untersucht (Abb. 2-14d). CDC48 konnte spezifisch in anti-UFD2^{UBOX}-Immünfällungen nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß die Wechselwirkung des E4-Enzyms mit CDC48 durch die Deletion der U-Box nicht gestört wird. Analog dazu konnte die Bindung von UFD2^{UBOX} an das Substrat Ubi-Pro gal beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies läßt vermuten, daß UFD2^{UBOX} ein zwar korrekt gefaltetes, aber katalytisch inaktives Protein ist. *ufd2^{ΔUBOX}*-Hefezellen können daher verwendet werden, um die Funktion der durch UFD2 katalysierten Multiubiquitinierung zu studieren, ohne daß andere Prozesse wie die Bindung von CDC48 oder die Erkennung des Substrates beeinträchtigt sind .

4.2 Die Inaktivierung von UFD2 kann Mutationen im CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex partiell supprimieren

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob CDC48 die Funktion des Multiubiquitinierungsfaktors UFD2 beeinflussen kann, wurden Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes mit *Δufd2*- oder *ufd2^{ΔUBOX}*-Stämmen gekreuzt und auf ihre Lebensfähigkeit untersucht. Aufgrund der essentiellen Funktion der Segregase im OLE-Weg wurden die entsprechenden Hefestämme sowohl auf Vollmedium als auch auf mit Ölsäure supplementiertem Medium analysiert (Abb. 2-15). Überraschenderweise supprimiert die Inaktivierung von *UFD2* partiell *cdc48-6*-Mutanten (Abb. 2-15a). Während *cdc48-6*-Mutanten bei 30°C deutliche Wachstumsdefekte aufweisen, sind *cdc48-6 Δufd2* sowie *cdc48-6 ufd2^{ΔUBOX}*-Mutanten bis 34°C lebensfähig. Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium zeigt keinen Einfluß. Die partielle Supprimierung ist besonders deutlich in *ufd1-2 cdc48-6 ufd2^{ΔUBOX}*-Tripelmutanten zu beobachten, deren permissive Temperatur im Vergleich zur *ufd1-2 cdc48-6*-Doppelmutante von 28°C auf 34°C erhöht ist (Abb. 2-15b). Die synthetische Lethalität der *ufd1-2*- und *cdc48-6*-Mutanten kann gleichermaßen durch Zugabe von Ölsäure zum Medium gerettet werden (Hoppe, 2000). *Δufd2*-Hefezellen zeigen dagegen bei 32°C einen milden Wachstumsdefekt auf Ölsäure-haltigen Platten, der in der *ufd1-2 Δufd2*-Doppelmutante nicht beobachtet werden kann. Diese Daten zeigen, daß die Funktionen des E4-Enzyms UFD2 und des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes *in vivo* eng miteinander verknüpft sind. Die Inaktivierung von *UFD2* scheint einen in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes limitierenden Faktor zu stabilisieren, sodaß diese partiell gerettet werden.

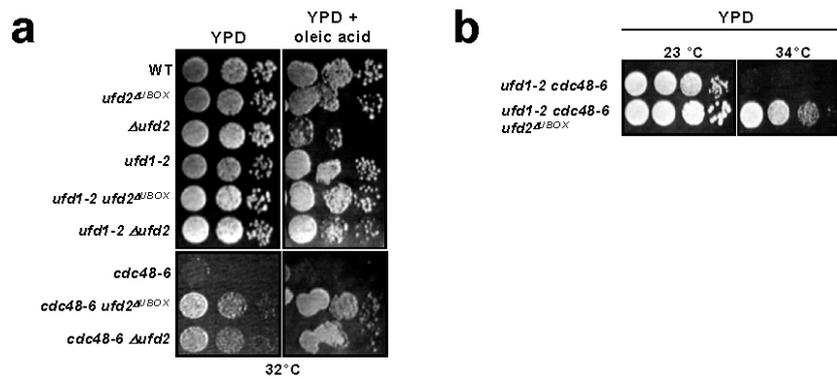


Abbildung 2-15: Die Inaktivierung von UFD2 kann Mutanten des OLE-Wegs partiell supprimieren. a. Einzel- und Doppelmutanten wurden wie angegeben auf YPD- oder YPD+Ölsäure-Platten in serieller Verdünnung plattiert und drei Tage bei 32 °C inkubiert. b. Die Inaktivierung von UFD2 in *ufd1-2 cdc48-6*-Mutanten supprimiert deren synthetische Lethalität bei 34 °C. Dies kann auch durch Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4.3 Substratbeladenes CDC48 rekrutiert das E4-Enzym UFD2

Obwohl die genetischen Experimente belegen, daß CDC48 und UFD2 *in vivo* eng zusammenwirken, lassen sie keine Rückschlüsse auf die zeitliche Abfolge der Ereignisse zu. CDC48 könnte gleichermaßen Substrate dem E4-Enzym UFD2 präsentieren oder diese erst nach E4-vermittelter Multiubiquitinierung binden. Um dies zu unterscheiden, wurde eine Reihe verschiedener Koimmunpräzipitationen durchgeführt.

UFD2 wurde in Wildtyphefen sowie in *ufd1-2*-Mutanten mit einem myc-Epitop fusioniert. Nach Transformation der entsprechenden Hefestämme mit ^{vsv}CDC48 wurde UFD2^{myc} aus den Zellysaten durch anti-myc-Antikörper immunpräzipitiert. Dabei wurde aus Lysaten der *ufd1-2*-Zellen reproduzierbar weniger ^{vsv}CDC48 gefällt als aus Wildtyplysaten (Abb. 2-16a). Eine gleichermaßen verringerte CDC48-Bindung wurde bei Immunpräzipitation von UFD2 aus *npl4-1*-Zellysaten beobachtet (Abb. 2-16b). Weder UFD1 noch NPL4 interagieren mit UFD2 in Koimmunpräzipitations- oder in Zwei-Hybrid-Experimenten (Daten nicht gezeigt). Der heterodimere Kofaktor UFD1/NPL4 fördert hingegen die Bindung ubiquitinerter Substrate an CDC48 und könnte dadurch indirekt UFD2 in einen CDC48/Substrat-Komplex rekrutieren. Die kooperative Erkennung von CDC48 und Substrat durch UFD2 könnte die Wechselwirkung des E4-Enzyms mit der Segregase stabilisieren und die Ausbildung eines ternären Komplexes fördern.

Eine derart regulierte Interaktion zwischen dem E4-Enzym UFD2 und der Segregase CDC48 setzt voraus, daß diese Proteine nur transient für die Dauer einer Multiubiquitinierungsreaktion miteinander wechselwirken. Dafür spricht die geringe Effizienz der Koimmunpräzipitationen (Abb. 2-16a, b). Werden zudem Lysate von

Hefezellen durch eine Größenausschlußchromatographie aufgetrennt, finden sich CDC48 und UFD2 in unterschiedlichen Fraktionen (Abb. 2-16c). Dies zeigt, daß beide Proteine nicht in stabilen Komplexen existieren und läßt vermuten, daß die beobachtete Regulation von physiologischer Relevanz ist.

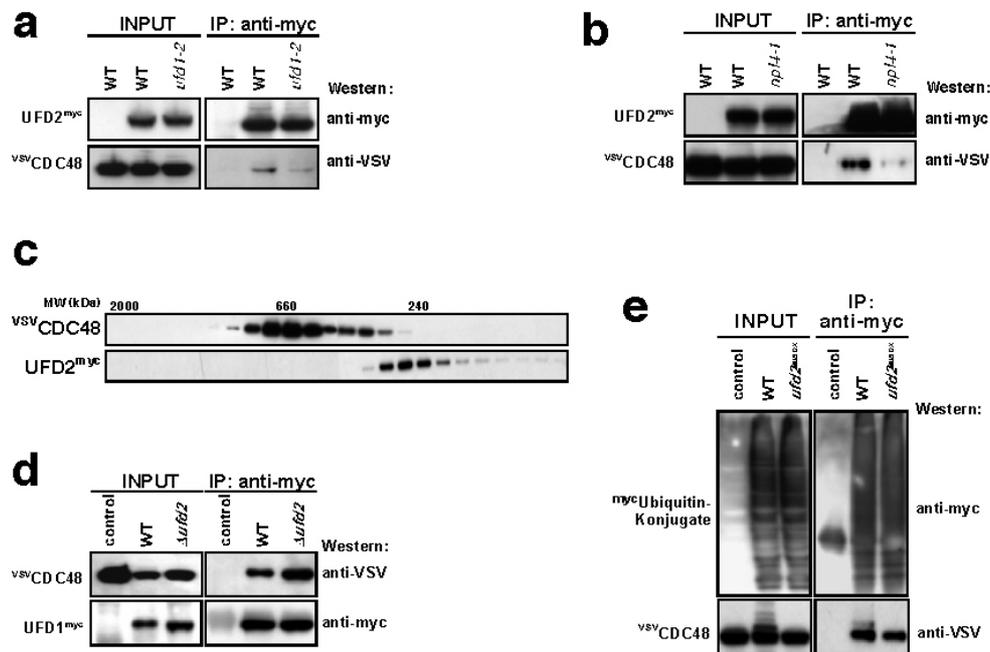


Abbildung 2-16: Die Interaktion zwischen UFD2 und CDC48 wird durch Substratbindung der Segregase gefördert. **a.** UFD2 und CDC48 interagieren kaum in *ufd1-2*-Mutanten. *UFD2^{3myc}* wurde aus Lysaten von WT- und *ufd1-2*-Zellen mit anti-myc-Antikörpern gefällt und auf gebundenes *vs^vCDC48* im anti-VSV-Immunoblot untersucht. *INPUT* zeigt zehn Prozent der eingesetzten Proteinmenge. Die Interaktion zwischen UFD2 und CDC48 ist in *ufd1-2*-Hefezellen weniger effizient. **b.** UFD2 und CDC48 interagieren kaum in *npl4-1*-Mutanten. Gegen UFD2 gerichtete Immunpräzipitationen wurden wie unter (a) beschrieben durchgeführt. In *npl4-1*-Mutanten kann wenig CDC48 in den UFD2-Immunfällungen nachgewiesen werden. **c.** UFD2 und CDC48 interagieren transient. *vs^vCDC48*- und *UFD2^{myc}*-enthaltende Komplexe wurden nach nativer Lyse von Wildtyphefen durch Größenausschlußchromatographie aufgetrennt und im anti-VSV- bzw. anti-myc-Immunoblot analysiert. CDC48 und UFD2 komigrieren nicht. **d.** Die Deletion von *UFD2* beeinflusst die Interaktion zwischen UFD1 und CDC48 nicht. *UFD1^{3myc}* wurde aus Lysaten von WT- und Δ *ufd2*-Hefezellen durch anti-myc-Antikörper gefällt und auf gebundenes *vs^vCDC48* im anti-VSV-Immunoblot untersucht. *INPUT* zeigt zehn Prozent der eingesetzten Proteinmenge. **e.** Die Inaktivierung von *UFD2* wirkt sich nicht auf die Erkennung ubiquitinerter Proteine durch CDC48 aus. Ubiquitinkonjugate wurden nach Expression von *myc*Ubiquitin durch anti-myc-Antikörper gefällt und auf gebundenes *vs^vCDC48* im anti-VSV-Immunoblot untersucht.

UFD1 fördert die Bindung von CDC48 an ubiquitinierte Proteine und reguliert dadurch die Interaktion der Segregase mit dem E4-Enzym UFD2. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ist die Wechselwirkung von UFD1 und CDC48 weder in *ufd2^{ΔUBOX}*-, Δ *ufd2*- noch in Δ *ufd2* Δ *rpn10*-Hefestämmen beeinträchtigt (Abb.

2-16d; Daten nicht gezeigt). UFD1 erkennt CDC48 unabhängig von UFD2 und vermittelt anschließend die Bindung des E4-Enzyms UFD2 an substratbeladenes CDC48. Dementsprechend ist die Bindung von Ubiquitinkonjugaten sowie des Substrates Ubi-Pro gal durch CDC48 in *ufd2^{ΔUBOX}*-Mutanten nicht inhibiert (Abb. 2-16e; Daten nicht gezeigt). In gegen ^{myc}Ubiquitin gerichteten Immunfällungen kann CDC48 unabhängig von der Aktivität des E4-Enzyms nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu UFD1 ist die enzymatische Aktivität des E4-Enzyms UFD2 für die Substraterkennung von CDC48 nicht von Bedeutung. UFD2 wirkt daher nach der Substratbeladung von CDC48 durch UFD1.

4.4 Die Bindung an CDC48 erhöht die Affinität von UFD2 für Substrate

Die enge Kopplung der Substrat- und UFD2-Bindung durch CDC48 legt die Vermutung nahe, daß Substrate durch CDC48^{UFD1/NPL4} der E4-vermittelten Multiubiquitinierung präsentiert werden. Ubi-Pro gal ist das bisher einzige Protein, dessen Bindung an CDC48 und UFD2 beschrieben wurde (Koegl et al., 1999). Mit Hilfe von Ubi-Pro gal wurde daher die Substrataffinität des E4-Enzyms UFD2 in Abhängigkeit eines funktionellen CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes analysiert.

Ubi-Pro gal wurde durch anti-gal-Antikörper aus Lysaten von WT-, *ufd1-2*- und *npl4-1*-Hefezellen gefällt und auf gebundenes ^{VSV}UFD2 hin untersucht. Wie bereits beschrieben, kann UFD2 in Ubi-Pro gal-Immunpräzipitaten aus Wildtyphefzellen nachgewiesen werden (Koegl et al., 1999). Im Gegensatz dazu ist die Menge an kopräzipitiertem UFD2 sowohl in *ufd1-2*- als auch in *npl4-1*-Mutanten deutlich verringert (Abb. 2-17a). Der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex fördert oder stabilisiert die Bindung eines Substrates durch das E4-Enzym UFD2.

Die *in vivo*-Daten wurden durch *in vitro*-Bindungsstudien untermauert (Abb. 2-17b). Gereinigtes ^{MBP}UFD2 bindet das monoubiquitinierte Protein ^{Ubi}GST kaum, obwohl dies ein Substrat des E4-Enzyms darstellt. Inkubiert man dagegen UFD2 in Gegenwart des gereinigten CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes mit ^{Ubi}GST, so wird eine deutliche Assoziation des E4-Enzyms mit ^{Ubi}GST detektiert. CDC48^{UFD1/NPL4} erhöht daher die Affinität von UFD2 für monoubiquitinierte Proteine auch *in vitro*. Das Substratspektrum der ubiquitinselektiven Segregase CDC48^{UFD1/NPL4} sollte folglich mit dem des E4-Enzyms UFD2 überlappen.

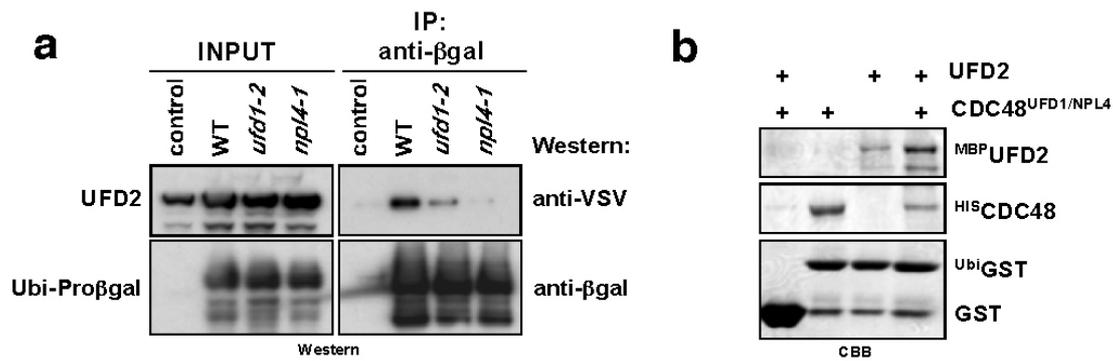


Abbildung 2-17: UFD2 erkennt Substrate in Abwesenheit eines funktionellen CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes mit erniedrigter Affinität. a. UFD2 bindet das Substrat Ubi-ProβGal in *ufd1-2*- und *npl4-1*-Mutanten kaum. Ubi-Pro gal wurde durch anti- gal-Antikörper aus Lysaten der angegebenen Hefestämme gefällt. Die Präzipitate wurden auf gebundenes ^{VSV}UFD2 im anti-VSV-Immunoblot analysiert. **b.** CDC48 fördert *in vitro* die Bindung von gereinigtem UFD2 an immobilisiertes ^{Ubi}GST. GST und ^{Ubi}GST wurden immobilisiert und mit gereinigtem CDC48^{UFD1/NPL4}, MBP UFD2 oder mit beiden Enzymen inkubiert. Die Reaktionen wurden durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung (CBB) analysiert.

4.5 Die inhibierte Bindung an CDC48 führt zur vermehrten Selbstubiquitinierung des E4-Enzyms

Die Funktion des E4-Enzyms UFD2 ist eng mit der des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes verknüpft. Dies führt zu der Frage, wie UFD2 auf eine verringerte Bindung an CDC48 bzw. an Substrate reagiert. Tatsächlich ist das E4-Enzym in *ufd1-2*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyphefen verstärkt modifiziert (Abb. 2-18a). Dies konnte auch in später beschriebenen Sukrosegradienten zur Analyse der Membranassoziation von UFD2 in *ufd1-2*-Mutanten beobachtet werden (Abb. 2-20). Die durch gestörte Substrat- oder CDC48-Erkennung verstärkte Modifikation wird bei UFD2^{UBOX} weder in WT-Zellen noch in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes detektiert (Abb. 2-18a). Im Falle der RING-Finger-Proteine wurde Autoubiquitinierung beschrieben, die *in vitro* bereits für die RING-Finger-homologe U-Box-Domäne nachgewiesen wurde (Fang et al., 2000; Yang et al., 2000; Ryoo et al., 2002; Abb. 2-14). Es wurde daher untersucht, ob die reguliert auftretende, U-Box-abhängige Modifikation des E4-Enzyms Ubiquitinierung darstellt.

Um dies zu analysieren, wurde His Ubiquitin in Hefezellen überexprimiert. Mit His Ubiquitin konjugierte Proteine wurden denaturierend durch Bindung an magnetische NiNTA-Perlen gereinigt und im anti-myc-Immunoblot auf UFD2^{myc} bzw. UFD2^{UBOX/myc} hin analysiert (Abb. 2-18b). Dies zeigte, daß UFD2, nicht aber UFD2^{UBOX}, in ubiquitiniert Form vorliegt (Abb. 2-18b). Die durch Inaktivierung des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes vermehrt auftretende Modifikation ist daher eine U-Box-abhängige Ubiquitinierung des E4-Enzyms.

Autoubiquitinierung kann ein Protein dem proteasomalen Abbau zuführen, wie dies für die RING-Finger-Proteine IAP („Inhibitor of Apoptosis“) und Mdm2 beschrieben wurde (Fang et al., 2000; Yang et al., 2000). Es wurde deshalb die Stabilität von UFD2^{myc} in *Pulse-Chase*-Experimenten untersucht. UFD2^{myc} ist sowohl in Wildtyphefen als auch in *ufd1-2*-, *cdc48-6*- und *ufd1-2 cdc48-6*-Mutanten ein stabiles Protein mit einer Halbwertszeit von mehr als zwei Stunden (Abb. 2-18c). In WT-Hefezellen wird jedoch ein N-terminales Abbauprodukt des E4-Enzyms beobachtet, welches in den Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes vermindert auftritt. Dieses Abbauprodukt kann in UFD2^{UBOX}-Mutanten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Untersuchung eines diesem Abbauprodukt entsprechenden UFD2^N-Konstruktes im Zwei-Hybrid-System zeigt, daß es nicht mit CDC48 wechselwirken kann (Abb 2-18d). Da es in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes vermindert auftritt, spiegelt das Abbauprodukt vermutlich einen CDC48-abhängigen Inaktivierungsprozess des E4-Enzyms wider. Die verstärkte Ubiquitinierung von UFD2 in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes bewirkt hingegen nicht den proteasomalen Abbau eines signifikanten Anteils des Proteins.

Interessanterweise wurde in ähnlichen Experimenten auch Ubiquitinierung von CDC48 detektiert. Ubiquitinierte Formen der Segregase treten nach Überexpression N-terminal myc-markierten Ubiquitins auf, das von Ubiquitin-Hydrolasen nicht effizient erkannt wird (Abb. 2-18e; Ellison und Hochstrasser, 1991). Die Ubiquitinierung von CDC48 ist abhängig von UFD2, da konjugiertes CDC48 in Mutanten des E4-Enzyms nicht beobachtet wird. Vergleichbar mit der Autoubiquitinierung des E4-Enzyms führt die Ubiquitinierung der Segregase nicht zu deren proteasomalem Abbau, da CDC48 sowohl in WT- als auch in Δ *ufd2*-Zellen in *Pulse-Chase*-Experimenten stabil ist (Abb. 2-18f). Auch das U-Box-abhängige E4-Enzym CHIP interagiert mit einem Chaperon, Hsp70/Hsc70, und vermittelt dessen Ubiquitinierung (Jiang et al., 2001; Imai et al., 2002). Analog zu UFD2 scheint dies die Ubiquitinierung und den Abbau der Chaperon-gebundenen Substrate zu fördern (Connell et al., 2001). Das Chaperon selbst bleibt, wie CDC48, stabil.

Welche Bedeutung besitzen die beobachteten Ubiquitinierungsreaktionen? UFD2-Autoubiquitinierung tritt unter Bedingungen auf, unter denen die Wechselwirkung des E4-Enzyms mit CDC48 bzw. mit Substraten inhibiert ist. Die UFD2-abhängige CDC48-Ubiquitinierung wird dagegen in allen bisher untersuchten Mutanten detektiert. Beide Reaktionen können Nebenreaktionen der *in vivo* bedeutsamen Multiubiquitinierung CDC48-gebundener Substrate darstellen. Sie könnten aber auch die Grundlage eines Regulationsmechanismus sein, der als Sensor der Substratbelastung der Segregase wirkt und eventuell vorhandene, unproduktive CDC48/UFD2-Komplexe destabilisiert.

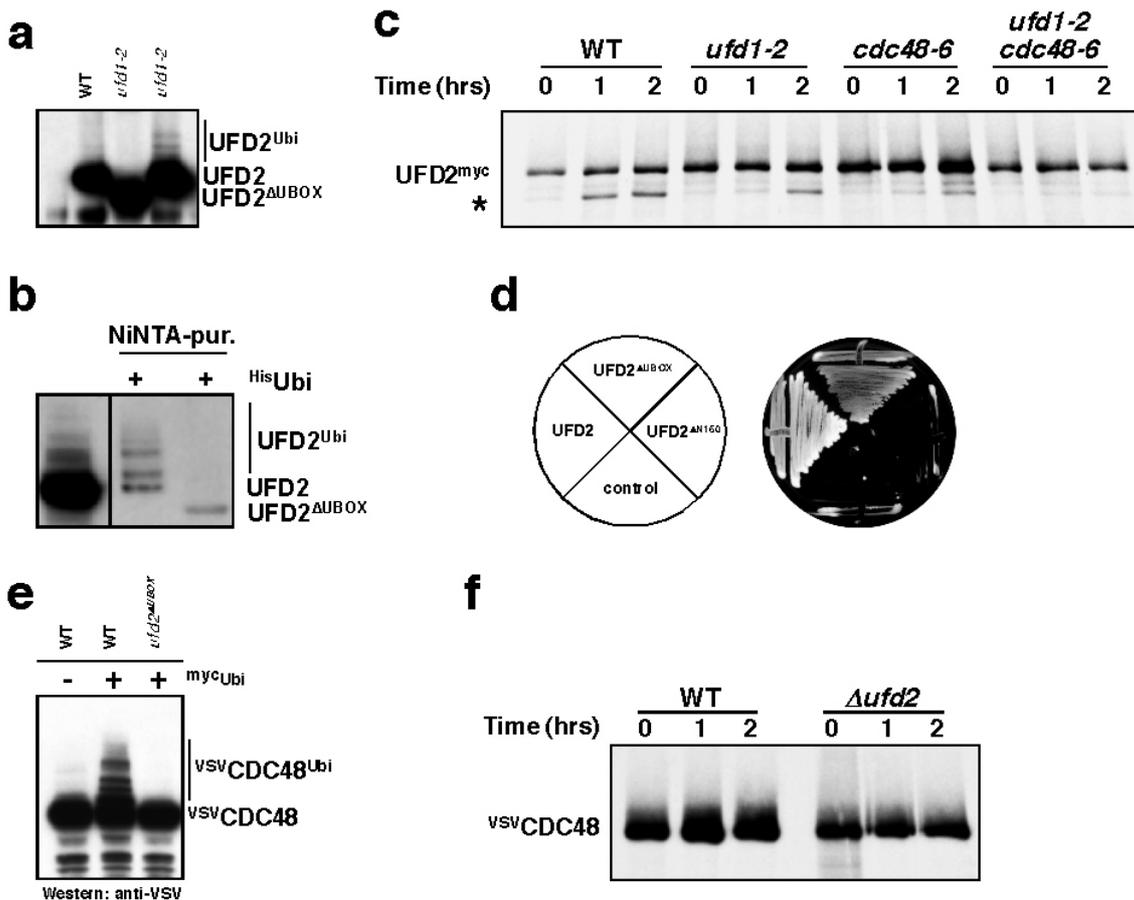


Abbildung 2-18: Die Autoubiquitinierung von UFD2 tritt bei inhibierter Substrat- bzw. CDC48-Erkennung vermehrt auf. **a.** UFD2 zeigt verstärkt modifizierte Formen in *ufd1-2*-Mutanten. Chromosomal myc-Epitop markiertes UFD2 bzw. UFD2^{UBOX} wurden in WT- bzw. in *ufd1-2*-Hefezellen exprimiert und im anti-myc-Immunoblot analysiert. **b.** UFD2, aber nicht UFD2^{UBOX}, ist ubiquitiniert. Nach Expression von His-Ubiquitin wurden Ubiquitinkonjugate denaturierend durch Bindung an NiNTA-Perlen gereinigt und auf myc-Epitop-markiertes UFD2 bzw. UFD2^{UBOX} im anti-myc-Immunoblot untersucht. **c.** UFD2 ist ein stabiles Protein. Die Stabilität von UFD2^{myc} wurde in verschiedenen Mutanten im *Pulse-Chase*-Experiment untersucht. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe nicht-radioaktiven Methionins wurde UFD2 aus Zellysaten durch anti-myc-Antikörper gefällt. Die Immunpräzipitate wurden im Autoradiogramm analysiert. Der Stern kennzeichnet ein N-terminales Abbauprodukt von UFD2, das in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes noch bei UFD2^{UBOX} in geringerer Menge detektiert wird. **d.** N-terminal verkürztes UFD2 interagiert nicht mit CDC48. Ein dem in (c) beobachteten Abbauprodukt entsprechendes UFD2-Konstrukt (UFD2^{N150}) wurde in Vektoren des Zwei-Hybrid-Systems kloniert und neben UFD2 und UFD2^{UBOX} auf eine Wechselwirkung mit CDC48 getestet. Als Kontrolle wurde leerer pGAD-Vektor eingesetzt. **e.** CDC48 ist nach Expression von myc-Ubiquitin vermehrt ubiquitiniert. Die Ubiquitinierung hängt zudem von UFD2 ab. VSV-CDC48 wurde mit oder ohne myc-Ubiquitin in den entsprechenden Mutanten exprimiert und im anti-VSV-Immunoblot analysiert. **e.** CDC48 ist ein stabiles Protein. Die Stabilität von CDC48 wurde analog zu (c) in WT- und *Δufd2*-Hefezellen im *Pulse-Chase*-Experiment analysiert. Die anti-CDC48-Immunpräzipitate wurden im Autoradiogramm analysiert.

4.6 CDC48^{UFD1/NPL4} reguliert UFD2-vermittelte Multiubiquitinierung

Die Assoziation von UFD2 an bestimmte Substrate wird durch CDC48 kontrolliert. Dies kann sich unterschiedlich auf die durch das E4 katalysierte Reaktion auswirken. Einerseits könnte CDC48 die Substrataffinität von UFD2 steigern und damit die Multiubiquitinierung fördern. Andererseits kann CDC48 dadurch, daß es das Substratspektrum von UFD2 limitiert, die UFD2-katalysierte Reaktion stringent kontrollieren. Um dies voneinander zu unterscheiden, wurden *in vitro*-Multiubiquitinierungsreaktionen durchgeführt (Abb. 2-19).

^{His}CDC48 sowie dessen Kofaktoren UFD1 und NPL4 wurden aus Bakterien gereinigt. In Gegenwart von ATP und Magnesium bilden sich funktionelle CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexe, die in den *in vitro*-Multiubiquitinierungsexperimenten eingesetzt werden können. Das monomere Protein Ubi-lacI-ProteinA (ULA) wurde mit CDC48^{UFD1/NPL4} präinkubiert. Anschließend wurde die Ubiquitinierung des Substrates durch Zugabe von E1, E2, E3 und fakultativ E4 gestartet. Die Reaktionsprodukte wurden im anti-Protein A-Immunoblot visualisiert (Abb. 2-19a). CDC48 hat keinen Einfluß auf die E4-abhängige Ubiquitinierung von ULA, die zu einer Verlängerung der Ubiquitinkette bis zu etwa 5 Ubiquitinmolekülen führt (Abb. 2-19a). Auffallend ist jedoch, daß die Ausbildung langer Multiubiquitinketten inhibiert ist. Zugabe des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes nach der E4-vermittelten Ubiquitinierung des Substrates hatte keinen Effekt. Dies weist darauf hin, daß CDC48^{UFD1/NPL4} die E4-vermittelte Multiubiquitinierung beschränken kann.

Die in Gegenwart der AAA-ATPase CDC48^{UFD1/NPL4} beobachtete Limitierung der Multiubiquitinierung ist nicht auf ATP-Depletion des Ubiquitinierungsansatzes zurückzuführen. Die Verwendung nicht hydrolysierbaren ATPs (AMP-PNP oder ATP S) oder eines ATP-regenerierenden Systems hatte keinen Einfluß (Abb. 2-19b; Daten nicht gezeigt). Zudem handelt es sich in Gegenwart von CDC48^{UFD1/NPL4} nicht um selektiven Abbau multiubiquitiniertes Proteine. Zum einen führt die spätere Zugabe von CDC48, zum anderen die Inkubation des Reaktionsansatzes mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 zu keiner Veränderung im Muster der Reaktionsprodukte (Daten nicht gezeigt). Gegen eine generelle Inhibition von Ubiquitinierungsreaktionen durch CDC48^{UFD1/NPL4} spricht zudem die in ihrer Effizienz unveränderte Autoubiquitinierung der U-Box (Abb. 2-19c).

Der von CDC48 ausgeübte Effekt kann durch direkte Inhibition des E4-Enzyms UFD2 oder durch Bindung an Substrate hervorgerufen werden. Um dies zu unterscheiden, wurde sowohl CDC48 als auch CDC48^{UFD1/NPL4} in Multiubiquitinierungsexperimenten eingesetzt. Das UFD1/NPL4-Heterodimer erhöht die Affinität von CDC48 zu Ubiquitinkonjugaten. Im Vergleich zu CDC48 inhibiert der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex die E4-vermittelte Ubiquitinierung des Substrates ULA

wesentlich stärker (Abb. 2-19d). Dies läßt vermuten, daß $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ Substrate bindet und dadurch die Aktivität des E4-Enzyms limitiert. An CDC48 gebundene Proteine können nur in einem regulierten Ausmaß ubiquitiniert werden (s. Diskussion).

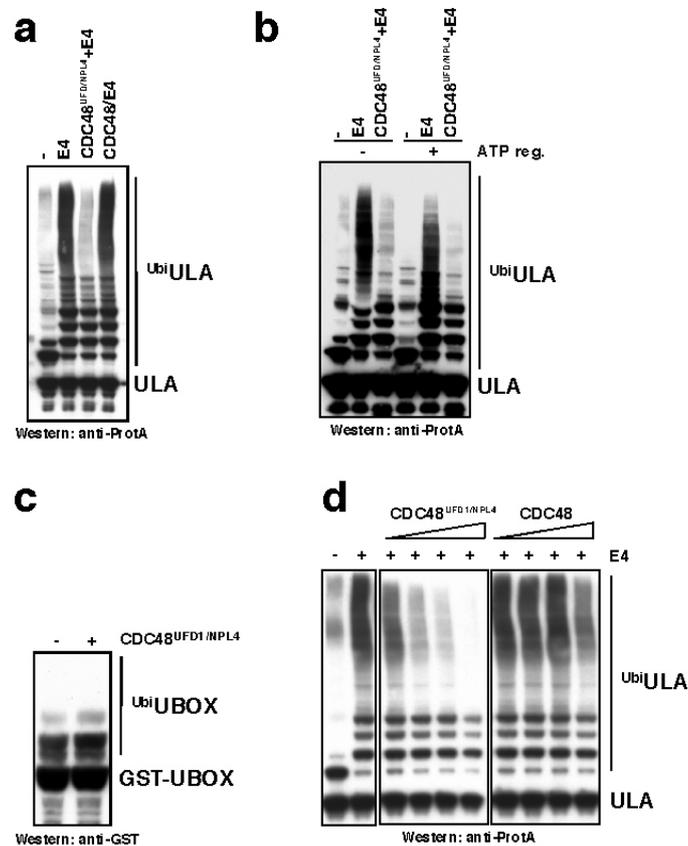


Abbildung 2-19: $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ reguliert die Effizienz der E4-katalysierten Multiubiquitinierung.

a. Zugabe von $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ verhindert die Ausbildung langer Multiubiquitinketten auf dem Substrat Ubi-lacI-ProteinA (ULA). ULA wurde mit E1, E2 und E3 sowie fakultativ $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ versetzt. Anschließend wurde gereinigtes E4-Enzym zugegeben. In der letzten Spur wurde $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ nach der E4-katalysierten Multiubiquitinierung zugegeben und die Reaktion weitere 15 min inkubiert. Die gebildeten Ubiquitinkonjugate wurden nach denaturierender Gelelektrophorese im anti-ProtA-Immunoblot visualisiert. **b.** Die Inhibition der Multiubiquitinierung ist nicht auf ATP-Depletion des Ansatzes zurückzuführen. Die unter (a) beschriebene Reaktion wurde in Gegenwart (+) eines ATP-regenerierenden Systems durchgeführt und im anti-Protein A-Immunoblot analysiert. Die Reaktionsprodukte unterscheiden sich kaum von den Produkten der ohne ATP-regenerierendes System (-) durchgeführten Reaktionen. **c.** Die Autoubiquitinierung der U-Box wird durch $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ nicht inhibiert. Das gereinigte GST-UBOX-Protein wurde mit E1, E2 und E3 in An- oder Abwesenheit von $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden im anti-GST-Immunoblot analysiert. **d.** $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ ist aktiver als CDC48. Steigende Konzentrationen an CDC48 und $\text{CDC48}^{\text{UFD1/NPL4}}$ wurden dem in (a) beschriebenen Multiubiquitinierungsansatz zugegeben und auf ihren inhibitorischen Effekt hin untersucht. Die Reaktionsprodukte wurden im anti-Protein A-Immunoblot analysiert.

5. UFD2 wird für die effiziente Inaktivierung des SPT23 p90 Transkriptionsfaktors benötigt

5.1 Die gestörte Interaktion von CDC48 und UFD2 führt zu Mislokalisierung von UFD2

In der Literatur wurden bisher weder *in vivo*-Substrate der von UFD2-katalysierten Reaktion noch ein starker Phänotyp der lebensfähigen *ufd2*-Deletion beschrieben. Da CDC48 Substrate zur E4-vermittelten Multiubiquitinierung präsentiert, könnten diese entsprechend der Lokalisation von CDC48^{UFD1/NPL4} an der ER-Membran oder im Nukleus zu finden sein. Um einen Hinweis auf eine Subpopulation von gemeinsamen CDC48- und UFD2-Substraten zu erhalten, wurde die intrazelluläre Lokalisation des E4-Enzyms untersucht.

Zunächst wurde die Assoziation von Protein A-markiertem UFD2 (UFD2^{ProtA}) mit der Membran des Endoplasmatischen Retikulums in Wildtyphefzellen sowie in *ufd1-2*-Mutanten analysiert. Die Zellysate der entsprechenden Hefestämme wurden im Sukrosegradienten aufgetrennt und nach Gelelektrophorese im anti-Protein A-Immunoblot untersucht (Abb. 2-20a). ER-Membranfraktionen wurden anhand der Immunreaktivität gegen das integrale ER-Membranprotein DPM1 identifiziert. Im Gegensatz zu den Komponenten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes bindet UFD2 in Wildtyphefen und in *ufd1-2*-Mutanten nicht signifikant an ER-Membranen (Abb. 2-20a). In späteren Experimenten konnte zudem gezeigt werden, daß UFD2 weder in ER-assoziiertem Proteinabbau noch in ER-ständiger SPT23-Mobilisierung mit CDC48 kooperiert (Abb. 2-21). UFD2-Substrate scheinen größtenteils keine ER-assoziierten Proteine zu sein.

Aussagekräftiger war dagegen die Analyse der intrazellulären Lokalisation von UFD2^{myc}, die in Wildtypzellen sowie in diversen Mutanten mittels indirekter Dekonvolutionsimmunfluoreszenz durchgeführt wurde (Abb. 2-20b). Obwohl UFD2 über keine beschriebene Kernimportsequenz verfügt, reichert es sich in Wildtyphefen im Zellkern an. Interessanterweise ist diese nukleäre Akkumulation in *ufd1-2*-, *npl4-1*- und *cdc48-6*-Mutanten nicht zu beobachten. Stattdessen lokalisiert UFD2 diffus im Zytoplasma und im Zellkern. Ein ähnliche Abhängigkeit von funktionellem CDC48^{UFD1/NPL4} läßt sich auch mit katalytisch inaktivem, aber substratbindendem UFD2^{UBOX} erkennen (Abb. 2-20c). Die auffällige Mislokalisierung des E4-Enzyms in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes ist weder auf gestörten Kerntransport noch auf eine generelle Inhibition des UFD-Weges zurückzuführen. Sowohl Kernproteine als auch Komponenten des UFD-Weges (z.B. RPN10) finden sich in allen untersuchten Mutanten analog zu Wildtyphefen im Zellkern (Abb. 2-9; Abb. 2-20d). Inaktivierung des alternativen CDC48^{SHP1}-Komplexes, dessen bekannte Funktion auf

Membranfusionsereignisse beschränkt ist (Meyer et al., 2000), führt ebenfalls zu keiner Veränderung der UFD2-Lokalisation. Dies unterstreicht, daß der CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex die Akkumulation des E4-Enzyms UFD2 im Zellkern reguliert. Da die Inaktivierung der Segregase mit einer verringerten Substrataffinität von UFD2 einhergeht, scheint die Lokalisierung der Substrate die des E4-Enzyms zu beeinflussen. Demnach wäre ein Großteil der UFD2-Substrate Kernproteine.

In Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten Daten ist die Kernakkumulation von UFD1 in Deletionsmutanten des E4-Enzyms UFD2 nicht verändert (Abb. 2-20d). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß UFD1 aller Voraussicht nach vor UFD2 mit CDC48 wechselwirkt.

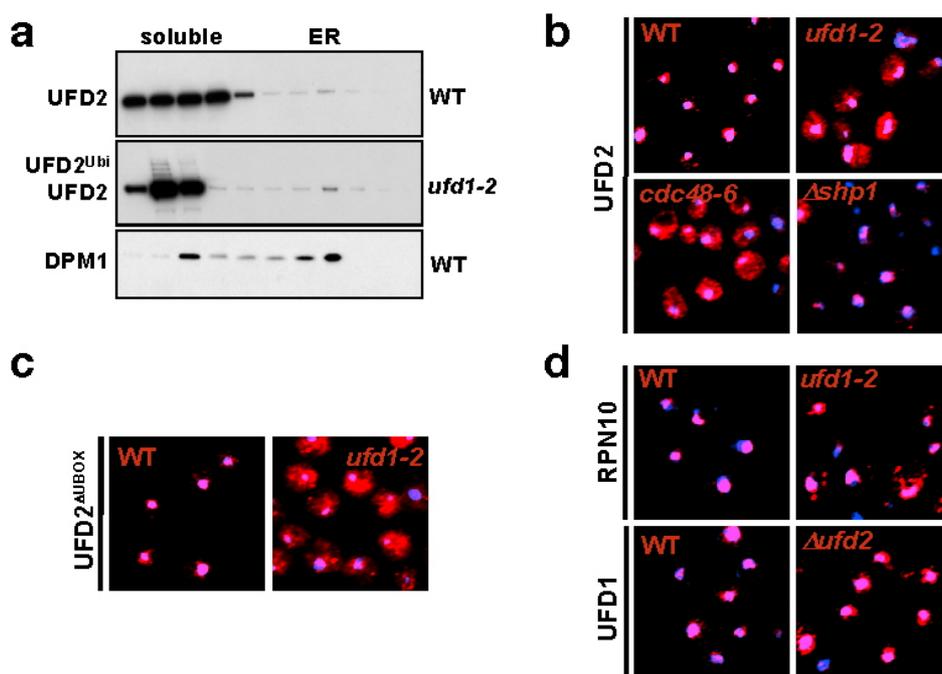


Abbildung 2-20: Die intrazelluläre Lokalisation des E4-Enzyms UFD2 ist in Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes verändert. **a.** UFD2 assoziiert nicht signifikant mit ER-Membranen. Lysate von UFD2^{ProtA}-exprimierenden WT- oder *ufd1-2*-Hefezellen wurden im Sukrosegradienten aufgetrennt und im anti-ProtA-Immunoblot auf UFD2^{ProtA} untersucht. Als Marker der Fraktionen des Endoplasmatischen Retikulums wurde die Immunreaktivität gegen das integrale ER-Membranprotein DPM1 verwendet. **b.** Die Akkumulation von UFD2 im Nukleus ist in *ufd1-2*- und *cdc48-6*-Mutanten gestört. Die Lokalisation von UFD2^{myc} wurde in den angegebenen Hefestämmen durch Dekonvolutionsimmunfluoreszenz gegen das myc-Epitop analysiert. Die Deletion von *SHP1*, die den alternativen CDC48^{SHP1}-Komplex inaktiviert, hat keinen Einfluß auf die intrazelluläre Lokalisation von UFD2. **c.** UFD2^{UBOX} verhält sich analog zu UFD2. Die Lokalisation von UFD2^{UBOX} wurde wie unter (b) beschrieben untersucht. **d.** RPN10^{myc} und UFD1^{myc} akkumulieren im Zellkern unabhängig vom CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplex bzw. von UFD2. Die Lokalisation beider Proteine wurde in den angegebenen Hefestämmen durch anti-myc-Dekonvolutionsimmunfluoreszenz untersucht.

5.2 UFD2 bindet prozessiertes SPT23

Mögliche UFD2-Substrate sollten zwei zwei gemeinsame Eigenschaften besitzen: Bindung an CDC48 sowie Lokalisation im Zellkern. SPT23 p90 erfüllt beide Voraussetzungen. Es wird durch CDC48^{UFD1/NPL4} aus stabilen SPT23 p90/p120-Komplexen mobilisiert und bleibt nach dieser Reaktion an CDC48 gebunden (Abb. 2-11c). Zudem befindet sich SPT23 p90 im Zellkern (Abb. 2-9a).

Um zu überprüfen, ob SPT23 p90 als UFD2-Substrat in Frage kommt, wurde die Bindung des prozessierten Transkriptionsfaktors an das E4-Enzym durch Koimmunpräzipitationen untersucht (Abb. 2-21a). SPT23 p90 wurde mit Hilfe des N-terminalen myc-Epitops aus Lysaten von Hefezellen, die ^{VSV}UFD2 oder ^{VSV}UFD2^{UBOX} exprimierten, nach Abtrennung der Membranfraktion isoliert. Da sowohl UFD2 als auch UFD2^{UBOX} spezifisch in den Präzipitaten nachgewiesen wurden, ist es wahrscheinlich, daß SPT23 p90 nach erfolgter Mobilisierung mit dem E4-Enzym interagiert. In Übereinstimmung mit der beobachteten Wechselwirkung zwischen UFD2^{UBOX} und Ubi-Pro gal ist die U-Box für die Erkennung eines UFD2-Substrates nicht von Bedeutung.

5.3 SPT23 p90 wird proteasomal abgebaut

SPT23 p90 und UFD2 interagieren und kolokalisieren im Zellkern. Dies führte zu der Vermutung, daß aktives SPT23 p90 von UFD2 erkannt, multiubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Die Stabilität des prozessierten Transkriptionsfaktors wurde daher in *Promoter-Shutoff*-Experimenten untersucht. SPT23 wurde unter Kontrolle des galaktose-induzierbaren und glukose-reprimierbaren *GAL1,10*-Promotors exprimiert. Durch einen Wechsel von galaktose- zu glukosehaltigem Wachstumsmedium und gleichzeitiger Zugabe von Cycloheximid wurde die SPT23-Neusynthese unterdrückt, womit der Abbau des Transkriptionsfaktors studiert werden konnte (Abb. 2-21). Da bei 37°C die Mobilisierung von der ER-Membran effizient erfolgt und damit der Großteil von SPT23 p90 gelöst im Zellkern vorliegt, wurden die Experimente bei dieser Temperatur durchgeführt. Dadurch konnte zusätzlich die Lebensdauer von SPT23 p90 in verschiedenen temperatursensitiven Mutanten analysiert werden.

Wie aus der bereits gezeigten Ubiquitinierung von SPT23 p90 zu erwarten war, ist es ein kurzlebige Protein. Die Halbwertszeit von SPT23 p90 beträgt bei 37°C weniger als 30 Minuten (Abb. 2-21b). Das kaum prozessierte, sich dennoch im Zellkern befindende SPT23TM wird dagegen mit einer Halbwertszeit von etwa 120 Minuten deutlich langsamer abgebaut. Die ubiquitinabhängige Aktivierung von SPT23 scheint das Protein zugleich für den Abbau zu markieren.

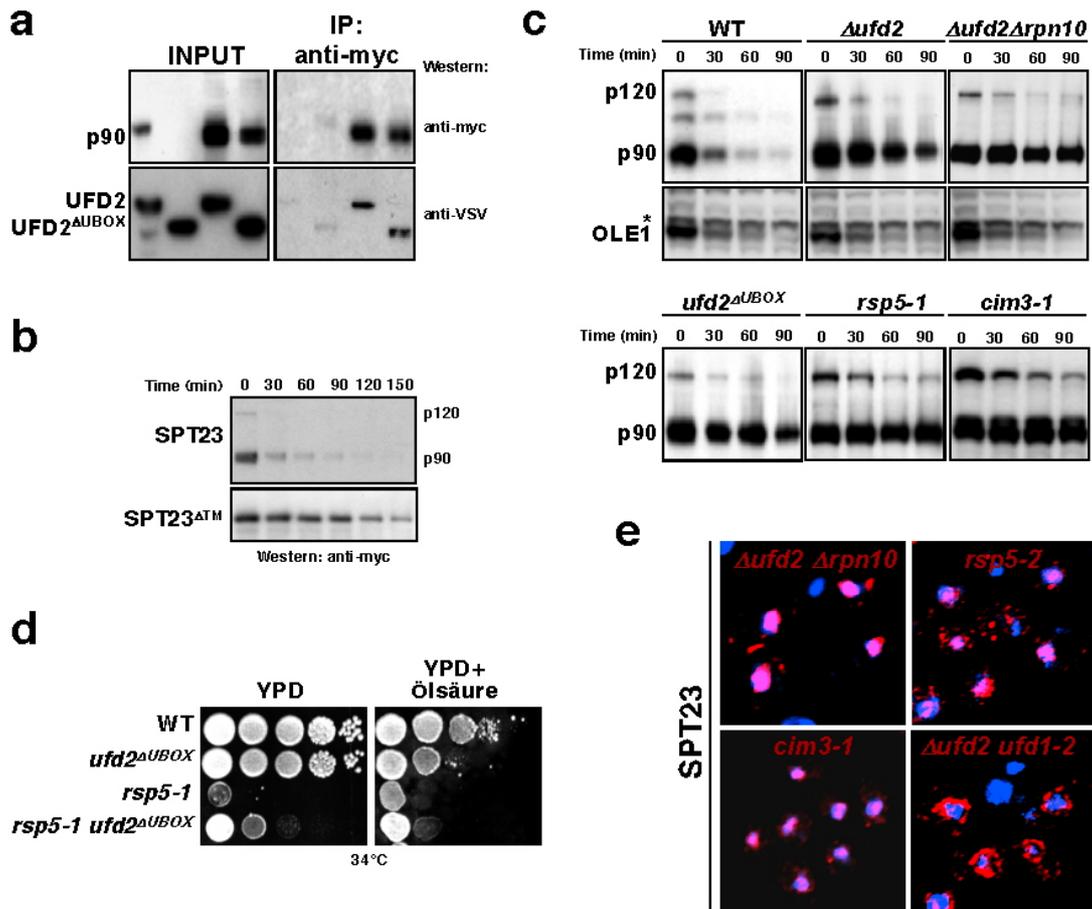


Abbildung 2-21: SPT23 wird nach UFD2-vermittelter Multiubiquitinierung durch das 26S-Proteasom abgebaut. **a.** Das E4-Enzym UFD2 bindet mobilisiertes SPT23 p90. $mycSPT23^{HA}$ p90 wurde nach Abtrennung der Membranfraktion durch anti-myc-Antikörper gefällt und auf gebundenes $VSVUFD2$ bzw. $VSVUFD2^{UBOX}$ im anti-VSV-Immunoblot untersucht. **b.** SPT23 ist im Gegensatz zu $SPT23^{TM}$ bei 37°C instabil. Die Stabilität von $mycSPT23^{HA}$ bzw. $mycSPT23^{TM}$ wurde in Wildtyphefen durch *Promoter-Shutoff*-Experimente analysiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Abschalten der SPT23-Neusynthese wurden Proteinproben entnommen und nach denaturierender Gelelektrophorese im anti-myc-Immunoblot untersucht. **c.** Das E4-Enzym UFD2 hat eine Funktion im SPT23-Abbau. Zusätzlich werden das proteasomale Protein RPN10, die Ubiquitin-Ligase RSP5 sowie das 26S-Proteasom benötigt. Das integrale ER-Membranprotein OLE1 ist in Mutanten dieser Proteine nicht stabilisiert. Die Stabilität von $mycSPT23^{HA}$ sowie des Kontrollproteins $mycOLE1$ wurde in *Promoter-Shutoff*-Experimenten untersucht. Die Proteinproben wurden im anti-myc-Immunoblot analysiert. **d.** Die Inaktivierung von *UFD2* kann Mutanten der Ubiquitin-Ligase *RSP5* partiell supprimieren. Die katalytisch essentielle U-Box-Domäne des E4-Enzyms wurde chromosomal in WT-Hefezellen sowie in *rsp5-1*-Mutanten deletiert. Die entsprechenden Hefestämme wurden drei Tage bei 34°C auf YPD- bzw. YPD+Ölsäure-Platten inkubiert. Alle Hefestämme sind bei Raumtemperatur wachstumsfähig. **e.** Stabilisiertes SPT23 p90 akkumuliert im Zellkern. Die Lokalisierung von $mycSPT23^{HA}$ p90 wurde durch indirekte Dekonvolutionsimmunfluoreszenz gegen das N-terminale myc-Epitop in den angegebenen Mutanten untersucht.

Um zu untersuchen, ob das Ubiquitin/Proteasom-System für die Kurzlebigkeit des prozessierten Transkriptionsfaktors verantwortlich ist, wurden temperatursensitive

Mutanten des 26S-Proteasoms, *cim3-1* und *pre2-1*, verwendet. CIM3 ist eine AAA-ATPase des 19S-Aufsatzes des Proteasoms, während PRE2 eine katalytische Untereinheit der 20S-Kernstruktur ist. In Mutanten der beiden untersuchten Gene ist bei der restriktiven Temperatur sowohl SPT23 p90 (welches vor dem Wechsel zur restriktiven Temperatur gebildet wurde) als auch SPT23 p120 stabilisiert (Abb. 2-21c; Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, daß neben der Prozessierung auch der Abbau des prozessierten Transkriptionsfaktors durch das Proteasom erfolgt.

SPT23 p90 ist ebenso in Mutanten der Ubiquitin-Ligase RSP5 bei deren restriktiver Temperatur stabilisiert (Abb. 2-21c). Diese Ubiquitin-Ligase vermittelt zudem die Prozessierung des Transkriptionsfaktors, so daß auch SPT23 p120 unter diesen Bedingungen akkumuliert. Das Proteasom und RSP5 besitzen somit eine duale Funktion im Hinblick auf SPT23: Zunächst bewirken sie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors an der ER-Membran, während sie später im Zellkern nach erfolgter Transkriptionsaktivierung dessen Abbau steuern.

5.4 UFD2 wird für den effizienten Abbau von SPT23 p90 benötigt

Wie können zwei auf den ersten Blick so unterschiedliche Reaktionen wie die Prozessierung und der Abbau eines Proteins durch identische Enzyme vermittelt werden? Die Aktivität der enzymatischen Maschinerie kann durch ortsspezifische Interaktoren sowohl der beteiligten Enzyme als auch der Substrate moduliert werden. So kann die Dimerisierung des Transkriptionsfaktors dessen vollständigen Abbau an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums inhibieren (Abb. 2-2). Aufgrund der beobachteten Interaktion zwischen SPT23 mit dem Kernprotein UFD2 erscheint zudem eine auf den Kern beschränkte, durch das E4-Enzym geförderte Multiubiquitinierung des Transkriptionsfaktors wahrscheinlich. Es sollte daher überprüft werden, ob UFD2 mit der Ubiquitin-Ligase RSP5 kooperieren kann, um SPT23 p90 für den Abbau zu markieren.

Zunächst wurden temperatursensitive Mutanten des E3-Enzyms RSP5 (*rsp5-1*) mit katalytisch inaktiven UFD2-Mutanten (*ufd2^{ΔUBOX}*) gekreuzt. Interessanterweise supprimiert die Inaktivierung des E4-Enzyms partiell die *rsp5-1*-Mutante (Abb. 2-21d). Eine ähnliche genetische Interaktion wurde bereits mit Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes festgestellt. Erneut scheint ein in *rsp5-1*-Mutanten limitierter Faktor durch die Inaktivierung von UFD2 stabilisiert zu werden. Dies deutet auf eine funktionelle Interaktion zwischen UFD2 und RSP5 in Hefezellen hin.

Es wurde daher die Stabilität von SPT23 p90 in Wildtypzellen mit der SPT23 p90-Lebensdauer in $\Delta ufd2$ - oder *ufd2^{ΔUBOX}*-Zellen verglichen (Abb. 2-21c). SPT23 p90 wird durch Inaktivierung von UFD2 zwar nicht vollständig, aber reproduzierbar stabilisiert. Die Halbwertszeit des prozessierten Transkriptionsfaktors steigt von

weniger als 30 Minuten in Wildtyphefen auf etwa 70 Minuten in *ufd2*-Mutanten an. In Übereinstimmung mit der fehlenden ER-Assoziation des E4-Enzyms ist die Prozessierung von SPT23 p120 unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt. Als Kontrollprotein diente das integrale ER-Membranprotein OLE1, welches über Ubiquitin/Proteasom-abhängigen ER-assoziierten Proteinabbau degradiert wird (Braun et al., 2002). OLE1 ist ebenso ein kurzlebiges Protein, dessen Halbwertszeit jedoch in $\Delta ufd2$ -Mutanten nicht verändert ist. UFD2 fördert spezifisch den Abbau von SPT23, womit SPT23 p90 als erstes Substrat des E4-Enzyms identifiziert ist. UFD2 ist jedoch für die SPT23 p90-Degradation nicht essentiell.

Die Ausbildung langer Multiubiquitinketten wird wichtiger, wenn die Erkennung ubiquitiniertes Proteine durch das Proteasom inhibiert ist. Ein Ubiquitin-bindendes Protein des 19S-Aufsatzes des Proteasoms, RPN10, wird für den Abbau des artifizialen Substrates Ubi-Pro Gal benötigt. *rpn10*-Deletionsmutanten zeigen zudem mit *ufd2*-Deletionsmutanten einen leichten synthetischen Wachstumsdefekt (Koegele et al., 1999), sodaß es nahe lag, die Lebensdauer von SPT23 p90 in $\Delta rpn10 \Delta ufd2$ -Doppelmutanten zu untersuchen (Abb. 2-21c). Während die Stabilität des Kontrollproteins OLE1 in $\Delta rpn10 \Delta ufd2$ -Doppelmutanten nicht verändert ist, ist die Halbwertszeit von SPT23 p90 deutlich erhöht. Da die Einzeldelation von *RPN10* keinen Einfluß auf die Lebensdauer von SPT23 p90 besitzt (Daten nicht gezeigt), unterstreicht dies die Beteiligung von UFD2 am effizienten Abbau des aktiven Transkriptionsfaktors.

SPT23 p90 wird zunächst durch CDC48^{UFD1/NPL4} mobilisiert, später aber mit Unterstützung von UFD2 abgebaut. Im OLE-Weg wirkt UFD1 damit vor UFD2, was durch die Analyse der entsprechenden Doppelmutanten unterstützt wurde. Hierfür wurde die Lokalisation des prozessierten Transkriptionsfaktors in *ufd1-2*-, $\Delta ufd2$ - sowie *ufd1-2 \Delta ufd2*-Zellen untersucht. Während SPT23 p90 in Wildtyp- und $\Delta ufd2$ -Hefezellen als Kernprotein akkumuliert, findet es sich sowohl in *ufd1-2*- als auch in *ufd1-2 \Delta ufd2*-Doppelmutanten an der ER-Membran (Abb. 2-21e). Die *ufd1-2*-Mutation ist daher epistatisch über die *ufd2*-Deletion.

5.5 Stabilisiertes SPT23 p90 akkumuliert im Zellkern

SPT23 p90 ist ein kurzlebiges Protein, das nach RSP5- und UFD2-vermittelter Multiubiquitinierung vom 26S-Proteasom abgebaut wird. Es wurden mehrere Transkriptionsfaktoren beschrieben, die durch das Ubiquitin/Proteasom-System degradiert werden. Manche dieser Proteine, wie p53, werden nach Ubiquitinierung zunächst aus dem Zellkern exportiert und damit unter anderem durch das Exportereignis inaktiviert (Geyer et al., 2000; Boyd et al., 2000). Andere

Transkriptionsfaktoren scheinen dagegen im Zellkern durch das Proteasom abgebaut und dadurch inaktiviert zu werden (Gianni et al., 2002).

Trotz der Deletion mehrerer in Frage kommender Sequenzmotive konnte keine Kernimportsequenz in SPT23 nachgewiesen werden. Es mußte somit indirekt untersucht werden, ob SPT23 p90 inner- oder außerhalb des Zellkerns abgebaut wird. Dazu wurde die Lokalisation des Transkriptionsfaktors in Wildtypzellen und in SPT23 p90 stabilisierenden Mutanten ($\Delta ufd2$, $\Delta ufd2 \Delta rpn10$, $cim3-1$, $rsp5-2$) analysiert (Abb. 2-21e). Würde die proteasomale Degradation außerhalb des Zellkerns stattfinden, so sollte die Stabilisierung des prozessierten Transkriptionsfaktors eine verstärkte Anreicherung von löslichem SPT23 im Zytoplasma nach sich ziehen. Dies ist nicht der Fall. Vielmehr wird in diesen Mutanten die Kernakkumulation von SPT23 p90 noch verstärkt. Zusätzlich führt eine Inhibition des Kernexports in Mutanten des generellen Exportfaktors XPO1 ($xpo1-1$) nicht zu einer Stabilisierung von SPT23 p90 (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß SPT23 p90 im Zellkern multiubiquitiniert und abgebaut wird. Der Abbau des Proteins ist damit dessen vermutlich vorrangiger Inaktivierungsmechanismus.

5.6 *ufd2*-Mutanten sind gegenüber Ölsäure hypersensitiv

Da mit SPT23 p90 ein Substrat der UFD2-vermittelten Multiubiquitinierung identifiziert wurde, wurden *ufd2*-Mutanten auf einen Phänotyp im OLE-Weg getestet. SPT23 aktiviert die Expression von *OLE1*, der 9-Fettsäuredesaturase der Hefe. Die zelluläre Menge an *OLE1* ist über Transkription, mRNA-Stabilität und Proteinabbau streng reguliert (Gonzalez und Martin, 1996; Hoppe et al., 2000; Braun et al., 2002). Zugabe von bestimmten ungesättigten Fettsäuren, wie Palmitolylsäure (16:1), Linolsäure (18:2) oder Linolensäure (18:3), verhindert die Prozessierung des SPT23-Transkriptionsfaktors an der ER-Membran. Obwohl die zelluläre Menge an *OLE1*-Protein in Gegenwart von Ölsäure (18:1) ebenso verringert wird, inhibiert Ölsäure im Gegensatz zu den anderen ungesättigten Fettsäuren die Prozessierung nicht (Hoppe et al., 2000). Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium kann daher benutzt werden, um die Auswirkung der SPT23 p90-Stabilisierung unter Bedingungen, unter denen die Transkription von *OLE1* reprimiert werden muß, zu untersuchen.

Dabei wurde zunächst die Menge an exprimiertem *OLE1*^{myc}-Protein nach Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium in Wildtyphefen sowie in $\Delta ufd2$ - bzw. $\Delta ufd2 \Delta rpn10$ -Hefen im anti-myc-Immunoblot detektiert. Die Expression von *OLE1*^{myc} wird nach Zugabe von Ölsäure in jedem der untersuchten Stämme reprimiert. Es fällt jedoch auf, daß dieser Effekt in $\Delta ufd2$ -Mutanten schwach, in $\Delta ufd2 \Delta rpn10$ -Mutanten stark verlangsamt ist (Abb. 2-22a). In diesen Mutanten ist der Abbau der Fettsäuredesaturase nicht inhibiert (Abb. 2-21c), weshalb der beobachtete Effekt auf

erhöhte *OLE1*-Transkription oder -Translation zurückgeführt werden kann. Dies stimmt mit der beobachteten Inhibition des SPT23 p90-Abbaus in den jeweiligen Mutanten überein. Ein kurzlebiger Transkriptionsfaktor ist offensichtlich Voraussetzung dafür, daß Hefezellen die Menge an *OLE1*-Protein schnell und effizient regulieren und sich damit an die veränderten Umweltbedingungen anpassen können.

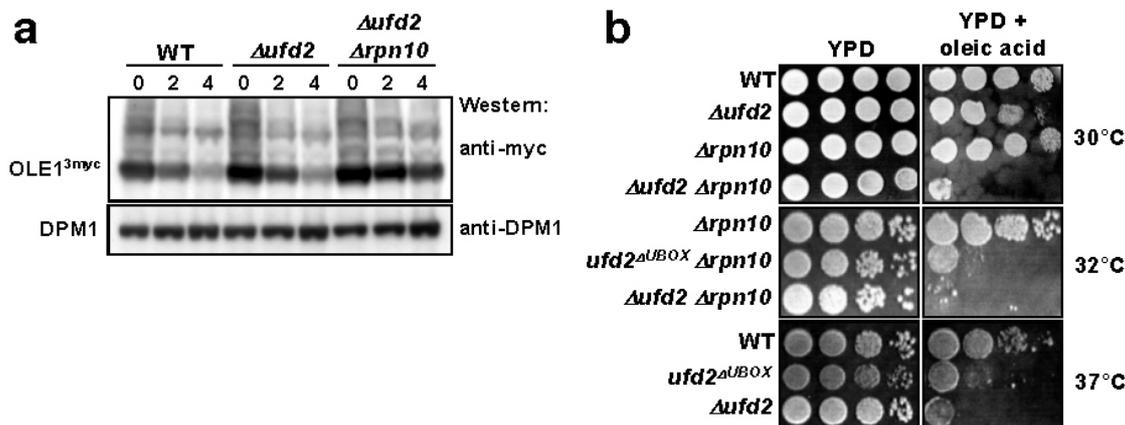


Abbildung 2-22: *ufd2*-Mutanten sind hypersensitiv gegenüber Ölsäure im Wachstumsmedium.

a. Die Expression von *OLE1* ist in *ufd2*-Mutanten misreguliert. Die Expression von *OLE1^{3myc}* wurde vor (Zeitpunkt 0) und 2 bzw. 4 Stunden nach Zugabe von Ölsäure zum Wachstumsmedium in den angegebenen Hefestämmen im anti-myc-Immunoblot untersucht. **b.** *Ufd2*-Mutanten sind auf Ölsäure-supplementierten Platten nur beschränkt wachstumsfähig. Die entsprechenden Hefestämme wurden in jeweils zehnfacher Verdünnung auf YPD- und YPD+Ölsäure-Platten gebracht und bei der angegebenen Temperatur für mindestens drei Tage inkubiert.

Wie wirkt sich die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors bei dauerhaft hoher Versorgung mit ungesättigten Fettsäuren aus? *ufd2*-Deletionsmutanten sind bei höherer Temperatur auf mit Ölsäure supplementiertem Medium nicht wachstumsfähig (Abb. 2-22b). $\Delta ufd2 \Delta rpn10$ -Zellen zeigen diesen Effekt schon bei Raumtemperatur. Die Stabilisierung des SPT23-Transkriptionsfaktors ist bei Anwesenheit von Ölsäure im Medium daher toxisch. Dies entspricht der Erwartung, da eine Überproduktion ungesättigter Fettsäuren zu Aberrationen im Membransystem und damit zu pleiotropen Defekten in Kerntransport, im Sekretionsweg oder in der Sortierung von Proteinen in der Zelle führt.

6. UFD3 wird analog zu UFD2 durch CDC48^{UFD1/NPL4} reguliert

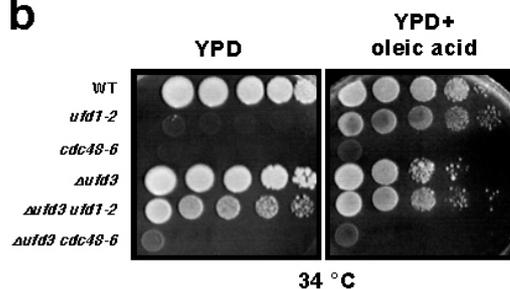
6.1 UFD3 bindet CDC48 in Abhängigkeit von UFD1

Da UFD2 Substrate in Abhängigkeit von CDC48^{UFD1/NPL4} bindet, wurde dies auch für weitere Interaktoren der AAA-ATPase CDC48 untersucht. Ein seit langem bekannter und wenig charakterisierter CDC48-Bindungspartner ist UFD3. UFD3 wird für den Abbau von Ubi-Pro gal benötigt (Johnson et al., 1995; Ghislain et al., 1996). Es besitzt am N-Terminus sechs WD40-Wiederholungen, die eine propellerähnliche Interaktionsoberfläche darstellen könnten (Abb. 2-23a). *Δufd3*-Hefezellen sind wie *RSP5*-Mutanten resistent gegenüber Isofluoran und hypersensitiv gegenüber Cadmium (Wolfe et al., 1998; Wolfe et al., 1999). Die genaue zelluläre Funktion von UFD3 ist jedoch unbekannt.

a



b



c

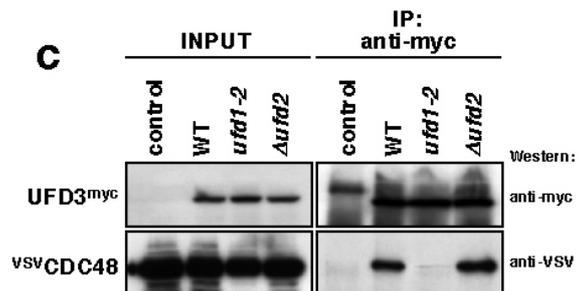


Abbildung 2-23: UFD3 interagiert mit CDC48 in Abhängigkeit von UFD1. **a.** Domänenstruktur von UFD3. Am N-Terminus finden sich sechs WD40-Wiederholungen. **b.** Genetische Interaktion zwischen UFD3 und Komponenten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes. Die angegebenen Mutanten wurden auf YPD- sowie auf YPD+Ölsäureplatten in serieller Verdünnung ausplattiert und bei 34°C für 3 Tage inkubiert. **c.** UFD3 wechselwirkt in *ufd1-2*-Mutanten kaum mit CDC48. UFD3^{myc} wurde durch anti-myc-Antikörper gefällt und auf gebundenes CDC48 im anti-VSV-Immunoblot analysiert. Die Präzipitationen wurden aus Lysaten von WT-, *ufd1-2*- und *Δufd2*-Hefezellen durchgeführt. INPUT zeigt zehn Prozent der eingesetzten Proteinmenge.

Um Aufschluß über die funktionelle Beziehung zwischen UFD3 und CDC48 zu erhalten, wurde der *Δufd3*-Hefestamm mit Mutanten des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes gekreuzt (Abb. 2-23b). Interessanterweise kann die Deletion von UFD3 die *ufd1-2*-Mutante fast vollständig, die *cdc48-6*-Mutante jedoch nicht retten. Andererseits bewirkt die Deletion von UFD3 im *cdc48-6*-Hintergrund keine synthetischen

Wachstumsdefekte (Daten nicht gezeigt). UFD3 interagiert genetisch mit UFD1 und kann dadurch mit dem OLE-Weg verknüpft werden.

Die Wechselwirkung zwischen CDC48 und UFD3 wurde mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen getestet. UFD3^{myc} wurde aus Lysaten von Wildtyp-, *ufd1-2*- und Δ *ufd2*-Zellen durch anti-myc-Antikörpern gefällt. Die Immunpräzipitate wurden anschließend auf gebundenes ^{VSV}CDC48 im anti-VSV-Immunoblot untersucht (Abb. 2-23c). In diesem Experiment verhielt sich UFD3 analog zu UFD2. Während CDC48 und UFD3 in Wildtyphefen stabil miteinander wechselwirken, kann diese Interaktion in *ufd1-2*-Mutanten kaum beobachtet werden. Die Deletion von UFD2 hingegen zeigt keinen Einfluß auf die CDC48/UFD3-Wechselwirkung.

Im Gegensatz zu UFD2 kann UFD3 mit UFD1 im Zwei-Hybrid-System interagieren (Abb. 2-24a). UFD3 könnte theoretisch CDC48 indirekt durch UFD1 binden. Die verminderte Assoziation von UFD3 mit CDC48 in *ufd1-2*-Mutanten kann daher nicht eindeutig mit der unter diesen Bedingungen inhibierten Substratbindung der Segregase verknüpft werden.

6.2 Die Lokalisation von UFD3 ist abhängig von funktionellem CDC48^{UFD1/NPL4}

Die stabile Wechselwirkung zwischen UFD2 und CDC48 war für die korrekte Lokalisation des E4-Enzyms im Zellkern von Bedeutung. Aufgrund der Parallelen zwischen UFD2 und UFD3 hinsichtlich des CDC48-Bindungsverhaltens wurde daher untersucht, in wie weit sich die gestörte Interaktion mit CDC48 auf die Lokalisation von UFD3 auswirkt. Dazu wurden UFD3^{myc} exprimierende Hefestämme mit Hilfe einer anti-myc-Immunfluoreszenz analysiert. In Wildtyphefen kolokalisiert UFD3 mit UFD1 und UFD2 im Zellkern, wohingegen in *ufd1-2*-Mutanten keine nukleäre Akkumulation mehr beobachtet wird (Abb. 2-24b). Die Deletion von *UFD2* hat keinen Einfluß auf die UFD3-Lokalisation. UFD3 verhält sich in seiner Lokalisation wie UFD2, was eine Überlappung des Substratspektrums beider Proteine vermuten läßt.

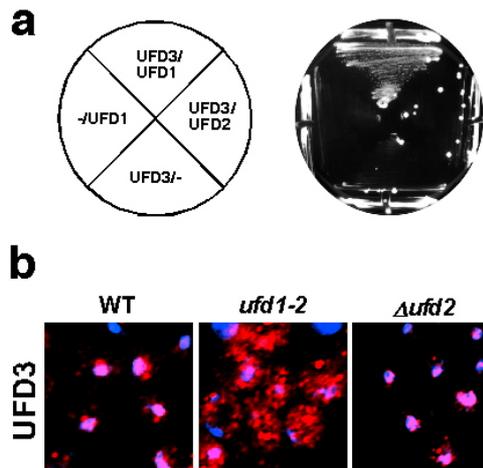


Abbildung 2-24: Die Lokalisation von UFD3 wird durch Bindung an CDC48 beeinflusst. a. UFD3 kann in Zwei-Hybrid-System mit UFD1 interagieren. **b.** Die Lokalisation von UFD3^{myc} wurde in WT-*ufd1-2*- und $\Delta ufd2$ -Hefezellen durch indirekte Dekonvolutionsimmunfluoreszenz analysiert.

6.3 UFD3 kann am Abbau des SPT23 p90-Transkriptionsfaktors beteiligt sein

Da die Deletion von *UFD3* die *ufd1-2*-Mutante supprimieren kann, lag die Vermutung nahe, daß UFD3 den Abbau von SPT23 p90 beeinflussen könnte. In $\Delta ufd3$ -Hefeellen läßt sich nur wenig freies Ubiquitin nachweisen (Johnson et al., 1995). Daher können manche Proteolysedefekte in *ufd3*-Deletionsmutanten durch heterologe Überexpression von Ubiquitin partiell gerettet werden (Ghislain et al., 1996). Der Abbau von SPT23 p90 wurde daher zusätzlich nach Ubiquitin-Überexpression in *Promoter-Shutoff*-Experimenten untersucht.

Wie aus den Parallelen zwischen UFD2 und UFD3 erwartet wurde, ist SPT23 p90 in $\Delta ufd3$ -Zellen stabilisiert (Abb. 2-25a). Im Gegensatz dazu ist die Prozessierung des Transkriptionsfaktors in $\Delta ufd3$ -Mutanten kaum inhibiert. Die Überexpression von Ubiquitin mildert den Abbaufekt der Mutanten nicht. UFD3 scheint demnach am Abbau des Transkriptionsfaktors beteiligt zu sein, wenngleich dieser Effekt indirekt durch limitierende Ubiquitinmengen begründet sein könnte.

Wird die Lokalisation von SPT23 p90 durch Immunfluoreszenzmikroskopie in $\Delta ufd3$ -Mutanten untersucht, so findet sich der Transkriptionsfaktor gehäuft im Zellkern. Die Deletion von *UFD3* inhibiert nicht die CDC48-abhängige Mobilisierung (Abb. 2-25b). Die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors bewirkt daher erneut eine verlängerte Zeitdauer der SPT23 p90-Aktivität. In Übereinstimmung damit läßt sich auch bei $\Delta ufd3$ -Hefezellen eine Hypersensitivität gegenüber Ölsäure im Wachstumsmedium beobachten, die weniger deutlich als in $\Delta ufd2$ -Hefezellen ausgeprägt ist (Abb. 2-25c). Unabhängig davon, ob SPT23 p90 direkt oder indirekt in

SPT23 p90-Zellen stabilisiert wird, zeigen diese Mutanten den dafür erwarteten Phänotyp.

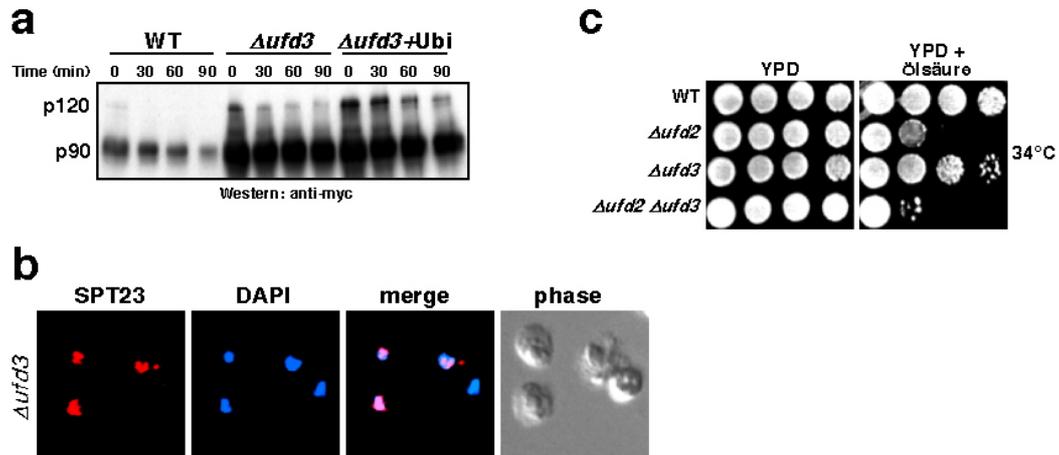


Abbildung 2-25: SPT23 p90 ist in $\Delta ufd3$ -Mutanten im Kern stabilisiert. **a.** Stabilisierung von SPT23 p90 in $\Delta ufd3$ -Mutanten. Die Stabilität von SPT23 wurde in *Promoter-Shutoff*-Experimenten in WT- und $\Delta ufd3$ -Zellen analysiert. In $\Delta ufd3$ -Zellen wurde zusätzlich Ubiquitin überexprimiert. **b.** Lokalisierung von SPT23 in $\Delta ufd3$ -Zellen. SPT23 wurde durch anti-myc-Immunfluoreszenz detektiert. **c.** $\Delta ufd3$ -Zellen zeigen einen milden Wachstumsdefekt auf Ölsäure-haltigen Platten. Die angegebenen Stämme wurden bei 34 °C auf YPD- bzw. auf YPD+Ölsäure-Platten für drei Tage inkubiert.

Diskussion

Die Erkennung ubiquitiniertes Proteine durch das 26S-Proteasom führt in der Regel zum prozessiven Abbau des Ubiquitinkonjugates. Wenige Proteine, wie die Transkriptionsfaktoren NF- κ B aus Säugern oder die in dieser Arbeit charakterisierten SPT23 und MGA2 aus *S. cerevisiae*, werden nur partiell degradiert oder prozessiert. Durch diese ungewöhnliche Reaktion werden aus inaktiven Vorläufern verkürzte Proteine definierter Aktivität gebildet. Regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung (RUP), deren Mechanismus noch weitgehend ungeklärt ist, stellt einen wichtigen Mechanismus der Transkriptionsregulation in Eukaryonten dar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß für die durch das 26S-Proteasom katalysierte Prozessierung der SPT23- und MGA2-Transkriptionsfaktoren aus *S. cerevisiae* die Ausbildung stabiler Homodimere notwendig ist. Die Dimerisierung schützt die transkriptionsaktivierenden Domänen vor proteasomaler Degradation. Membranständige SPT23 p120/p90-Komplexe werden anschließend durch die ubiquitin-selektive Segregase CDC48^{UFD1/NPL4} disassembliert. Dies ermöglicht, daß monoubiquitiniertes SPT23 p90 in den Zellkern transportiert wird und dort die Transkription des *OLE1*-Genes aktiviert. CDC48 koordiniert ebenso spätere Ereignisse, die den Abbau des aktiven Transkriptionsfaktors nach sich ziehen. Es ist damit ein zentraler Regulator des OLE-Wegs und des Ubiquitin/Proteasom-Systems.

1. Die Ähnlichkeit der SPT23-Prozessierung zu NF- κ B gibt Hinweise auf den Mechanismus der Prozessierungsreaktion

Das erste Protein, dessen Aktivierung durch proteasomale Prozessierung beschrieben wurde, war NF- κ B, ein in Säugern für die Schmerz- und Immunantwort essentieller Transkriptionsfaktor (Fan und Maniatis, 1991; Palombella et al., 1994). NF- κ B existiert als Heterodimer, dessen eine Untereinheit als 105 kDa-Vorläuferprotein synthetisiert wird. Nach Ubiquitinierung wird NF- κ B p105 durch das 26S-Proteasom zu einem 50 kDa-großen Protein (p50) prozessiert, welches mit einem weiteren Aktivator, p65, wechselwirkt (Baeuerle und Baltimore, 1989). Aufgrund der beobachteten Prozessivität des Proteasoms wurde zunächst vorgeschlagen, daß p105 posttranslational vom C-Terminus beginnend durch das Proteasom abgebaut wird, bis eine glycinreiche „Stop-Transfer-Sequenz“ erreicht wird (Ciechanover et al., 2001). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten sowie weitere publizierte Befunde unterstützen jedoch ein alternatives, die NF- κ B- und SPT23/MGA2-Prozessierung erklärendes Modell (Lin et al., 2000; Lee et al., 2001; diese Arbeit).

NF- B p105 wird sowohl post- als auch kotranslational prozessiert (Lin et al., 1998; Lin et al., 2000; Xiao et al., 2001). Für die kotranslationale Prozessierung ist die Wechselwirkung zwischen naszierenden Ketten zweier aufeinander folgender Ribosomen essentiell. Dies führt zu Ribosom-assoziierten p105/p50-Dimeren (Lin et al., 2000). Da die naszierenden Ketten nicht vollständig synthetisiert bzw. deren C-Termini im Ribosom verborgen sind, kann die kotranslationale Prozessierung von NF- B p105 nicht durch prozessive, am C-Terminus startende Degradation des Vorläufers erfolgen. Vielmehr muß eine endoproteolytische, von der Aktivität des Proteasoms abhängige Spaltungsreaktion postuliert werden. Die Prozessierung der ursprünglich ER-ständigen Transkriptionsfaktoren SPT23 und MGA2 stützt diese Hypothese. Im Gegensatz zu NF- B werden SPT23/MGA2 zwar kaum kotranslational prozessiert, ihre C-Termini sind jedoch durch die Membraninsertion in gleicher Weise vor proteasomalem Angriff geschützt (Hoppe et al., 2000). Auch in der Prozessierungsreaktion von SPT23 und MGA2 kann daher ein initieller endoproteolytischer Schnitt des Proteasoms angenommen werden.

Erlaubt die bekannte dreidimensionale Struktur des Proteasoms diesen möglichen endoproteolytischen Schnitt? Das 26S-Proteasom ist eine kompartmentalisierte Protease, deren aktive Zentren im Inneren des Komplexes verborgen sind (Löwe et al., 1995; Groll et al., 1997). Der Zugang zur proteolytischen Kammer wird durch die Wechselwirkung der AAA-ATPase RPT2 des 19S-Regulatorpartikels mit N-terminalen Extensionen der -Untereinheiten des Kernpartikels kontrolliert (Köhler et al., 2000; Groll et al., 2001). Wird der Zugang zum Proteasom in einer ATP- und RPT2-abhängigen Reaktion geöffnet, so bildet sich ein Kanal mit einem Durchmesser von ca. 13 Å aus. Die zentrale Öffnung des archaebakteriellen Proteasoms besitzt gleichermaßen einen Durchmesser von weniger als 20 Å (Wenzel und Baumeister, 1995). Es können somit nur entfaltete Proteine durch das 26S-Proteasom abgebaut werden. Eine durch einen proteasomalen, endoproteolytischen Schnitt initiierte Prozessierungsreaktion erfordert deshalb die Ausbildung einer Haarnadelschleife im Substratprotein, die in das Proteasom eingeführt werden kann. Der Durchmesser des zu den katalytischen Untereinheiten des Proteasoms führenden Kanals ist weit genug, um zwei benachbarte, entfaltete Polypeptidketten einer Haarnadelschleife aufzunehmen (M. Groll, pers. Mitteilung; Lee et al., 2002; Abb. 3-1). Die Entfernung der aktiven Zentren vom Eingang des Proteasoms entspricht der Länge eines entfalteten, etwa zwanzig Aminosäuren langen Peptids. Eine entsprechende Haarnadelschleife müßte daher etwa 40 Aminosäuren umfassen und könnte einen möglichen endoproteolytischen Schnitt mechanistisch erklären.

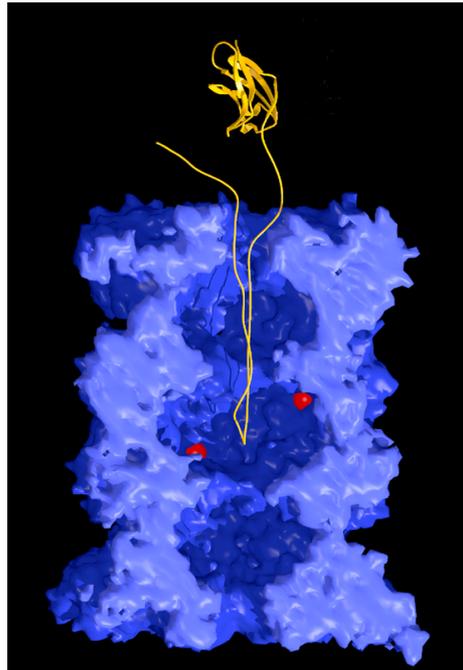


Abbildung 3-1: Eine Haarnadelschleife könnte als Initiationspunkt einer proteasomalen Prozessierungsreaktion dienen. Die Abbildung zeigt die dreidimensionale Struktur eines vertikal geschnittenen 20S-Proteasoms (blau; Groll et al., 1997). Eine Haarnadelschleife einer entfalteten Polypeptidkette wurde in die Struktur modelliert. Als Vergleich wurde diese mit gefaltetem NF- B p50 verknüpft (Müller et al., 1996).

Postuliert man eine Haarnadelschleife als Initiationspunkt proteasomaler Prozessierung, muß in den Substratproteinen eine intrinsisch labile oder reguliert destabilisierbare Peptidsequenz vorhanden sein, die eine lokale Entfaltung des Proteins zulassen würde. In NF- B scheint hierfür eine glycinreiche Region (GRR), prädestiniert (Lin und Ghosh, 1996; Betts und Nabel, 1996; Heusch et al., 1999). Die Entfaltung dieser Region ist vermutlich wenig energieaufwendig, und zudem wird die Einführung einer glycinreichen Haarnadelschleife ins Proteasom kaum durch sterisch anspruchsvolle Seitenketten behindert. Interessanterweise ist die GRR für die Prozessierung des NF- B-Transkriptionsfaktors essentiell und kann diese auch in heterologer Umgebung initiieren (Lin und Ghosh, 1996; Betts und Nabel, 1996). Die GRR schützt jedoch die N-terminale Transkriptionsaktivierungsdomäne nicht vor proteasomaler Degradation, da NF- B p105 bei N-terminal von dieser Region liegenden Mutationen vollständig abgebaut werden kann (Lee et al., 2001). Die glycinreiche Region ist daher für einen frühen, der Ubiquitinierung folgenden Schritt der Prozessierung, z.B. für den postulierten endoproteolytischen Schnitt, notwendig. In SPT23 und MGA2 wird auf der Ebene der Primärstruktur kein homologer Bereich gefunden. Allerdings befinden sich an analoger Stelle der Proteine Regionen niedriger Sequenzkomplexität, die eine ähnliche Funktion übernehmen könnten.

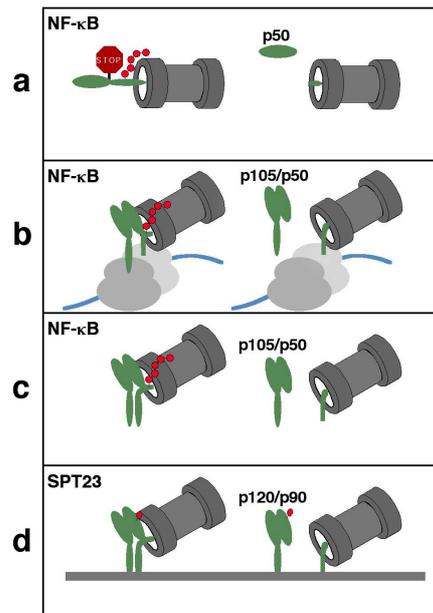


Abbildung 3-2: Modelle der proteasomalen Prozessierung von NF- κ B und SPT23. **a.** Das „Stop-Transfer-Modell“ der posttranslationalen NF- κ B-Prozessierung. NF- κ B wird nach Ubiquitinierung vom Proteasom erkannt und prozessiv vom C-Terminus beginnend abgebaut. Bei Erreichen eines putativen Stop-Transfer-Signals wird die Degradation abgebrochen und p50 freigesetzt. **b.** Modell der kotranslationalen NF- κ B-Prozessierung. Die sich faltende N-terminale Domäne einer naszierenden p105-Polypeptidkette interagiert am Ribosom mit einer naszierenden Kette des Vorläuferribosoms. Die ubiquitinierte Polypeptidkette wird endoproteolytisch durch das Proteasom gespalten. Nach vollständiger Translation des nicht-geschnittenen NF- κ B dissoziiert ein p105/p50-Komplex vom Ribosom. **c,d.** „Haarnadel-Modell“ der posttranslationalen Prozessierung von NF- κ B (c) und SPT23 (d). Die ubiquitinierten Moleküle werden endoproteolytisch nach Ausbildung einer Haarnadelschleife durch das Proteasom gespalten. Während die N-terminalen Domänen durch stabile Wechselwirkungen vor proteasomalem Abbau geschützt sind, werden die C-terminalen Domänen schnell abgebaut. Das Resultat der proteasomalen Prozessierung sind NF- κ B p105/p50- und SPT23 p120/p90-Komplexe. Diese werden anschließend durch spezifische Chaperone (BCL-3 für NF- κ B; CDC48^{UFD1/NPL4} für SPT23 p90) disassembliert.

Schneidet das Proteasom endoproteolytisch, muß ein Signal existieren, welches die transkriptionsaktivierenden Domänen in NF- κ B und SPT23 vor Proteolyse schützt. In eleganten Arbeiten zum Abbau des artifiziellen Proteasomsubstrates Ubi-DHFR konnte gezeigt werden, daß die Proteolyse des Enzyms DHFR nach Bindung des Liganden Methotrexat inhibiert ist (Johnston et al., 1995). Methotrexat stabilisiert DHFR und verhindert dadurch die Entfaltung des Substrates durch das Proteasom. Dies wurde in weiterführenden Studien, in denen kurzlebige Proteine durch lineare Fusion mit stabil gefalteten Proteinen vor Abbau geschützt wurden, bestätigt (Lee et al., 2001). Eine stabil gefaltete Domäne kann daher gegenüber proteasomalem Verdau resistent sein.

Ebenso wie die stabile Faltung einer einzelnen Domäne kann die Einbindung in oligomere Komplexe die für den proteasomalen Abbau essentielle Entfaltung des Substrates inhibieren. NF- κ B und SPT23 nutzen dies offenbar, um ihre N-terminalen Transkriptionsaktivierungsdomänen vor proteasomaler Degradation zu schützen. Interessanterweise dimerisieren beide Proteine mittels der hochkonservierten IPT-Domäne (Müller et al., 1995; diese Arbeit). Die räumliche Struktur der Dimerisierungsoberfläche des NF- κ B-Homodimers zeigt eine Verzahnung hydrophober Seitenketten von Aminosäuren beider Untereinheiten (Müller et al., 1995). Diese Aminosäuren sind nahezu vollständig in der IPT-Domäne von SPT23 konserviert (Abb. 2-2). Die gebildeten Dimere sind aufgrund des verzahnten und hydrophoben Charakters der Bindung sehr stabil. Die Deletion oder Mutationen innerhalb der Dimerisierungsoberfläche verhindern die Prozessierung und fördern im Gegenzug den vollständigen Abbau beider Proteine (Lin et al., 1998, Lin et al., 2000; Lee et al., 2001; diese Arbeit). Es ist daher wahrscheinlich, daß die Ausbildung der stabilen Vorläuferkomplexe das „Stop-Transfer-Signal“ der Prozessierung darstellen. Interessanterweise wird auch das dritte bekannte Substrat proteasomaler Prozessierung, der Transkriptionsfaktor Cubitus interruptus aus *D. melanogaster*, nur nach Einbindung in hochmolekulare Komplexe prozessiert (Ingham, 1998; Nourredine et al., 2002). Eine Übersicht der vorgeschlagenen Prozessierungsmechanismen zeigt Abb. 3-2.

2. CDC48^{UFD1/NPL4} wirkt als ubiquitin-selektive Segregase

Eine vor proteasomalem Abbau schützende Dimerisierung muß stabil genug sein, der Entfaltungsaktivität der AAA-ATPasen des 19S-Regulatorpartikels standzuhalten. Das Resultat einer Prozessierungsreaktion sind daher stabile Komplexe aus einem nicht-geschnittenen Vorläuferprotein (*processing template*) und dem Prozessierungssubstrat (*processing substrate*). Diese Komplexe werden sowohl bei NF- κ B als auch bei SPT23/MGA2 als Intermediate beobachtet (Betts und Nagel, 1996; Lin et al., 2000; diese Arbeit). Für das Herauslösen der prozessierten Transkriptionsfaktoren aus den für ihre Funktion inhibitorischen Dimeren werden besondere Chaperone benötigt. NF- κ B p50 kann durch das Ankyrin-ähnliche Protein BCL-3, SPT23 durch die ubiquitin-selektive Segregase CDC48^{UFD1/NPL4} mobilisiert werden (Watanabe et al., 1997; Braiser et al., 2001; Michel et al., 2001; diese Arbeit).

CDC48 gehört zur Klasse der AAA-ATPasen, die in verschiedensten zellulären Kontexten gefunden werden (Übersicht in Neuwald et al., 1999). Die sechs AAA-ATPasen des 19S-Regulatorpartikels des Proteasoms erkennen Ubiquitin und können Proteine entfalten (Braun et al., 1999; Lam et al., 2002). NSF, ein enger Verwandter von CDC48, bindet stabile SNARE-Komplexe und entwindet diese, um

Membranfusionereignisse zu ermöglichen (Söllner et al., 1993; Whiteheart et al., 1994). Zusätzlich stabilisiert NSF SNARE-Proteine in ihrer monomeren, fusionskompetenten Konformation (Müller et al., 2002). Bakterielle AAA-ATPasen der Clp- und Lon-Familie vermitteln die Entfaltung und den Abbau bestimmter Proteine, während verwandte Proteine diese Aufgabe in Mitochondrien übernehmen (Weber-Ban et al., 1999; Leonhard et al., 1999; Leonhard et al., 2000). Daneben können Proteine dieser Klasse auch als Helikasen, in der Organellbiosynthese oder während der Transkriptionsregulation wirken. Allen AAA-ATPasen scheint dabei die Fähigkeit, Proteinkomplexe zu organisieren oder zu disassemblieren, gemeinsam zu sein (Patel und Latterich, 1998; Neuwald et al., 1999).

CDC48 vermittelt eine Komplexdisassemblierungs- oder Segregasefunktion im OLE-Weg, indem es SPT23 p90 aus membranständigen SPT23 p120/p90-Komplexen in einer ATP-abhängigen Reaktion mobilisiert. CDC48 besteht aus drei Domänen (N, D1, D2) und ist als ringförmiges Hexamer organisiert (Zhang et al., 2001). ATP-Bindung verursacht eine zueinander versetzte Bewegung dieser Domänen, wodurch die substratbindenden flexiblen N-Domänen weiter voneinander entfernt werden (Rouiller et al., 2000). Eine ähnliche nukleotidabhängige Konformationsänderung wurde bei dem CDC48-Homologen NSF beobachtet (Hanson et al., 1997; May et al., 2001). Dieser der Öffnung einer Fotoblende vergleichbare Vorgang kann den zur Entwindung der stabilen Komplexe notwendigen Kraftpuls liefern. Im Falle von SPT23 resultiert dies zudem in der Bindung des prozessierten Transkriptionsfaktors an CDC48.

Eine ähnliche Funktion wurde für CDC48 während der Membranfusion vorgeschlagen (Latterich et al., 1995; Patel et al., 1998). Die für die Fusion zweier Membransysteme nötige Spezifität wird durch Paarung von SNARE-Proteinen des Vesikels (v-SNARE) mit SNARE-Proteinen der Zielmembran (t-SNARE) vermittelt (Pelham, 2001). Nach erfolgter Fusion müssen SNARE-Komplexe aufgelöst werden, um weitere Fusionsreaktionen zu ermöglichen (Ungermann et al., 1998; Xu et al., 1998). CDC48 bindet während der homotypischen Fusion von ER-Membranen das t-SNARE UFE1 und vermittelt vermutlich UFE1/UFE1-Komplexdisassemblierung (Patel et al., 1998). Während der postmitotischen Rekonstitution des Golgi-Apparates erkennt das CDC48-Orthologe höherer Eukaryonten, p97, das t-SNARE Syntaxin V (Rabouille et al., 1998). Nach CDC48/p97-vermittelter Segregation bleiben die SNARE-Proteine zunächst an CDC48 gebunden und gehen anschließend in weitere Membranfusionszyklen ein. Dies entspricht der Funktion von CDC48 im OLE-Weg: ein stabiler SPT23-Komplex wird entwunden, wobei ein Partner, SPT23 p90, an CDC48 gebunden bleibt. Vollängen-SPT23 kann hingegen nach Dimerisierung eine erneute Prozessierungsreaktion eingehen.

Wie kann CDC48 so unterschiedliche Substrate spezifisch erkennen? Im OLE-Weg und während des Abbaus des artifiziellen Substrates Ubi-Pro Gal erkennt CDC48 ubiquitinierte Substrate. Obwohl CDC48 diese direkt binden kann, erhöht der heterodimere Adaptor UFD1/NPL4 *in vivo* deutlich die Affinität der Segregase zu Ubiquitinkonjugaten. Interessanterweise ist UFD1 zur N-terminalen Substratbindedomäne von CDC48 homolog, was die sequentielle Übertragung von Substraten über UFD1 auf CDC48 ermöglichen könnte (Golbik et al., 1999). Im Zuge der Membranfusion bindet CDC48 hingegen den Adaptor SHP1/p47 (Kondo et al., 1997; Braun et al., 2002). Analog zu UFD1/NPL4 wird SHP1 zur Erkennung der SNARE-Proteine benötigt (Rabouiller et al., 1998). Die Bindung der beiden Adapter ist kompetitiv, sodaß diese den zellulären Kontext definieren, in dem CDC48 wirkt (Meyer et al., 2000). CDC48 assoziiert mit dem Adaptor SHP1 über dessen UBX-Domäne, die trotz fehlender Sequenzhomologie überraschenderweise Ubiquitin strukturell sehr ähnlich ist (Buchberger et al., 2001; Yuan et al., 2001; Braun et al., 2002). SHP1 blockiert dadurch vermutlich die Ubiquitinbindungsstelle von CDC48, während UFD1/NPL4 diese der Substratbindung zugänglicher gestaltet. Die Assoziation mit unterschiedlichen Adaptern kann daher die Substratspezifität der Segregase CDC48 erklären. Da dies CDC48 verschiedenen Prozessen zuführt, werden die Komplexe als CDC48^{UFD1/NPL4} oder CDC48^{SHP1} voneinander unterschieden.

CDC48 erinnert stark an die klassische AAA-ATPase der Membranfusionsereignisse, NSF (Mayer et al., 1996). Während der Membranfusion besitzt NSF zwei essentielle Funktionen (Söllner et al., 1993; Müller et al., 1999; Müller et al., 2002). Zunächst bindet NSF in Abhängigkeit des Adaptors SNAP an membranständige SNARE-Komplexe und entwindet diese in einer ATP-abhängigen Reaktion (Whiteheart et al., 1994). Dabei erkennt NSF interessanterweise verschiedene SNAP-Kofaktoren, die die Aktivität der AAA-ATPase zu spezifischen SNARE-Komplexen leiten (Clary et al., 1990; DeBello et al., 1995). Anschließend vermittelt NSF in einer ATP-unabhängigen Reaktion die Bindung von GATE-16 an das ungepaarte SNARE, sodaß dieses fusionskompetent bleibt (Müller et al., 2002). In gleicher Weise verhindert die Bindung von CDC48 an SPT23 p90, die auch nach erfolgter Mobilisierung beobachtet wird, die Reassoziierung von p90 mit membranständigem SPT23 p120. Die Funktionen der AAA-ATPasen sind daher sehr verwandt und werden durch Verwendung spezifischer Kofaktoren ihrem jeweiligen zellulären Kontext zugeführt.

Die vorgeschlagene Funktion des CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes als Segregase impliziert, daß seine Funktion im Ubiquitin/Proteasom-System auf die Disassemblierung oligomerer Komplexe beschränkt sein könnte. Tatsächlich wird CDC48^{UFD1/NPL4} weder für den Abbau des monomeren Ubi-DHFR noch für den des

monomeren Ubi-GFP benötigt und kann demnach als ubiquitin-spezifische Segregase verstanden werden (Bays et al., 2001; diese Arbeit).

3. CDC48 wirkt als Organisator ubiquitinabhängiger Prozesse

Die Ubiquitinselektivität der CDC48^{UFD1/NPL4}-Segregase wirft zwei Fragen auf: Wann erkennt CDC48 ein Ubiquitinkonjugat, d.h. nach Mono- oder erst nach dessen Multiubiquitinierung? Welche Konsequenz hat die Ubiquitinerkennung durch CDC48 für das Substrat?

Die Bindung von CDC48 an ubiquitinierte Proteine ist nach den in dieser Arbeit vorgestellten Daten nicht an die Multiubiquitinierung der Substrate gekoppelt. CDC48 erkennt ^{Ubi}GST und assoziiert damit mit einem monoubiquitinierten Protein. Zudem ist die Bindung an Ubiquitinkonjugate in Deletionsmutanten des E4-Enzyms UFD2, in denen die CDC48-assoziierte Multiubiquitinierung inhibiert ist, nicht verringert. CDC48 erkennt zusätzlich die einem monoubiquitinierten Protein vergleichbaren UBX-Domänen (Yuan et al., 2001; Braun et al., 2002). Diese Daten belegen, daß CDC48 monoubiquitinierte Proteine binden kann. Im CDC48-Hexamere sind jedoch sechs putative Ubiquitinbindungsstellen präsent, weshalb diese ubiquitin-selektive Segregase neben mono- auch oligo- oder multiubiquitinierte Substrate erkennen könnte (Dai et al., 2000).

Ubiquitinierung ist ein reversibler Vorgang. Neben der Art der Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle untereinander ist die Länge der Ubiquitinkette für das Schicksal des Substrates von entscheidender Bedeutung. Monoubiquitinierung kontrolliert den Transport mehrerer Plasmamembranproteine in die Vakuole, die Modifikation von Histonen, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren oder die Aktivität zentraler Proteine der DNA-Reparatur (Hicke et al., 2001; Salghetti et al., 2001; Höge et al., 2002; Sun und Allis, 2002). Multiubiquitinierung kann dagegen zum Abbau des Proteins durch das 26S-Proteasom führen (Chau et al., 1989). Es ist daher für Zellen überlebenswichtig, neben der Substratspezifität auch die Effizienz einer Ubiquitinierungsreaktion streng zu regulieren. CDC48^{UFD1/NPL4} könnte in diesem Prozeß eine wichtige regulatorische Funktion zukommen, da es den E4-Multiubiquitinierungsfaktor UFD2 kontrolliert.

Es war bereits bekannt, daß CDC48 mit dem E4-Enzym UFD2 wechselwirkt (Koegl et al., 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß diese Wechselwirkung von der vorherigen Substratbeladung der Segregase abhängig ist. Da UFD2 in Abwesenheit funktionellen CDC48^{UFD1/NPL4}-Komplexes weder *in vivo* mit Ubi-Pro Gal oder SPT23 p90 noch *in vitro* mit ^{Ubi}GST effizient wechselwirken kann, vermittelt CDC48 die stabile Bindung mono/oligoubiquitiniertes Substrate an das E4-

Enzym. CDC48 stellt durch die Ausbildung des ternären Komplexes aus Segregase, Substrat und E4-Enzym sicher, daß die E4-vermittelte Multiubiquitinierung der gebundenen Proteine der strikten Kontrolle der Segregase unterliegt.

Warum reguliert CDC48 die Multiubiquitinierung der an die Segregase gebundenen Proteine? Im OLE-Weg ist zunächst die für die Verlängerung der Ubiquitinkette inhibitorische Funktion von CDC48 offensichtlich. SPT23 p90 wird durch CDC48^{UFD1/NPL4} aus dem membranständigen SPT23 p120/p90-Komplex als ubiquitiniertes Protein mobilisiert. Die ubiquitinabhängige Bindung an CDC48 kann das Degradationssignal maskieren und so SPT23 p90 vor frühzeitigem Abbau im Zytosol schützen. Im Zellkern kann das dort lokalisierte UFD2 den CDC48/Substrat-Komplex erkennen und die Multiubiquitinierung des Transkriptionsfaktors initiieren. Ob die durch UFD2 vermittelte Ubiquitinierung ausreicht, um SPT23 p90 dem proteasomalen Abbau zuzuführen, ist gegenwärtig unklar. Es ist vorstellbar, daß zusätzliche Faktoren benötigt werden, um das Substrat von CDC48 zu dissoziieren. Alternativ könnte CDC48 auch die direkte Erkennung eines durch UFD2 nur oligoubiquitinierten Proteins durch das 26S-Proteasom katalysieren, da die Segregase als kopräzipitierendes Protein in Reinigungen des Proteasoms nachgewiesen wurde (Verma et al., 2000).

Nach diesem Modell hat CDC48 im Hinblick auf die Multiubiquitinierung eines gebundenen Proteins eine ambivalente Funktion. Zunächst inhibiert es die Ubiquitinierung und damit den Abbau eines Substrates, während es beide Prozesse zu einem späteren Zeitpunkt durch die Rekrutierung des E4-Enzyms fördern kann. Dies erinnert an das als anti-E4-Enzym charakterisierte Protein RAD23 (Ortolan et al., 2000; Chen et al., 2001; Chen und Madura, 2002). RAD23 bindet oligoubiquitinierte Substrate durch zwei konservierte UBA-Domänen und behindert dadurch deren Multiubiquitinierung (Ortolan et al., 2000; Wilkinson et al., 2001; Rao und Sastry, 2002). Im Gegensatz zu dieser inhibitorischen Funktion kooperiert RAD23 jedoch mit RPN10 in der proteasomalen Zielsteuerung der gebundenen Proteine und fördert dadurch deren Abbau (Elsasser et al., 2002; Chen und Madura, 2002). CDC48 und RAD23 könnten daher eine wichtige Klasse regulatorischer Proteine des Ubiquitin/Proteasom-Systems konstituieren, die die unproduktive Ubiquitinierung bestimmter Substrate inhibieren, um diese kontrolliert der proteasomalen Degradation zuzuführen.

Interessanterweise wurde eine gleichermaßen enge Kopplung zwischen einem Multiubiquitinierungsfaktor und einem Chaperon auch für das andere beschriebene U-Box-abhängige E4-Enzym CHIP beobachtet (Imai et al., 2002). CHIP wurde ursprünglich als Interaktionspartner der Hitzeschock-induzierten Chaperone Hsp70/Hsc70 und Hsp90 identifiziert (Ballinger et al., 1999). Analog zur UFD2-abhängigen CDC48-Ubiquitinierung kann CHIP die Ubiquitinierung des Chaperons

Hsc70, nicht aber dessen proteasomalen Abbau, vermitteln (Jiang et al., 2001). CHIP erkennt ebenfalls an Hsp70 gebundene Substrate, deren proteasomale Degradation es fördern kann (Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001; Imai et al., 2002; Xu et al., 2002). Zumindest im Fall des Membranrezeptors Pael-R geschieht dies durch die U-Box-abhängige Stimulation einer Ubiquitin-Ligase, Parkin (Imai et al., 2002). Es ist eine interessante Beobachtung, daß E4-Enzyme funktionell mit Chaperonen wechselwirken, da die effiziente Multiubiquitinierung schwer abzubauen der Chaperonsubstrate (Aggregate, Komplexe, etc) deren proteasomale Degradation eventuell erst ermöglicht.

CDC48 besitzt demnach zwei elementare Funktionen innerhalb des Ubiquitin/Proteasom-Systems. Es erkennt ubiquitinierte Proteine und kann diese aus stabilen, multimeren Komplexen herauslösen. Anschließend kann es weitere Reaktionen, wie etwa die E4-vermittelte Multiubiquitinierung, kontrollieren. Es ist in gleicher Weise vorstellbar, daß CDC48 die Bindung des aus dem Komplex herausgelösten, ubiquitinierten Proteins an Ubiquitin-Hydrolasen vermittelt. CDC48 ist damit ein zentrales Enzym in der Regulation des Proteinabbaus, das die reversible Modifikation des Substrates mit Ubiquitin als Diskriminierungsmerkmal nutzt.

4. Der OLE-Weg verdeutlicht die Funktion der Ubiquitinierung in der Transkription

Die bisher diskutierten Ergebnisse verdeutlichen, daß im OLE-Weg die Ubiquitinierung eines Proteins keineswegs direkt zu dessen proteasomalem Abbau führen muß. Stattdessen wird im OLE-Weg die Transkription des Gens *OLE1* durch Ubiquitinierung auf vielfältige Art und Weise reguliert (Abb. 3-3).

Zunächst wird SPT23 durch regulierte Ubiquitin/Proteasom-abhängige Prozessierung aktiviert. Die an p90 verbliebene Ubiquitinmodifikation wird von CDC48^{UFD1/NPL4} erkannt. Diese ubiquitin-selektive Segregase löst SPT23 p90 in einer ATP-abhängigen Reaktion von seinem membranständigen Partner p120. Aktives SPT23 p90 wird in den Zellkern transportiert, um dort die Transkription von *OLE1* zu steuern. In dieser Zeit schützt die Assoziation des ubiquitinierten Transkriptionsfaktors mit CDC48 diesen vor Multiubiquitinierung und Degradation. SPT23 wird nach *OLE1*-Transkription mittels zweier unterschiedlicher Mechanismen inaktiviert. Zunächst vermittelt CDC48 die Bindung des Proteins an das E4-Enzym UFD2, welches im Verbund mit RPN10, RSP5 und dem 26S-Proteasom für den ubiquitinabhängigen Abbau des Transkriptionsfaktors im Zellkern verantwortlich ist. Gleichzeitig bildet das Produkt des Regulons, das Protein OLE1, ungesättigte Fettsäuren, die die Prozessierung des Transkriptionsfaktors an der ER-Membran

Interessanterweise supprimieren Mutationen in den Untereinheiten des 19S-Regulatorpartikels *RPT4* und *RPT6* (*sug2-1* und *sug1-20* bzw. *sug1-25*) einen Transkriptionselongationsdefekt in *cdc68-1*-Mutanten (Ferdous et al., 2001). Die 19S-Regulatorkappe bindet zudem an aktiv transkribierte, nicht aber an inaktive Promotoren (Gonzalez et al., 2002). Diese Komplex-reorganisierenden, ubiquitinabhängigen Chaperone werden durch Erkennung der Transkriptionsfaktoren an spezifischen DNA-Sequenzen verankert. Dies kann in der Folge die Affinität des Chaperons gegenüber Histonen, die RAD6-abhängig ubiquitiniert werden, oder gegenüber RNA-Polymerase II, die vor Elongation der Transkription ubiquitiniert wird, erhöhen (Jentsch et al., 1987; Sun et al., 2002; Mitsui und Sharp, 1999). Ubiquitinabhängige Chaperone könnten somit lokal die Chromosomenstruktur reorganisieren oder gebundene RNA-Polymerase II in eine aktive Konformation überführen. Obwohl gezeigt werden konnte, daß Chaperone Transkriptionsfaktorkomplexe disassemblieren können (Freeman und Yamamoto, 2002), ist dieses Modell jedoch spekulativ und bedarf weiterer Analyse.

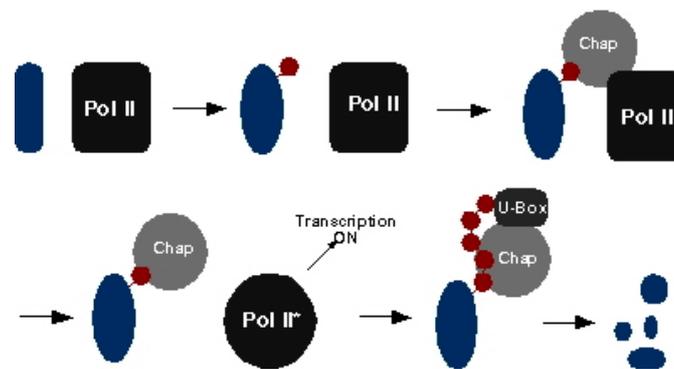


Abb. 3-4: Modell der Lizenzierung eines Transkriptionsfaktors durch Ubiquitinierung. Ubiquitinierung ermöglicht die Erkennung des Transkriptionsfaktors durch ubiquitin-selektive Chaperone. Diese können entweder die Chromatinstruktur reorganisieren oder RNA-Polymerase in eine transkriptionskompetente Konformation überführen. Die Ubiquitinierung dient später als Initiationspunkt einer Multiubiquitinkette, die den Transkriptionsfaktor dem Abbau durch das 26S-Proteasom zuführt.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien und Reagenzien der Firmen Applied Biosystems, Biomol, Biorad, Fluka, Kodak, Merck, Roth, Riedel de Haen, Serva und Sigma verwendet. Molekularbiologische Reagenzien, Restriktionsendonukleasen und die Mehrzahl anderer Enzyme wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Roche, MBI, Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia, und Promega bezogen. Radiochemikalien stammten von den Firmen Amersham und Hartmann Analytic. In nahezu allen der unten beschriebenen Methoden wurden sterile Lösungen und sterile Gefäße eingesetzt.

1.2 Computer-Hardware und Software

Datenbankrecherchen wurden unter anderem mit Hilfe folgender Internetdienste durchgeführt: BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), SwissProt (<http://www.expasy.ch>). Für Sequenzanalysen wurde das Programmpaket DNA-Star (DNA-Star Inc.) verwendet. Röntgenfilme und Gele wurden mit einem AGFA-Scanner (Duoscan T1200) oder mit einer CCD-Kamera und mit dem Programm Adobe Photoshop 5.0.2 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert. Graphiken und Abbildungen wurden mit den Programmen Canvas 6.0 (Deneba Software Inc.) oder Microsoft Powerpoint 98 erstellt. Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft Word98 auf einem Apple Macintosh G3 Computer.

1.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen (IF), Immunoblots (IB) oder Immunpräzipitationen (IP) verwendet. Es waren entweder polyklonale Antikörper aus Hase (rb) oder monoklonale Antikörper aus der Maus (mo). Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: rb anti-myc (Santa Cruz Biotechnology; IB, IP); mo anti-myc, 9E10 (Santa Cruz Biotechnology; IF, IB); mo anti-HA, 12CA5 (Arbeitsgruppe Jentsch; IF, IB, IP); mo anti-VSV (Roche, IB); mo anti-DPM1 (Molecular Probes; IB); mo anti-His (Dianova; IB); rb anti-GST (Oncogene; IB); mo anti-gal (Promega; IF, IB, IP). Sekundäre Antikörper waren entweder mit Peroxidase aus Meerrettich oder mit dem Fluorophor Alexa546 markiert und wurden von Dianova bzw. von Molecular Probes bezogen. Zusätzlich wurde ein polyklonaler, bereits mit Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Protein A (Dako) eingesetzt.

1.4 *Escherichia coli* Stämme

Für die meisten Arbeiten wurden die *E.coli*-Stämme TG1 oder *XL1-Blue* verwendet. Plasmide des Zwei-Hybrid-Ansatzes konnten mit Hilfe des Leucin-auxotrophen *E.coli*-Stammes *BA1* isoliert werden. Expression von Proteinen erfolgte grundsätzlich in *BL21 (DE3) pRIL*-Bakterien.

1.5 *Escherichia coli*-Medien

Den angegebenen Medien wurden Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicillin, 200 µg/ml; Kanamycin, 30 µg/ml; Tetracyclin, 25 µg/ml; Chloramphenicol, 34 µg/ml.

LB-Medium	1% Bacto Tryptone (Difco) 0.5% Bacto Yeast Extract (Difco) 1% NaCl
LB-Agar	1.5% Agar in LB-Medium

1.6 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Alle Arbeiten wurden mit Hefestämmen, die dem Stamm DF5 (Finley et al., 1987) isogen waren, durchgeführt.

Tabelle 4-1: Verwendete Hefestämmen

Stamm	Genotyp	Quelle
WT	<i>MAT</i> α , <i>his3</i> - Δ 200, <i>leu2</i> -3, 2-112, <i>lys2</i> -801, <i>trp1</i> -1 (<i>am</i>), <i>ura3</i> -52	Finley et al., 1987
<i>ufd1</i> -2	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>ufd1</i> -2	Hoppe et al., 2000
<i>npl4</i> -1	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>npl4</i> -1	DeHoratius et al., 1996; Hoppe et al., 2000
<i>cdc48</i> -6	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>cdc48</i> -6	Hoppe et al., 2000
<i>ufd1</i> -2 <i>cdc48</i> -6	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>ufd1</i> -2, <i>cdc48</i> -6	diese Arbeit
<i>ufd1</i> -2 <i>npl4</i> -1	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>ufd1</i> -2, <i>npl4</i> -1	diese Arbeit
<i>npl4</i> -1 <i>cdc48</i> -6	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>npl4</i> -1, <i>cdc48</i> -6	diese Arbeit
PJ69-4A	<i>MAT</i> α , Zwei-Hybrid-Teststamm	James et al., 1996
<i>UFD1</i> ^{ProtA}	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>UFD1::ProtA::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>NPL4</i> ^{3myc}	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>NPL4::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>NPL4</i> ^{3myc} <i>cdc48</i> -6	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>cdc48</i> -6, <i>NPL4::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>NPL4</i> ^{3myc} <i>ufd1</i> -2	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>ufd1</i> -2, <i>NPL4::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD1</i> ^{3myc}	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>UFD1::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD1</i> ^{3myc} <i>cdc48</i> -6	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>cdc48</i> -6, <i>UFD1::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD1</i> ^{3myc} <i>npl4</i> -1	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>npl4</i> -1, <i>UFD1::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>NPL4</i> ^{ProtA}	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>NPL4::ProtA::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>rsp5</i> -2	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>rsp5::HIS3</i> , <i>leu2::LEU2</i> <i>pRSP5-rsp5-2</i>	Matuschewski, 1998
<i>rsp5</i> -2 <i>cdc48</i> -6	<i>MAT</i> α , isogen zu <i>rsp5</i> -2, <i>cdc48</i> -6	Hoppe, 2000
Δ <i>rsp5</i>	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>rsp5::HIS3</i>	Hoppe et al., 2000
<i>PAP1</i> ^{3myc}	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>PAP1::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>PAP1</i> ^{3myc} <i>ufd1</i> -2	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>ufd1</i> -2, <i>PAP1::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>PAP1</i> ^{3myc} <i>npl4</i> -1	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>npl4</i> -1, <i>PAP1::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>PAP1</i> ^{3myc} <i>cdc48</i> -6	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>cdc48</i> -6, <i>PAP1::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
Δ <i>cdc48</i> ^{VSV} <i>CDC48</i>	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>cdc48::HIS</i> , <i>YEplac181::VSV</i> <i>CDC48</i>	Hoppe, 2000
<i>UFD2</i> ^{ΔUBOX3myc}	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>ufd2</i> Δ UBOX::3myc::KanMX	diese Arbeit
<i>ufd2</i> ^{ΔUBOX} <i>ufd1</i> -2	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>ufd1</i> -2, <i>ufd2</i> Δ UBOX::3myc::KanMX	diese Arbeit
Δ <i>ufd2</i> <i>ufd1</i> -2	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>ufd1</i> -2, <i>ufd2::LEU</i>	Hoppe, 2000
<i>ufd2</i> ^{ΔUBOX} <i>cdc48</i> -6	<i>MAT</i> α , isogen zu WT, <i>cdc48</i> -6,	diese Arbeit

	<i>ufd2ΔUBOX::3myc::KanMX</i>	
<i>Δufd2 cdc48-6</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>cdc48-6</i> , <i>ufd2::LEU</i>	Hoppe, 2000
<i>UFD2^{3myc}</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>UFD2::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD2^{3myc} ufd1-2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd1-2</i> , <i>UFD2::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD2^{3myc} npl4-1</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>npl4-1</i> , <i>UFD2::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD2^{ΔUBOX/HA}</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd2DUBOX::3HA::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD1^{3myc} Δufd2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd2::LEU</i> , <i>UFD1::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD1^{3myc} Δufd2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd2::LEU</i> , <i>rpn10::HIS</i> ,	diese Arbeit
<i>Δrpn10</i>	<i>UFD1::3myc::KanMX</i>	
<i>UFD2^{3myc} cdc48-6</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>cdc48-6</i> , <i>UFD2::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD2^{3myc} ufd1-2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd1-2</i> , <i>cdc48-6</i> ,	diese Arbeit
<i>cdc48-6</i>	<i>UFD2::3myc::KanMX</i>	
<i>UFD2^{3myc} Δshp1</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>shp1::HIS3</i> , <i>UFD2::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD2^{ProtA}</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>UFD2::ProtA::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD2^{ProtA} ufd1-2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd1-2</i> , <i>UFD2::ProtA::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>RPN10^{3myc}</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>RPN10::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>RPN10^{3myc} ufd1-2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd1-2</i> , <i>RPN10::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>Δufd2 Δrpn10</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd2::LEU</i> , <i>rpn10::HIS</i>	Koegl et al., 1999
<i>rsp5-1</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>rsp5-1</i>	Matuschewski, 1998
<i>rsp5-1 ufd2^{ΔUBOX}</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>rsp5-1</i> , <i>ufd2ΔUBOX::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>cim3-1</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu CMY763 von Carl Mann	Hoppe, 2000
<i>ufd2^{ΔUBOX} Δrpn10</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>rpn10::HIS3</i> , <i>ufd2ΔUBOX::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>Δufd3 ufd1-2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd1-2</i> , <i>ufd3::HIS3</i>	Schlenker, 1998
<i>Δufd3 cdc48-6</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>cdc48-6</i> , <i>ufd3::HIS3</i>	Schlenker, 1998
<i>UFD3^{3myc}</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>UFD3::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>UFD3^{3myc} ufd1-2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd1-2</i> , <i>UFD3::3myc::KanMX</i>	Diese Arbeit
<i>UFD3^{3myc} Δufd2</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd2::LEU</i> , <i>UFD3::3myc::KanMX</i>	diese Arbeit
<i>Δufd2 Δufd3</i>	<i>MAT α</i> , isogen zu WT, <i>ufd2::LEU</i> , <i>ufd3::HIS</i>	Schlenker, 1998

1.7 *Saccharomyces cerevisiae* Shuttle-Vektoren

Die verwendeten offenen Leseraster wurden, wenn nicht anders angegeben, in folgende Vektoren kloniert: pGAD-C1, pGBD-C1 (James et al., 1996), YEplac181, YEplac195, Ylplac204, Ylplac211, YCplac33 (Gietz und Sugino, 1988), pGEX-4T1, pQE30 (Qiagen).

1.8 *Saccharomyces cerevisiae*-Genbanken

Der Zwei-Hybrid Screen zum Finden der SPT23-Interaktoren wurde mit einer Genbank, die der in James et al., 1996 veröffentlichten entsprach, durchgeführt.

1.9 *Saccharomyces cerevisiae*-Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Flüssigkulturen bei Raumtemperatur bei 120 rpm geschüttelt. Agarplatten wurden ebenso bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Zelldichte erfolgte bei

einer Wellenlänge von 600 nm (Eppendorf Messmaschine). Eine OD_{600} von 1 entspricht etwa 3×10^7 Zellen/ml.

YPD/YPGal-Medium	1% Bacto Yeast Extract (Difco) 2% Bacto Peptone (Difco) 2% Glukose (YPD) oder 2% Galaktose (YPGal)
SC-Medium	3.5% Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids 20 g Zucker (Glukose, Galaktose oder Raffinose) 2 g Aminosäure-Mix ohne Selektionsaminoaciden pro 1 l Wasser
Sporulationsmedium	1 % Kaliumacetat in H_2O sowie 25 % der jeweiligen Standardkonzentration an auxotrophen Aminosäuren
YPD-G418	200 mg G418 (Sigma: G-9516) pro l Medium

2. Methoden mit *Escherichia coli*

2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch Anionenaustauscherchromatographie

DNA ist ein negativ geladenes Molekül, welches sich durch Anionenaustauscherchromatographie reinigen läßt. Dies erfolgte je nach Maßstab mit dem QiaGen MiniPrep Kit oder QiaGen MidiPrep Kit nach Angaben des Herstellers. Im Regelfall wurden 2 ml einer dichten Übernachtskultur eingesetzt.

2.1.2 Vereinfachte Isolierung der Plasmid-DNA durch Hitzelyse

Die Analyse einer großen Menge unterschiedlicher Plasmide im Zuge des Zwei-Hybrid-Screens erforderte eine schnelle und kostengünstige Methode der Plasmidisolierung. 1.5 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und in 50 µl Lysepuffer (10 mM Tris/HCl, pH8.0, 1 mM EDTA, 15 % Saccharose, 2 mg/ml Lysozym, 0.2 mg/ml RNaseA, 0.1 mg/ml BSA) resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 1 min bei 100°C gekocht und sofort danach im Eisbad gekühlt. Der Überstand einer 20-minütigen Zentrifugation bei 14 000 rpm, 4°C, konnte für Restriktionsanalysen verwendet werden.

2.1.3 Reinigung von Plasmid-DNA durch Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung

Die das Plasmid enthaltende Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isopropanol (25:24:1; v/v) versetzt und eine Minute auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Die Emulsion wurde in der Tischzentrifuge bei 14.000 rpm, 1 min, r/t, zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wurde abgenommen und mit dem dreifachen Volumen eiskaltem 95 %igen Ethanol versetzt. Die DNA wurde für 30 min bei -80 °C gefällt und anschließend bei 14.000 rpm, 4°C, für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen ddH₂O resuspendiert.

2.2 Übertragung von Plasmid-DNA

2.2.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E.coli*-Bakterien

Die Transformation gereinigter Plasmid-DNA in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pRIL sowie in den Bakterienstamm TG1 erfolgte in CaCl₂-kompetente Zellen mittels Hitzeschock (Cohen et al., 1972). 400 ml LB-Medium wurden mit 4 ml einer Übernachtskultur versetzt und bei 37°C geschüttelt.

Bei einer OD_{600} von 0.4 wurden die Zellen in gekühlte Zentrifugationsbecher überführt und 60 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden bei 3000 rpm, 4°C, für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 80 ml eiskalter $CaCl_2$ -Lösung (60 mM $CaCl_2$, 15% Glycerin, 10 mM PIPES, pH 7.0) resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert in 10 ml $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und erneut 60 min auf Eis inkubiert. Am Ende wurde die Bakterien in 2 ml $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert nach kurzer Inkubation auf Eis aliquotiert und bei $-80^\circ C$ gelagert.

2.2.2 DNA-Übertragung in $CaCl_2$ -kompetente *E. coli*-Zellen

Plasmide wurden in $CaCl_2$ -kompetente Bakterienzellen mittels Hitzeschock übertragen. Dazu wurden 50 μ l Bakteriensuspension und 1 μ l Plasmid-DNA zusammengegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzepuls von 60-90 sec bei 42 °C wurde 700 μ l LB-Medium zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde 120 min bei 37°C geschüttelt, kurz abzentrifugiert und nach Resuspension in 300 μ l LB-Medium auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Plasmid-DNA wurde in der Regel nach Transformation in elektrokompetente *E. coli XL1-Blue*-Zellen gereinigt. Zur Herstellung der elektrokompetenten Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 3 ml einer Übernachtskultur versetzt und bis zu einer OD_{600} von 0.6 bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden nach 60 minütiger Inkubation auf Eis bei 5000 rpm, 4°C für 10 min abzentrifugiert und in 500 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 60 min wurde die Bakterien abzentrifugiert und in 250 ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen. Die Bakterien wurden erneut auf Eis inkubiert, zentrifugiert und in 1.5 ml 10% Glycerin resuspendiert. Nach Aliquotieren wurden die kompetenten Zellen bei $-80^\circ C$ gelagert.

2.2.4 DNA-Übertragung durch Elektroporation

Die Plasmid-DNA wurde, wenn nötig nach Mikrodialyse gegen ddH_2O auf Millipore-Filtern, zu 50 μ l kompetenten Bakterien gegeben und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite transferiert. Die Elektroporation erfolgte durch einen Puls von 1.8 kV/ 25 μ F/ 200 im Biorad Gene Pulser II. Die Dauer des Pulses betrug in der Regel 4-5 msec. Die Zellen wurden anschließend mit 700 μ l LB-Medium versetzt, 120 min bei 37°C geschüttelt und zuletzt auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

3. Methoden mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.1 Transformation von Hefezellen

3.1.1 Transformation von Hefezellen nach der Lithiumacetatmethode

1 ml einer Übernachtskultur im Selektionsmedium wurde zu 20 ml frischen Mediums gegeben und 4 hrs bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Transformation wurden 2 ml Aliquots dieser Kultur verwendet und bei 3000 rpm, 23 °C, für 3 min abzentrifugiert. Das Hefepellet wurde in 1 ml TE/LiOAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Zum Pellet wurden 5 μ l einzelstängige DNA (denaturierte Lachsspermien-DNA), 1-5 μ l der zu transformierenden DNA und 300 μ l TE/PEG (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, 40 % PEG3350) gegeben. Die Suspension wurde 30 min auf dem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Hitzepuls (42°C, 15 min) wurde die Suspension bei 3500 rpm, 3 min, 23 °C, zentrifugiert, in ddH_2O resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplat-

tiert. Bei Kanamycin-Resistenz wurden die Hefezellen in 3 ml YPD-Medium resuspendiert, über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und nach Zentrifugation auf YPD-G418-Platten ausplattiert.

3.1.2 Herstellung kompetenter Hefezellen

Eine Übernachtkultur im entsprechenden Selektionsmedium wurde im Verhältnis 1:20 verdünnt und bei Raumtemperatur bis zu einer OD_{600} von 0.7 geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 rpm, 23 °C, 5 min) und im 0.5-fachen Volumen an sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Hefepellet im 0.1-fachen Volumen SORB (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, 1 M Sorbitol) aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde das überstehende SORB komplett abgenommen. Die Zellen wurden in 360 μ l SORB bei 50 ml ursprünglichen Kulturvolumens resuspendiert. Nach Zugabe von 40 μ l denaturierter Einzelstrang-DNA wurde die Suspension á 50 μ l aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Transformation kompetenter Hefezellen

Für eine Transformation mit gereinigter Plasmid-DNA wurden 10 μ l, für die Transformation mit PCR-Produkt 50 μ l kompetenter Hefezellen eingesetzt. Die DNA wurde zu den Zellen gegeben und mit dem 6-fachen Volumen TE/PEG versetzt (s. 1.3.1.1). Die Zellen wurden 30 min am Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1/9-Volumen an DMSO zugegeben. Nach einem Hitzepuls (15 min, 42°C) wurden die Hefen zentrifugiert, in ddH_2O resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Bei Verwendung des Kanamycin-Markers wurde wie in 1.3.1.1 beschrieben vorgegangen.

3.1.4 Integrative Transformation über homologe Rekombination

Integrative Plasmide (YIp) enthalten nur einen Selektionsmarker, aber keine autonomen Replikationselemente. Sie können nur nach Integration in das Hefegenom über homologe Rekombination stabil vererbt werden. Das integrative Plasmid wurde zunächst durch eine spezifische Restriktionsendonuklease im Markergen linearisiert und wie bereits beschrieben zur Transformation eingesetzt.

3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Hefezellen wurden in 50 μ l Lysepuffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) resuspendiert. Zu der Suspension wurden 50 μ l Phenol/Cholorphorm/Isoamylalkohol (25/24/1) sowie Glasperlen gegeben. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur etwa 2 min auf dem Vortex-Schüttler geschüttelt und anschließend in der Tischzentrifuge zentrifugiert (14 000 rpm, 1min, 23°C). Der wäßrige Überstand wurde abgenommen und auf Millipore-Filterplättchen gegen ddH_2O für 15 min dialysiert. 1 μ l des Überstands wurde anschließend zur Transformation elektrokompetenter *E. coli XL1Blue*-Zellen eingesetzt.

3.3 Herstellung eines Proteinextraktes

3.3.1 Herstellung eines Proteinextraktes unter nativen Bedingungen

Eine Hefesuspension (maximale OD_{600} von 2) wurde bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3500 rpm, 2 min) und in 200 μ l eiskaltem Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM PMSF) aufgenommen. Zu der Mischung wurden bis ca 2 mm unter den Meniskus Glasperlen (Glass beads, acid-washed, R 425-600 μ m, Sigma) zugegeben. Dies wurde daraufhin je 30 sec auf dem Vortex-Schüttler geschüttelt und 30 sec auf Eis abgekühlt. Der Vorgang wurde drei- bis viermal wiederholt, bevor die Zelldebris durch eine 5-minütige Zentrifugation (770g, 4°C) entfernt wurde. Der Überstand wurde entweder mit Probenpuffer versetzt oder für weitere Experimente eingesetzt.

3.3.2 Herstellung eines Proteinextraktes unter denaturierenden Bedingungen

Eine Hefesuspension (maximale OD₆₀₀ von 1) wurde bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3500 rpm, 2 min) und in 1 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl NaOH/bMeOH (1.85 M NaOH, 140 mM β-Mercaptoethanol) wurde die Suspension für 5 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden anschließend mit 150 µl 55 %-iger Trichloressigsäure für 10 min auf Eis gefällt und abzentrifugiert (14 000 rpm, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl HU-Puffer (8 M Harnstoff, 5 % SDS, 100 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA, Bromphenolblau, pH 6.8) resuspendiert, 15 min bei 65°C geschüttelt und in der SDS-Gelelektrophorese analysiert.

3.4 Analyse von Hefemutanten

3.4.1 Kreuzung von Hefestämmen

Zwei Hefestämmen unterschiedlichen Paarungstyps (alpha und a) wurden in YPD-Medium bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt. Aliquots mit etwa der gleichen Zellmenge wurden gemischt und 10 µl davon auf eine YPD-Agarplatte getüpfelt. Nach 6 hrs Inkubation konnten fusionierte Hefezellen aufgrund ihrer typischen Morphologie identifiziert und isoliert werden.

3.4.2 Serielle Verdünnungsreihen

Für die Analyse von Hefemutanten wurden serielle Verdünnungen von Hefekulturen auf Platten des entsprechenden Selektionsmediums getüpfelt. Übernachtskulturen des Hefestammes im entsprechenden Wachstumsmedium wurden mit ddH₂O auf eine OD₆₀₀ von 1 verdünnt und sechs weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:10 pipettiert. Je 5 µl jeder Verdünnung wurden nebeneinander auf Platten getüpfelt und unter den gewünschten Bedingungen inkubiert.

3.4.3 Tetradenanalyse

5 ml einer diploiden Hefekultur der OD₆₀₀ von 0.7 wurden für 5 min bei 3500 rpm, Raumtemperatur, abzentrifugiert. Das Hefepellet wurde in 5 ml ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in Sporulationsmedium aufgenommen und 24 hrs bei Raumtemperatur geschüttelt. 100 µl dieser Kultur wurden mit 100 µl Zymolyase-Lösung (Seikaguko, 0.5 mg/ml in SP-Puffer) vorsichtig gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 20 µl der Zellsuspension wurden strichförmig auf einer YPD-Platte ausgezogen. Die Trennung der Tetraden und das Isolieren der Sporen erfolgte mit einem Mikromanipulator (Singer MSM Systems). Zur Germination der Sporen und Wachstum der Kolonien wurden die Platten mehrere Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

3.5 Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem Zwei-Hybrid-System

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

Die genetische Information eines der zu untersuchenden Gene wurde im Leseraster hinter die aktivierende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors (*pGAD-C*-Vektor) kloniert (James et al., 1996). Die Information des anderen Proteins wurde entsprechend hinter die DNA-bindende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors kloniert. Der Hefestamm *PJ69-4a* wurde mit beiden Vektoren sowie mit den jeweiligen Leervektoren als Kontrolle transformiert. Transformierte Hefezellen wurden auf Sc-Leu-Trp-Platten bei 30°C angezogen und anschließend auf Sc-Leu-Trp-His-Platten, die mit verschiedenen Konzentrationen 3-Aminotriazol supplementiert waren, analysiert.

3.5.2 Suche nach SPT23-Interaktionspartnern im Zwei-Hybrid-Screen

Ein SPT23-Konstrukt, dessen N-terminale aktivierende Domäne sowie dessen C-terminale Transmembranhelix und ER-lumenale Domäne deletiert waren (SPT23^{DTADDTM}) wurde im Leseraster hinter die DNA-bindende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors kloniert. Der Hefestamm *PJ69-4a* wurde mit diesem Konstrukt transformiert. Nach Inkubation bei 30°C für 3 d wurde der Hefestamm mit DNA einer Genbank (James et al., 1996) nach Methode 4.3.1.2 transformiert. Pro Leseraster wurde je eine Genbank verwendet. Die Transformationseffizienz wurde so gewählt, daß in 20 Transformationsansätzen 2×10^6 Klone erhalten wurden. Die Selektion erfolgte sequentiell auf Sc-Leu-Trp-His-, Sc-Leu-Trp-His+20 mM 3-Aminotriazol- und Sc-Leu-Trp-Ade-Platten. Zusätzlich wurden putative Interaktionen im β Galaktosidase-Test überprüft. Plasmide positiver Kolonien wurden isoliert und sequenziert.

1.0.0 Analyse einer Interaktion im β Galaktosidase-Test

Für die Analyse von zehn kleinen Platten wurden 50 ml 0.5 M Natriumphosphat, pH 7, 1 ml 10 % SDS, 1 ml 1M KCl und 100 μ l 1 M $MgCl_2$ in der angegebenen Reihenfolge langsam zusammengegeben und auf etwa 40 °C erwärmt. 400 mg Agarose (low-melting point agarose) wurden mit 30 ml ddH₂O gemischt und zum Lösen der Agarose kurz erhitzt. Die beiden Lösungen wurden zusammengegeben. Nach Zugabe von 200 μ l -Mercaptoethanol und Anpassung des Volumen auf 100 ml mit ddH₂O, wurde 40 mg/ml XGal in DMF zugemischt. Die Lösung wurde vorsichtig auf die Platten aufgetragen, sodaß die Hefekulturen vollständig bedeckt waren. Die Platten wurden anschließend bei 30 °C inkubiert und alle 2 hrs analysiert.

3.6 Analyse der Proteinwechselwirkung durch Immunpräzipitation

Die Wechselwirkung von Proteinen wurde *in vivo* meist durch Koimmunpräzipitationen untersucht. Hefekulturen wurde über Nacht bei Raumtemperatur in selektivem Medium zur frühen stationären Phase angezogen. Die Hefekulturen wurden in selektivem Medium zu einem Volumen von 100 ml zehnfach verdünnt und unter den gewünschten Bedingungen inkubiert. Thermosensitive Stämme wurden zunächst vier Stunden bei Raumtemperatur und anschließend für zwei Stunden bei der restriktiven Temperatur geschüttelt. Die Hefezellen wurden bei 3500 rpm, 23°C, für 3 min abzentrifugiert und in 200 μ l Lysepuffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM PMSF) oder Lysepuffer B A (50 mM Tris/HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 2.5 mM $MgCl_2$; 5 mM PMSF) aufgenommen. Nach Zugabe von Glycerperlen wurden die Hefezellen durch starkes Schütteln am Vortex-Schüttler (4 x 30 sec, dazwischen 30 sec auf Eis) lysiert. Die Zellbruchstücke wurden bei 770 g, 4°C, 5 min abgetrennt. Unter Umständen wurde das Lysat durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt bei 20.000g, 4°C, 30 min, geklärt. Die Überstände der Reaktionen wurden mit Lysepuffer auf 800 μ l verdünnt und auf 0.05-0.1 % Tween 20 gebracht. Bei Immunfällungen von Membranproteinen wurde das Pellet der letzten Zentrifugation für 90 min in Solubilisierungspuffer (Lysepuffer A + 0.4 % N-Dodecylmaltosid) auf Eis inkubiert und dann mit Puffer auf 800 μ l verdünnt. Es wurden 2 μ g Antikörper zugegeben und die Lösung für 60-120 min auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper/Antigen-Komplexe durch Zugabe von Protein G-Agarose gefällt. Die Reaktionen wurden gewaschen, in HU-Puffer denaturiert und in Gelelektrophorese und Immunoblot analysiert.

3.7 Analyse der Proteinlokalisierung

3.7.1 Indirekte Dekonvolutionsimmunfluoreszenz

Die Hefezellen wurden in steril filtriertem, nicht autoklaviertem Selektionsmedium bis zu einer OD_{600} von 1 inkubiert. Zur Fixierung der Proteine wurden 1/9 vol Kaliumphosphatlösung, pH 6.5, und 1/9 vol 37 % Formaldehyd (Sigma) zugegeben und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig mit SP-Puffer (0.1 M Kaliumphosphat, pH 6.5, 1.2 M Sorbitol) gewaschen (3 x bei 2000 rpm, 4°C, 5 min) und in 900 µl SP -Puffer (10 ml SP-Puffer mit 14 µl -Mercaptoethanol) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Zymolyase 100T (2.5 mg/ml in SPb) wurde die Suspension für 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit SP-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl PBSB-Puffer (PBS + 1 mg/ml BSA) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf Polylysinschichtete Objektträger gegeben und mit primärem, monoklonalem Antikörper der geeigneten Verdünnung über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden auf dem Objektträger vorsichtig gewaschen (5 x mit PBS-Puffer) und anschließend mit Farbstoff-markiertem sekundären Antikörper (1:250 in PBS-Puffer) für 2 hrs im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBST (PBS-Puffer mit 1 % Triton X-100) und PBSB-Puffer (6x) wurde 5 µl DAPI (2.5 µg/ml DAPI in 50 % Glycerin) zugegeben. Die Proben wurden mit Nagellack versiegelt und im Dekonvolutionsmikroskop analysiert.

3.1.2 Analyse der Membranassoziation eines Proteins

Eine Hefekultur wurde im selektiven Medium bei der gewünschten Temperatur zu einer OD_{600} von 1 angezogen. Die Hefezellen wurden nach Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C, 5 min in 150 µl Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM PMSF) aufgenommen und mit Glasperlen lysiert. Das Lysat wurde bei 770 g, 4°C, 5 min zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurden entnommen, HU-Puffer versetzt und bei 65°C denaturiert (Totalextrakt). 75 µl des Überstandes wurden bei 20000 g, 4°C, 5 min zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes (lösliche Fraktion) sowie das Pellet (Membranfraktion) wurden erneut in HU-Puffer denaturiert. Sollte untersucht werden, ob ein Protein peripher mit der Membran assoziiert ist, wurde das Pellet in Lysepuffer aufgenommen und in mehrere Proben aufgeteilt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Einzelpellets entweder in Lysepuffer, in 1 M Natriumcarbonat, pH 11.3, in Lysepuffer mit steigender Natriumchloridkonzentration, oder in 0.1 % SDS-Lösung für 30-90 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden durch Zentrifugation in lösliche und Membran-assoziierte Fraktion aufgetrennt und in HU-Puffer denaturiert. Die denaturierten Proteinproben wurden anschließend durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und im Immunoblot untersucht.

3.1.3 Analyse der ER-Lokalisation im Sukrosegradienten#

200 ml Selektionsmedium wurden mit einer Übernachtskultur angeimpft, bei der gewünschten Temperatur bis zu einer OD_{600} von 1 inkubiert und durch Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C, 5 min, geerntet. Das Zellpellet wurde in ddH₂O aufgenommen und unter identischen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde gewogen und in 1 ml/0.15 g Zymolase-Puffer (100 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM DTT) aufgenommen. Die Suspension wurde bei 30 °C vorsichtig für 10 min geschüttelt und anschließend unter den beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml/0.15 g SPb-Puffer (vgl. 1.3.6.1) aufgenommen, mit 40 µl einer 10 mg/ml Zymolyase 100T-Lösung versetzt und 60-90 min bei 30°C unter langsamen Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden danach bei 3000 rpm, 4°C, 10 min zentrifugiert, zweimal mit SP/PMSF-Puffer (SP-Puffer, 2 mM PMSF) gewaschen und schließlich in 1 ml/0.25 g Sphero-Lysepuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 mg/ml BSA, 0.6 M Sorbitol, 2 mM PMSF) resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Wheaton Zellhomogenisator durch 15 Schläge unter Eiskühlung aufgebrochen. Die Zellbruchstücke wurden durch zweimalige

Zentrifugation bei 2000 rpm, 4°C, 5 min, abgetrennt. 1 ml des Überstandes wurde auf einen schrittweisen Sukrosegradienten (18-54% Sukrose in 10 mM HEPES, pH 7.5) aufgetragen und 3 hrs bei 32 000 rpm zentrifugiert. Der Gradient wurde anschließend fraktioniert und die einzelnen Fraktionen durch Inkubation mit HU-Puffer bei 65 °C denaturiert und im entsprechenden Immunoblot analysiert.

3.1.4 Analytische Gelfiltration

Um die Inkorporation eines Proteins in größere Komplexe zu untersuchen, wurde Hefezellsat durch analytische Gelfiltration aufgetrennt. Hefezellen wurden zu einer OD₆₀₀ von 1 im entsprechenden Selektionsmedium angezogen und durch kurze Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C, 5 min pelletiert. Die Hefezellen wurden in Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4 mM PMSF) aufgenommen, mit Glasperlen versetzt und durch starkes Schütteln auf dem Vortex-Schüttler lysiert. Die Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation bei 770 g, 4°C, 5 min, entfernt. Das Lysat wurde anschließend durch Zentrifugation bei 100 000 g, 4°C, 30 min in der Tischultrazentrifuge (Beckmann) geklärt und auf eine Superose6-Säule aufgetragen. Fraktionen der Gelfiltration wurden gesammelt, die Proteine durch Zugabe von Trichloressigsäure gefällt und nach Inkubation in HU-Puffer im entsprechenden Immunoblot analysiert.

3.8 Analyse der Modifikation eines Proteins mit Ubiquitin

Zur Analyse der Ubiquitinierung eines Proteins wurde die in Höge et al., 2002, beschriebene denaturierende Reinigung verwendet. His-markiertes Ubiquitin wurde unter Kontrolle des *CUP1*-Promotors in den gewünschten Hefezellen durch Zugabe von 0.1 mM CuSO₄ zum Wachstumsmedium exprimiert. Hefezellen, die einer OD₆₀₀ von 40 entsprachen, wurden abzentrifugiert, in 1 ml 1.85 M NaOH, 150 mM β -Mercaptoethanol resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 1 ml 55 % TCA-Lösung und anschließende Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C, 30 min, gefällt. Die Präzipitate wurden in Puffer A (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0.1 M Natriumphosphat, 0.01 M Tris/HCl, pH 8) aufgenommen und eine Stunde bei Raumtemperatur unter starkem Schütteln gelöst. Verbliebene Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C, für 30 min abgetrennt. Der Überstand wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit magnetischen NiNTA-Perlen inkubiert. Die Perlen wurden viermal mit Puffer A und zweimal mit Puffer C (8 M Harnstoff, 0.1 M Natriumphosphat, 0.01 M Tris/HCl, pH 6.3) gewaschen. Anschließend wurden die an die Perlen gebundenen Proteine durch Inkubation in HU-Puffer denaturiert und nach Gelelektrophorese im entsprechenden Immunoblot analysiert.

3.9 Analyse der Proteinstabilität

3.9.1 Analyse der Proteinstabilität im Promoter-Shutoff-Experiment

Die Stabilität eines Proteins in *S. cerevisiae* kann nach reguliertem Abschalten seiner Expression untersucht werden. Hierfür wurde das entsprechende Gen unter die Kontrolle des galaktoseinduzierbaren und glukosreprimierbaren *GAL1,10*-Promotors gebracht. Hefekulturen wurden in YPGal-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1 bei Raumtemperatur angezogen und anschließend für zwei Stunden auf die gewünschte Temperatur (meist 37°C) gebracht. Die Zellen wurden bei 3500 rpm, 23 °C für 3 min abzentrifugiert und schnell in vorgewärmtem YPD-Medium, dem 0.5 mg/ml Cycloheximid zugesetzt worden waren, resuspendiert. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 2 ml der Hefesuspension entnommen und die Proteine durch Zugabe von TCA gefällt. Anschließend wurden die Proben bei 14.000 rpm, 4°C für 15 min abzentrifugiert, in 50 μ l HU-Puffer für 15 min bei 65°C gelöst und nach denaturierender Gelelektrophorese im entsprechenden Immunoblot analysiert.

3.9.2 Analyse der Proteininstabilität im Pulse-Chase-Experiment

Die Hefezellen wurden unter den gewünschten Bedingungen inkubiert. Eine Zellmenge, die einer OD_{600} von 10 entsprach, wurde abzentrifugiert, in 1 ml Sc-Cys-Met-Medium (entweder mit Glukose oder Galaktose supplementiert) resuspendiert und 30 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Zur radioaktiven Markierung der Proteine (*pulse*) wurden 10 μ l ^{35}S -Methionin (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; Amersham) zugegeben und die Hefekultur für die zur effektiven Markierung benötigte Zeit (zwischen 5 und 30 min) geschüttelt. Anschließend wurde 2 ml *chase*-Medium (4.4 ml YPD oder YPGal, 210 μ l 20 mg/ml Methionin, 42 μ l 50 mg/ml Cycloheximid) zugegeben. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde 1 ml der Suspension abgenommen. Die Hefezellen wurden in der Tischzentrifuge bei 14.000 rpm, r/t für 5 sec abzentrifugiert in 150 μ l Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM PMSF; 0.2 M NEM) resuspendiert, mit Glasperlen vermischt und auf dem Vortex-Schüttler lysiert. Es wurde 1 ml des Lysepuffers zugegeben und die Proteine über Nacht bei 4°C mit den entsprechenden Antikörpern und Protein G-Agarose gefällt. Die Immunpräzipitationen wurden gewaschen und durch Inkubation in HU-Puffer bei 65°C für 15 min denaturiert. Die Proben wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und in der Autoradiographie analysiert.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Gelelektrophoretische Methoden

4.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Elektrophorese in Agarose-Gelen wurde zur präparativen Reinigung sowie zur analytischen Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. Zur Analyse von Fragmenten von bis zu 500 bp Länge wurde eine Agarosekonzentration von 1.6 % (w/v) in 0.5 x TAE-Puffer (50 x TAE: 242 g Tris, 57.1 ml Eisessig, 100 ml 0.5 M EDTA auf 1 l ddH_2O aufgefüllt) verwendet. Längere Fragmente wurden mit Agarosekonzentrationen von 0.8 % (w/v) in 1 x TBE-Puffer (5 x TBE: 54 g Tris, 27.5 g Borsäure, 20 ml 10 mM EDTA, pH 8.35) untersucht. Zu 100 ml der geschmolzenen Agaroselösung wurden vor Gießen des Gels 5 μ l 10 mg/ml Ethidiumbromid gegeben. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 20 % (v/v) Probenpuffer (6 ml ddH_2O , 250 μ l 10 % SDS, 2.5 ml Glycerin, 500 μ l 0.5 M EDTA, Orange G) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 8 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Die Analyse der Gele erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm. Als Größenstandard wurden BstEII fragmentierte Lambda-DNA (New England Biolabs), HaeIII fragmentierte PX174-DNA (New England Biolabs) oder die „1kb-Leiter“ (Gibco-BRL) verwendet.

4.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in vertikalen Kammern. In einer Gelgießkammer wurden jeweils fünf Gele gegossen, die je nach Auflösungsanforderung zwischen 6 und 10 % Polyacrylamid enthielten. Zunächst wurden die Trenngele (5 10%ige Gele: 9.1 ml Protogel, 13.8 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8, 275 μ l 10 % SDS, 4.1 ml ddH_2O , 275 μ l 10 % Ammoniumpersulfatlösung, 5.5 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) gegossen und vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach gründlichem Spülen wurden die Sammelgele (5 Gele: 1.5 ml Protogel, 1.5 ml 1 M Tris/HCl, pH 6.8, 120 μ l 10 % SDS, 8.7 ml ddH_2O , 120 μ l 10 % Ammoniumpersulfatlösung, 12 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) gegossen und die Kämme eingesetzt.

Die Elektrophorese wurde in einer Hoefer-Vertikalelektrophoresekammer durchgeführt. Anodenpuffer (0.2 M Tris/HCl, pH 8.9) und Kathodenpuffer (0.1 M Tris/HCl, 0.1 M Tricin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.25) waren unterschiedlich.

4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.2.1 PCR zur Amplifikation von Gensequenzen

Standard-PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl mit etwa 100 ng Plasmid-DNA bzw. 0.5 µg genomischer DNA in ThermoPol-Puffer (NEB) durchgeführt. Es wurden je 0.5 mM deoxy-Nukleotide, 0.5 µM der entsprechenden Oligonukleotide (*primer*) und 1-5 U Vent-Polymerase eingesetzt. Die PCR-Reaktion fand in einem „Mastercycler“-Gerät (Eppendorf) statt. Standard-PCR-Reaktionen wurden 2 min bei 94 °C denaturiert, anschließend wurden 25-30 Zyklen (94°C, 30sec; 45-55°C, 30sec; 72°C, 1-5min) durchlaufen. Die Reaktionen wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4.2.2 Diskontinuierliche PCR-Reaktion (long range)

Zur Amplifikation schwieriger DNA-Sequenzen und zur Amplifikation der Epitop-Kassetten der chromosomalen Epitop-Markierung wurde ein diskontinuierliches PCR-Protokoll verwendet. Nukleotide, Plasmid-DNA und Oligonukleotide wurden wie unter 1.4.2.1 beschrieben zusammengegeben und mit einfach-konzentriertem Puffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 9.2; 16 mM (NH₄)₂SO₄, 17.5 mM MgCl₂) versetzt. Die Endkonzentration von MgCl₂ wurde bis 4 mM durch Zugabe von 50 mM MgCl₂ variiert. Die Reaktion wurde durch 0.8 µl Polymerase-Mix (2 µl Taq-Polymerase, 5 U/µl; 1 µl Vent-Polymerase, 2 U/µl) während einer zweiminütigen Denaturierungsphase (94°C) gestartet. Zunächst wurden 9 Zyklen bei niedrigerer Schmelztemperatur (94°C, 20sec; 45-50°C, 30sec; 68°C, 2-5min), anschließend 20 Zyklen unter stringenteren Bedingungen (94°C, 30sec; 50-60°C, 30sec; 3min, 68°C) durchlaufen. Die Verlängerungszeit nahm in den letzten 20 Zyklen pro Zyklus um 20 sec zu. Die Produkte wurden erneut in Agarosegelelektrophorese analysiert.

4.2.3 Mutagenese-PCR zur Einführung von Punktmutationen und Deletionen

Mutationen und Deletionen wurden durch Einzelstrang-PCR eingeführt und die zwei Produkte zu einem komplementären, mutanten Plasmid verschmolzen. Es wurden zwei Reaktionen mit je 200 ng Plasmid-DNA, 1 µM eines Oligonukleotids, 2 mM MgCl₂ und 0.2 mM dNTP-Mix in einfach-konzentriertem Pfu-Puffer (Gibco) auf Eis gemischt und während einer zweiminütigen Denaturierungsphase (94°C) mit 5 U Pfu-Polymerase pro Reaktion gestartet. Es wurden 20 Zyklen (94°C, 30sec; 45-55°C, 30sec; 72°C, 4.5min/kb Plasmid) durchlaufen. Die beiden Reaktionen wurden vereint und 90 min mit 20 U DpnI bei 37°C inkubiert. Die Reaktionen wurden in einer PCR-Maschine auf 94°C (2sec) aufgeheizt und langsam innerhalb einer Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Mikrodialyse gegen dH₂O wurde 2 µl des Ansatzes für eine Transformation elektrokompeter *E. coli* XL-1 Blue-Zellen verwendet.

4.2.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

0.5 µg Plasmid-DNA wurde mit 4 µl DYEnamic ET terminator cycle sequencing premix (Amersham) und 5 pmol des Oligonukleotids in einem Volumen von 10 µl versetzt. Es wurden 25 Zyklen (95°C, 20sec; 45°C, 15sec; 60°C, 1min) durchlaufen. Die Proben wurden durch Ethanol gefällt, in einem Gelladepuffer aufgenommen und in einem Abi Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer) analysiert.

4.3 Klonierung

4.3.1 Restriktionsverdau

Verdaureaktionen mit Restriktionsendonukleasen wurden unter dem vom Vertreiber empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Für Verdaureaktionen im präparativen Maßstab wurden zwischen 5 und 20 µg DNA eingesetzt. Bei Restriktionsanalysen wurden zwischen 0.2 und 0.6 µg Plasmid-DNA verdaut. Präparative Verdaureaktionen wurden durch Vermischen mit einem gleichen Volumen Phenol/Choloform/Isopropanol (25:24:1, v/v) abgestoppt und durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Vektor-DNA wurde, um die Religation zu verhindern, mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIP, NEB) dephosphoryliert.

4.3.2 Ligation

In der Ligation wurde das Insert in zweifachem molaren Überschuß eingesetzt. Ligationsreaktionen fanden in einfach konzentriertem Ligasepuffer, 0.5 mM ATP, 4 U T4-Ligase statt und wurden bei 16°C für 2 Stunden inkubiert. Die Produkte wurden gegen ddH₂O mikrodialysiert. 2 µl des Ansatzes wurden zur Transformation elektrokompetenter *E. coli* XL1 Blue-Zellen verwendet.

5. Proteinbiochemische Methoden

5.1 Nachweis von Proteinen

5.1.1 Nachweis von Proteinen im Immunoblot

Die zu analysierenden Proteinproben wurden durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und im Tank in einfach konzentriertem Transferpuffer (20 mM Tris, 144 mM Glycin, 0.01 % SDS, 20 % Methanol) auf Nitrocellulosemembran transferiert. Der Transfer fand bei einer konstanten Spannung von 70 V bei Raumtemperatur für 60 bis 90 min statt. Die Membran wurde zunächst für 30 min in TBST + 5% Milch inkubiert. Die Bindung des ersten Antikörpers erfolgte in frischem TBST/Milch über Nacht bei 4°C. Nach Waschen der Membran in TBST wurde in TBST/Milch mit dem zweiten Antikörper für 45 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Membran wurde erneut gewaschen und nach Inkubation mit ECL-Lösung (Amersham) aufgrund der Chemilumineszenz auf ECL-Hyperfilm nach Angaben des Herstellers analysiert.

5.1.2 Nachweis von Proteinen in der Autoradiographie

Entsprechende Gele wurde für 30 min in Fixierlösung (10 % Essigsäure, 25 % Isopropanol) und für 30 min in Szintillationsflüssigkeit (Amplify, Amersham) geschüttelt. Die Gele wurde für 3 Stunden bei 80 °C im Vakuum getrocknet und zum Exponieren eines Röntgenfilms (-80°C, 3-7d; Kodak) verwendet. Alternativ wurde die getrockneten Gele über Nacht in einem FujiFilm BAS-2500 exponiert.

5.2 Reinigung von Proteinen

5.2.1 Native Reinigung von Fusionsproteinen aus Bakterien

Für die Reinigung von Proteinen aus Bakterien wurde grundsätzlich der Stamm *E. coli* BL21 (*pRIL*) verwendet. Übernacht-Kulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0.05 verdünnt. Bei einer OD₆₀₀ von 0.7 wurde 0.1-1 mM IPTG zugegeben und die Bakteriensuspension weitere drei Stunden bei 37°C geschüttelt. Alternativ fand die Expression der Bakterien nach IPTG-Zugabe über Nacht bei Raumtemperatur statt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm, 4°C, 10 min, pelletiert. Die Bakterien wurden in eiskaltem PBS-Puffer mit einfach konzentriertem Protease-Inhibitor-Mix (Roche) und 0.2 mg/ml Lysozym resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurde

durch Ultraschall im Bandelin Sonoplus HD2200 lysiert. Die Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation bei 15.000 rpm, 4°C, 15 min, entfernt und der Überstand mit der entsprechenden Affinitätsmatrix (Glutathion-Sepharose bei GST-Fusionsproteinen, NiNTA-Agarose bei His₆-markierten Proteinen) 2-12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde in eine 5 ml Säule gegossen und mit 40 Säulenvolumina PBS + 1 % Triton X-100 gewaschen. Die Proteine wurden anschließend von der Säule eluiert (10 mM Tris/HCl, 10 mM Glutathion bei GST-Fusionsproteinen, 10 mM Tris/HCl, 200 mM Imidazol bei His₆-markierten Proteinen), mit Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

5.2.2 Native Reinigung von Proteinen aus Insektenzellen

Sf9-Zellen (Pharmingen) wurden bei 27°C in Sf-900 II SFM Medium mit 10 % FCS (Sigma) kultiviert. Adherend wachsende Zellen wurden bei 90 % Konfluenz von der Kulturflasche abgelöst und in frisches Medium verdünnt. Die Zellen wurden nach Verdünnen mit dem entsprechenden Virus infiziert (Koegl et al., 1999) und vier Tage bei 27 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend von der Kulturflasche gelöst, vorsichtig bei 1000 rpm, 20°C, 5 min, pelletiert und einmal mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 1 x Complete Protease Inhibitor Mix) resuspendiert und im Wheaton Gewebedisruptor lysiert. Zellbruchstücke wurde durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand durch eine weitere Zentrifugation bei 14.000 rpm geklärt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Überstand wurde entweder direkt in Experimenten eingesetzt oder zur Reinigung von Proteinen wie unter 1.5.2.1 beschrieben eingesetzt.

5.3 In vitro-Experimente

5.3.1 In vitro-Mobilisierung des SPT23 p90-Transkriptionsfaktors

Für die Mobilisierungsstudien wurden Hefezellen, die ^{myc}SPT23^{HA} unter Kontrolle des *GAL1,10*-Promotors exprimierten, verwendet. 100 ml exponentiell wachsende Hefekultur (Wachstumstemperatur 30 °C) wurde geerntet. Die Membranen wurden wie unter 4.3.7.2 beschrieben isoliert und bei 27 °C für 30 min in Reaktionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂) inkubiert. Den Reaktionen wurde in steigender Konzentration gereinigtes CDC48 oder Lysat von CDC48-exprimierenden Insektenzellen zugegeben. Wahlweise wurde die Reaktion durch Präinkubation des Ansatzes auf Eis mit 0.2 mM NEM oder Apyrase inhibiert. Die Reaktionen wurden durch Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C, 30 min, gestoppt. Die durch die Zentrifugation voneinander getrennten löslichen bzw. Membranfraktionen wurden anschließend im anti-myc-Immunoblot analysiert.

5.3.2 In vitro-Ubiquitinierung

Als Substrate der in vitro-Ubiquitinierungsreaktionen wurden ^{Ubi}GST, GST-UBOX oder Ubi-lacI-ProteinA eingesetzt. Die Reaktionen wurden daher wahlweise im anti-GST- bzw. im anti-Protein A-Immunoblot analysiert. Das gereinigte Substrat wurde mit gereinigtem E1 (Affiniti), E2 aus Insektenzellysat, E3 aus Insektenzellysat und wahlweise E4 (aus Bakterien gereinigtes ^{HIS}UFD2, bzw. E4 aus Insektenzellysat) in Gegenwart von 10 mM ATP, 0.2 mg/ml Ubiquitin (Affiniti) und 0.05 % Tween20 in einfach konzentriertem UBAB-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) versetzt und für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Kochen in 1x Ladepuffer abgestoppt und nach Gelelektrophorese im entsprechenden Immunoblot analysiert.

Literaturverzeichnis

- Aravind, L., und Koonin, E.V. (2000). The U box is a modified RING finger – a common domain in ubiquitination. *Curr. Biol.* 10, R132-R134.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Estepa-Spapl, E., Meerloo, T., und Emr, S.D. (2002a). Escrt-III. An endosome-associated heterologous protein complex required for MVB sorting. *Dev. Cell* 3, 271-282.
- Babst, M., Katzmann, D.J., Snyder, W., Wendland, B., und Emr, S.D. (2002). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev. Cell.* 3, 283-292.
- Bachmair, A., Finley, D., und Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-86.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W., und Elledge, S.J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-274.
- Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y., und Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat-shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell Biol.* 19, 4535-4545.
- Bäuerle, P.A., und Baltimore, D. (1989). A 65-kDa subunit of active NF- κ B is required for inhibition of NF- κ B by I κ B. *Genes Dev.* 3, 1689-1698.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., und Seemüller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.
- Bays, N.W., Wilhovsky, S.K., Goradia, A., Hodgkiss-Harlow, K., und Hampton, R.Y. (2001). HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol. Biol. Cell* 12, 4114-4128.
- Betts, J.C., und Nabel, G.J. (1996). Differential regulation of NF- κ B2 (p100) processing and control by amino-terminal sequences. *Mol. Cell Biol.* 16, 6363-6371.
- Boyd, S.D., Tsai, K.Y., und Jacks, T. (2000). An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat. Cell Biol.* 2, 563-568.
- Brasier, A.R., Lu, M., Hai, T., Lu, Y., und Boldogh, I. (2001). NF- κ B-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF- κ B1 residence. *J. Biol. Chem.* 276, 32080-32093.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., und Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* 1, 221-226.

- Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., und Jentsch, S. (2002). Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J.* 21, 615-621.
- Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., und Goldstein, J.L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol. Cell* 10, 237-245.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., und Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398.
- Buchberger, A., Howard, M.J., Proctor, M., und Bycroft, M. (2001). The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. *J. Mol. Biol.* 307, 17-24.
- Cao, X., und Südhof, T. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293, 115-120.
- Carratú, L., Franceschelli, S., Pardini, C.L., Kobayashi, G.S., Horvath, I., Vigh, L., und Maresca, B. (1996). Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3870-3875.
- Chang, A., Cheang, S., Espanel, X., und Sudol, M. (2000). Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 275, 20562-20571.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., und Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.
- Chen, A., Kleiman, F.E., Manley, J.L., Ouchi, T., und Pan, Z-Q. (2002). Autoubiquitination of the BRCA1/BARD1 RING ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 277, 22085-22092.
- Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T.G., und Madura, K. (2001). Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep.* 2, 933-938.
- Chen, L., und Madura, K. (2002). Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4902-4913.
- 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 12 repressor. *Cell* 74, 357-369.
- Ciechanover, A., Gonen, H., Bercovich, B., Cohon, S., Fajerman, I., Israel, A., Mercurio, F., Kahana, C., Schwartz, A.L., Iwai, K., und Orian, A. (2001). Mechanisms of ubiquitin-mediated, limited processing of the NF- κ B precursor protein p105. *Biochimie* 83, 341-349.
- Clary, D.O., Griff, I.C., und Rothman, J.E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709-721.

Conaway, R.C., Brower, C.S., und Conawya, J.W. (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* 296, 1254-1258.

Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Höhfeld, J., und Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.* 3, 93-96.

Cyr, D.M., Höhfeld, J., und Patterson, C. (2002). Protein quality control: U-box containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem. Sci.* 27, 368-375.

Dai, R.M., Chen, E., Longo, D.L., Gorbea, C.M., und Li, C.C. (1998). Involvement of valosin-containing protein, an ATPase co-purified with I B and 26S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of I B, *J. Biol. Chem.* 273, 3562-3573.

Dai, R.M., und Li, C.C. (2000). Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat. Cell Biol.* 3, 740-744.

DeBello, W.M., O'Connor, V., Dresbach, T., Whiteheart, S.W., Wang, S.S., Schweizer, F.E., Betz, H., Rothman, J., und Augustine, G.J. (1995). SNAP-mediated protein-protein interactions essential for neurotransmitter release. *Nature* 373, 626-630.

DeHoratius, C., und Silver, P.A. (1996). Nuclear transport defects and nuclear envelope alterations are associated with mutation of the *Saccharomyces cerevisiae* *NPL4* gene. *Mol. Biol. Cell* 7, 1835-1855.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, L., Slaughter, C., Pickart, C., und Chen, Z.J. (2000). Activation of the I B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361.

Ebinu, J. O., und Yankner, B.A. (2002). A RIP tide in neuronal signal transduction. *Neuron* 34, 499-502.

Ellison, M.J., und Hochstrasser, M. (1991). Epitope-tagged ubiquitin. A new probe for analyzing ubiquitin function. *J. Biol. Chem.* 266, 21150-21157.

Elsasser, S., Gali, R.R., Schwickart, M., Larsen, C.N., Leggett, D.S., Müller, B., Feng, M.T., Tübing, F., Dittmar, G.A., und Finley, D. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like domains. *Nature Cell Biol.* 4, 725-730.

Fan, C.M., und Maniatis, T. (1991). Generation of p50 subunit of NF- B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* 354, 395-398.

Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H., und Weissman, A.M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 8945-8951.

Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T., und Johnston, S.A. (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 7, 981-991.

Fröhlich, K.U., Fries, H.W., Rüdiger, M., Erdmann, R., Botstein, D., und Mecke, D. (1991). Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J. Cell Biol.* 114, 443-453.

Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G., und Sundquist, W.I. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65.

Geyer, R.K., Yu, Z.K., und Maki, C.G. (2000). The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat. Cell Biol.* 2, 569-573.

Ghislain, M., Dohmen, R.J., Levy, F., und Varshavsky, A. (1996). Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD40 repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15, 4884-4899.

Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P., und Rochette-Egly, C. (2002). Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR degradation and transactivation. *EMBO J.* 21, 3760-3769.

Glotzer, M., Murray, A.W., und Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.

Gonzalez, C.I., und Martin, C.E. (1996). Fatty acid-responsive control of mRNA-stability. Unsaturated fatty acid-induced degradation of the *Saccharomyces OLE1* transcript. *J. Biol. Chem.* 271, 25801-25809.

Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T., und Johnston, S.A. (2002). Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* 296, 548-550.

Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., und Huber, R. (1997). Structure of the 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.

Golbik, R., Lupas, A.N., Koretke, K.K., Baumeister, W., und Peters, J. (1999). The Janus face of the archeal Cdc48/p97 homologue VAT: protein folding versus unfolding. *Biol. Chem.* 380, 1049-1062.

Gorr, I. (2001). Charakterisierung des membrangebundenen Transkriptionsfaktors SPT23 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit an der Universität Würzburg.

Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., und Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7, 999-1001.

Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., und Heuser, J.E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90, 523-535.

Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N., und Nakayama, K.-I. (2001). U-Box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.* 276, 33111-33120.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., und Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.

Hetzer, M., Meyer, H.H., Walther, T.C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G. und Mattaj, I.W. (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nature Cell Biol.* 3, 1086-1091.

Heusch, M., Lin, L., Geleziunas, R., und Greene, W.C. (1999). The generation of nfkb2 p52: mechanism and efficiency. *Oncogene* 18, 6201-6208.

Hicke, L., und Riezman, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-287.

Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 195-201.

Hitchcock, A.L., Krebber, H., Fietze, S., Lin, A., Latterich, M., und Silver, P.A. (2001). The conserved NPL4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol. Biol. Cell* 12, 3226-3241.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30, 405-439.

Höge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., und Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Hofmann, K., und Falquet, L. (2001). A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal und lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem. Sci.* 26, 347-350.

Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D., Schofield, C.J., Pugh, W.C., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I., und Jones, E.Y. (2002). Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 by VHL. *Nature* 417, 975-978.

Honda, R., Tanaka, H., Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420, 25-27.

Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D., und Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102, 577-586.

Hoppe, T. (2000). Aktivierung eines membrangebundenen Transkriptionsfaktors durch das Ubiquitin/Proteasomsystem. Dissertation an der Universität Heidelberg.

Hoppe, T., Rape, M., und Jentsch, S. (2001). Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP and RUP. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 344-348.

Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., und Howley, P. (1995). A family of protein structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2563-2567.

Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.-I., und Takahashi, R. (2002). CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's Disease, and enhances its ubiquitin ligase activity, *Mol. Cell* 10, 55-67.

Imhof, M.O., und McDonnell, D.P. (1996). Yeast RSP5 and its human homolog hRPF1 potentiate hormone-dependent activation of transcription by human progesterone and glucocorticoid receptors. *Mol. Cell Biol.* 16, 2594-2605.

Ingham, P.W. (1998). Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.* 17, 3505-3511.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A.V., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., und Ratcliffe, P.J. (2001). Targeting of HIF-1 to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.

Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., und Reimann, J.D.R. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10, 429-439.

James, P., Halladay, J., und Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.

Jentsch S., McGrath, J.P., und Varshavsky, A. (1986). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* 329, 131-134.

Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Höhfeld, J., und Patterson, C. (2001). CHIP is a U-Box-dependent E3 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 276, 42938-42944.

Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E., und Goldverg, M.A. (2001). MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21, 6161-6169.

Joazeiro, C.A.P., und Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.

Johnson, E.S., und Blobel, G. (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J. Biol. Chem.* 272, 26799-26802.

Johnston, J.A., Johnson, E.S., Waller, P.R.H., und Varshavsky, A. (1995). Methotrexate inhibits proteolysis of Dihydrofolate Reductase by the N-end rule pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 8172-8178.

Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C., und Reed, S.I. (2000). Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCFMet30-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* 102, 303-314.

Katzmann, D.J., Babst, M., und Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* 106, 145-155.

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

Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L., und Finley, D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol. Cell* 7, 1143-1152.

Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T.P., Pappin, D., Freemont, P., und Warren, G. (1997). p47 is a cofactor for 97-mediated membrane fusion. *Nature* 388, 75-78.

Kuras, L., Rouillon, A., Lee, T., Barbey, R., Tyers, M., und Thomas, D. (2002). Dual regulation of the Met4 transcription factor by ubiquitin-dependent degradation and inhibition of promoter recruitment. *Mol. Cell* 10, 69-80.

Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., und Pickart, C.M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-767.

Latterich, M., Fröhlich, K.U., und Schekman, R. (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 82, 885-893.

Lee, C., Schwartz, M.P., Prakash, S., Iwakura, M., und Matouschek, A. (2001). ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. *Mol. Cell* 7, 627-637.

Lee, C., Prakash, S., und Matouschek, A. (2002). Concurrent translocation of multiple polypeptide chains through the proteasomal degradation channel. *J. Biol. Chem.* 277, 34760-34765.

Leonhard, K., Stiegler, A., Neupert, W., und Langer, T. (1999). Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature* 398, 348-351.

Leonhard, K., Guiard, B., Pellicchia, G., Tzagoloff, A., Neupert, W., und Langer, T. (2000). Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol. Cell* 5, 629-638.

- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S.A., Katz, M., Tsygankov, A.Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., und Yarden, Y. (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* 4, 1029-1040.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., und Jentsch, S. (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J.* 17, 2208-2214.
- Lin, L., und Ghosh, S. (1996). A glycin-rich region in NF- κ B p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2248-2254.
- Lin, L., DeMartino, G.N., und Greene, W.C. (1998). Cotranslational biogenesis of NF- κ B p50 by the 26S proteasome. *Cell* 92, 819-828.
- Lin, L., DeMartino, G.N., und Greene, W.C. (2000). Cotranslational dimerization of the Rel-homology domain of NF- κ B1 generates p50-p105 heterodimers and is required for effective p50 production. *EMBO J.* 19, 4712-4722.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., und Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.
- Lu, K.P., Liou, Y.C., und Zhou, X.Z. (2002). Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol.* 12, 164-172.
- Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P., und Lu, K.P. (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399, 784-788.
- Lu, Z., Xu, S., Joazeiro, C., Cobb, M.H., und Hunter, T. (2002). The PHD domain of MEKK1 acts as an E3 ubiquitin ligase and mediates ubiquitination and degradation of ERK1/2. *Mol. Cell* 9, 945-956.
- Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D., und Fröhlich, K.U. (1998). Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol. Cell Biol.* 9, 131-141.
- Matuschewski, K. (1998). Genetische Charakterisierung der Ubiquitin-Protein-Ligase RSP5. Dissertation and der Universität Heidelberg.
- May, A.P., Whiteheart, S.W., und Weis, W.I. (2001). Unraveling the mechanism of the vesicle transport ATPase NSF, the N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J. Biol. Chem.* 276, 21991-21994.
- Mayer, A., Wickner, W., und Haas, A. (1996). Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell* 85, 83-94.
- McGrath, J.P., Jentsch, S., und Varshavsky, A. (1991). UBA1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.* 10, 277-236.
- Meyer, H.H., Shorter, J.G., Seemann, J., Pappin, D., und Warren, G. (2000). A complex of mammalian UFD1 and NPL4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J.* 19, 2181-2192.

Michel, F., Soler-Lopez, M., Petosa, C., Cramer, P., Siebenlist, U., und Müller C.W. (2001). Crystal structure of the ankyrin repeat domain of Bcl-3: a unique member of the I B protein family. *EMBO J.* 20, 6180-6190.

Mitsui, A. und Sharp, P.A. (1999). Ubiquitination of RNA polymerase II large subunit signaled by phosphorylation of carboxyl-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6054-6059.

Molinari, E., Gilman, M., und Natesan, S. (1999). Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *EMBO J.* 18, 6439-6447.

Müller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L., und Harrison, S.C. (1995). Structure of the NF- B p50 homodimer bound to DNA. *Nature* 373, 311-317.

Müller, J.M., Rabouille, C., Newman, R., Shorter, J., Freemont, P., Schiavo, G., Warren, G., und Shima, D.T. (1999). An NSF function distinct from ATPase-dependent SNARE disassembly is essential for Golgi membrane fusion. *Nat. Cell Biol.* 1, 335-340.

Müller, J.M., Shorter, J., Newman, R., Deinhardt, K., Sagiv, Y., Elazar, Z., Warren, G., und Shima, D.T. (2002). Sequential SNARE disassembly and GATE-GOS-28 complex assembly mediated by distinct NSF activities drives the Golgi membrane fusion. *J. Cell Biol.* 157, 1161-1173.

Myers, J.K., Morris, D.P., Greenleaf, A.L., und Oas, T.G. (2001). Phosphorylation of RNA polymerase II CTD fragments results in tight binding to the WW domain from the yeast prolyl isomerase Ess1. *Biochemistry* 40, 8479-8486.

Nakagawa, Y., Sakumoto, N., Kaneko, Y., und Harashima, S. (2002). Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 707-713.

Nehrbass, U., Fabre, E., Dihlmann, S., Herth, W., und Hurt, E.C. (1993). Analysis of nucleocytoplasmic transport in a thermosensitive mutant of nuclear pore protein NSP1. *Eur. J. Biochem.* 62, 1-12.

Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., und Koonin, E.V. (1999). AAA+: a class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 9, 27-43.

Noureddine, M.A., Donaldson, T.D., Thacker, S.A., und Duronio, R.J. (2002). *Drosophila Roc1a* encodes a RING-H2 protein with a unique function in processing the Hh signal transducer Ci by the SCF E3 ubiquitin ligase. *Dev. Cell* 2, 757-770.

Orian, A., Schwartz, A.L., Israel, A., Whiteside, S., Kahana, C., und Ciechanover, A. (1999). Structural motifs involved in ubiquitin-mediated processing of the NF- B precursor p105: roles of the glycine-rich region and a downstream ubiquitination domain. *Mol. Cell Biol.* 19, 3664-3673.

- Ortolan, T.G., Tongaonkar, P., Lambertson, D., Chen, L., Schaubert, C., und Madura, K. (2000). The DNA repair protein Rad23 is a negative regulator of multiubiquitin chain assembly. *Nat. Cell Biol.* 2, 601-608.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.J., und Maniatis, T. (1994). The ubiquitin/proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 78, 773-785.
- Patel, S.K., Indig, F.E., Olivieri, N., Levine, N.D., und Latterich, M. (1998). Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion. *Cell* 92, 611-620.
- Patel, S., und Latterich, M. (1998). The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biol.* 8, 65-71.
- Pelham, H.R.B. (2001). SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol.* 11, 99-101.
- Peters, J.M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* 9, 931-943.
- Pfleger, C.M., Lee, E., und Kirschner, M. (2001). Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 15, 2396-2407.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 503-533.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., DeCamilli, P., DiFiore, P.P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416, 381-383.
- Preker, P.J., Ohnacker, M., Minvielle-Sebastia, L., und Keller, W. (1997). A multisubunit 3' end processing factor from yeast containing poly (A) polymerase and homologues of the subunits of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor. *EMBO J.* 16, 4727-4737.
- Rabouille, C., Kondo, H., Newman, R., Hui, N., Freemont, P., und Warren, G. (1998). Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro. *Cell* 92, 603-610.
- Rao, H., und Sastry, A. (2002). Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J. Biol. Chem.* 277, 11691-11695.
- Rizo, J., und Südhof, T.C. (1998). Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Biol.* 5, 839-842.
- Rouiller, I., Butel, V.M., Latterich, M., Milligan, R.A., und Wilson-Kubalek, E.M. (2000). A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding. *Mol. Cell* 6, 1485-1490.
- Ryoo, H.D., Bergmann, A., Gonen, H., Ciechanover, A., und Steller, H. (2002). Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by reaper and UbcD1. *Nat. Cell Biol.* 4, 432-438.

- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., und Brown M.S. (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* 273, 5785-5793.
- Salghetti, S.E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B., und Tansey, W.P. (2000). Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3118-3123.
- Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G., und Tansey, W.P. (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* 293, 1651-1653.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., und Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Scheffner, M., Nuber, U., und Huibregtse, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81-83.
- Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., und Kopan, R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386.
- Schwab, M., Neutzner, M., Möcker, D., und Seufert, W. (2001). Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *EMBO J.* 20, 5165-5175.
- Schwarz, S.E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M., und Jentsch, S. (1998). The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 560-564.
- Sears, C., Olesen, J., Rubin, D., Finley, D., und Maniatis, T. (1998). NF- κ B p105 processing via the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 1409-1419.
- Seelert, H., Poetsch, A., Rohlf, M., und Dencher, N.A. (2000). Dye-ligand chromatographic purification of intact multisubunit membrane protein complexes: application to the chloroplast H⁺-F₀F₁-ATP synthase. *Biochem. J.* 346, 41-44.
- Shih, S.C., Katzmann, D.J., Schnell, J.D., Sutanto, M., Emr, S.D., und Hicke, L. (2002). Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 4, 389-393.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., und Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-219.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., und Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.

- Sommer, T., und Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365, 176-179.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L., und Finley, D. (1996). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol. Cell Biol.* 15, 1265-1273.
- Strickland, E., Hakala, K., Thomas, P.J., und DeMartino, G.N. (2000). Recognition of misfolding protein by PA700, the regulatory subcomplex of the 26S proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 5565-5572.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M., und Martin, C.E. (1989). Isolation and characterization of *OLE1*, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 264, 16537-16544.
- Sun, Z.W., und Allis, C.D., Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418, 104-108.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., und Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94-102.
- Uetz, P., et al. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-627.
- Ulrich, H.D., und Jentsch, S. (2000). Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J.* 19, 3388-3397.
- Ungermann, C., Nichols, B.J., Pelham, H.R., und Wickner, W. (1998). A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. *J. Cell Biol.* 140, 61-69.
- Van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., finley, D., und Vierstra, R.D. (1996). The multiubiquitin-chain-binding protein Mcb1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential substrate-specific role in protein turnover. *Mol. Cell Biol.* 16, 6020-6028.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., und Deshaies, R.J. (2000). Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol. Biol. Cell* 11, 3425-3439.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates III, J.R., Koonin, E.V., und Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* (epub)
- Vigh, L., Maresca, B., und Harwood, J.L. (1998). Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes ? *Trends Biochem. Sci.* 23, 369-374.
- Visintin, R., Prinz, S., und Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: A family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278, 460-463.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J.-I., und Chen, Z.J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.

Wäsch, R., und Cross, F.R. (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418, 556-562.

Watanabe, N., Iwamura, T., Shinoda, T., und Fujita, T. (1997). Regulation of NF- κ B proteins by the candidate oncoprotein BCL-3: generation of NF- κ B homodimers from the cytoplasmic pool of p50-p105 and nuclear translocation. *EMBO J.* 16, 3609-3620.

Weber-Ban, E.U., Reid, B.G., Miranker, A.D., und Horwich, A.L. (1999). Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* 401, 90-93.

Wenzel, T., und Baumeister, W. (1995). Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Nat. Struct. Biol.* 2, 199-204.

Whiteheart, S.W., Griff, I.C., Brunner, M., Clary, D.O., Mayer, T., Buhrow, S.A., und Rothman, J.E. (1993) SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature* 362, 353-355.

Wilkinson, K.D., und Hochstrasser, M. (1998). The deubiquitinating enzymes. In: *Ubiquitin and the biology of the cell*. Plenum Press, 99-120.

Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., und Gordon, C. (2001). Proteins containing the UBA domain are able to bind to multiubiquitin chains. *Nat. Cell Biol.* 3, 939-943.

Wolfe, D., Hester, D., und Keil, R.L. (1998). Volatile anesthetic additivity and specificity in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for yeast as a model system to study mechanisms of anesthetic action. *Anesthesiology* 89, 174-181.

Wolfe, D., Reiner, T., Keeley, J.L., Pizzini, M., und Keil, R.L. (1999). Ubiquitin metabolism affects cellular response to volatile anesthetics in yeast. *Mol. Cell Biol.* 19, 8254-8262.

Xiao, G., Harhaj, E.W., und Sun, S.C. (2001). NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B p100. *Mol. Cell* 7, 401-409.

Xie, Y., und Varshavsky, A. (1999). The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chains. *EMBO J.* 18, 6832-6844.

Xu, Z., Sato, K., und Wickner, W. (1998). LMA1 binds to vacuoles at Sec18p (NSF), transfers upon ATP hydrolysis to a t-SNARE (Vam3p) complex, and is released during fusion. *Cell* 93, 1125-1134.

Xu, W., Marcu, M., Yuan, X., Mimnaugh, E., Patterson, C., und Neckers, L. (2002). Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12847-12852.

- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., und Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489-500.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M., und Ashwell, J.D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288, 874-877.
- Yao, T., und Cohen, R.E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419, 403-407.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., und Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355-1364.
- Ye, Y., Meyer, H.H., und Rapoport, T.A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.
- Yuan, X., Shaw, A., Zhang, X., Kondo, H., Lally, J., Freemont, P.S., und Matthews, S. (2001). Solution structure and interaction surface of the C-terminal domain from p47: a major p97-cofactor involved in SNARE disassembly. *J. Mol. Biol.* 311, 255-263.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., und Seufert, W. (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282, 1721-1724.
- Zhang, S., Skalsky, Y., und Garfinkel, D.J. (1999). MGA2 or SPT23 is required for transcription of the 9 fatty acid desaturase gene, *OLE1*, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 151, 473-483.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, P.A., Newman, R.H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M.A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H., van Heel, M., und Freemont, P.S. (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol. Cell* 6, 1473-1484.
- Zhang, Z., Nadeu, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., und Yankner, B.A. (2000). Presenilins are required for γ -secretase cleavage of β -APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat. Cell Biol.* 2, 463-465.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Harper, J.W., und Pavletich, N.P. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box^{Skp2} SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP S	Adenosin-5'-O-(3-Thiotriphosphat)
Gal	-Galaktosidase
BSA	Rinderserumalbumin
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> (Gelfärbung)
cDNA	komplementäre DNS
Ci	Curie
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4'6'-Diamino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Deoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
E1	Ubiquitin-Aktivierungsenzym
E2	Ubiquitin-Konjugationesenzym
E3	Ubiquitin-Ligase
E4	Multiubiquitinierungsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
hrs	Stunden
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethan-sulfonsäure]
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
INPUT	Kontrolle der für eine IP eingesetzten Proteinmenge
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- -D-galaktopyranosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
<i>MAT</i>	Mating type
merge	zusammengelegte Bilder der Immunfluoreszenz
min	Minuten
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NEM	N-Ethylmaleimid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Terminus

Abkürzungsverzeichnis

OD _x	Optische Dichte bei x nm
O/E	Überexpression
OLE-Weg	Regulon der <i>OLE1</i> -Transkription
ONPG	Ortho-Nitrophenylgalaktosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Phase	Phasenkontrastaufnahme
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RING	<i>really interesting new gene</i> (E3-Enzym)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TCA	Trichloressigsäure
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UBC	Ubiquitin-Konjugationsenzym
UFD	<i>ubiquitin fusion degradation</i>
Ubi	Ubiquitin
Ubi-DHFR	Ubiquitin-lacI-DHFR
Ubi-Pro Gal	Ubiquitin- Prolin-lacI- -Galaktosidase
ULA	Ubiquitin-lacI-ProteinA
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- -D-galaktopyranosid
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	Hefeextrakt/Baktopepton/Dextrose (<i>S. cerevisiae</i> -Medium)

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, daß ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, 30. September 2002