

Untersuchungen zur Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems durch
den Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor und dessen Interaktoren
COP9 Signalosom und p97 in der zellulären Hypoxieantwort

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Julius Chapiro
aus Riga
Gießen 2014

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. Tilman Borggrefe

Tag der Disputation: 20.01.2015

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Cayli S, Klug J, **Chapiro J**, Fröhlich S, Krasteva G, Orel L, et al. COP9 signalosome interacts ATP-dependently with p97/valosin-containing protein (VCP) and controls the ubiquitination status of proteins bound to p97/VCP. J Biol Chem. 2009 Dec 11;284(50):34944-53.

Der Anteil von CJ an der Publikation beträgt 20%.

Assis DN, Leng L, Du X, Zhang CK, Grieb G, Merk M, Garcia AB, McCrann C, **Chapiro J**, Meinhardt A, et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in autoimmune liver disease. Hepatology. 2014;59(2):580-91.

Der Anteil von CJ an der Publikation beträgt 5%.

Die in dieser Arbeit präsentierten Experimente zum Tiermodell der Kollagen-induzierten Arthritis wurden am Department of Internal Medicine an der Yale University School of Medicine durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System	1
1.1.1. Aufbau und Funktionen des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der eukaryotischen Zelle.....	1
1.1.2. Die Bedeutung des UPS in Zellphysiologie und Pathologie.....	3
1.1.3. Therapeutische Ansätze, die auf das UPS zielen	6
1.2. Die Rolle der ATPase p97 im UPS.....	7
1.2.1. Die Struktur von p97	7
1.2.2. Die Funktionen von p97 und dessen Rolle in der proteasomalen Degradierung	9
1.2.3. p97 interagiert mit seinen Substraten über Adapterproteine	10
1.3. Die Rolle des COP9-Signalosoms (CSN) und des Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktors (MIF) im UPS	12
1.3.1. Struktur und Funktion des CSN	12
1.3.2. Das CSN hat eine Metalloproteaseaktivität und deneddyliert SCF E3 Ligasen	13
1.3.3. Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor beeinflusst die Aktivität des COP9 Signalosoms	14
1.3.4. Das CSN reguliert die zelluläre Hypoxieantwort.....	16
1.4. Zielsetzung der Arbeit	18
2. MATERIALIEN	19
2.1. Chemikalien.....	19
2.2. Enzyme	20
2.3. Antikörper.....	21
2.4. Zelllinien.....	21
2.5. Proteine und CSN	22
2.6. Kits.....	22
2.7. Zellkulturmedien und Antibiotika	22
2.8. Geräte.....	23
2.9. Sonstige Materialien	24
2.10. Expressionskonstrukte	25
2.11. Versuchstiere.....	26
3. METHODEN	28
3.1. Techniken in der Zellkultur und im Tierexperiment	28
3.1.1. Zelllinien und Zellkultur	28
3.1.2. Transfektion von Zellen	28
3.1.3. Das Tiermodell einer Kollagen-induzierten Arthritis (CIA).....	30
3.1.4. Herstellung von Gewebelysaten.....	31

3.2.	Biochemische Methoden	31
3.2.1.	Messung der Proteinkonzentration	31
3.2.2.	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
3.2.3.	Protein-Bindungsassay:	34
3.2.4.	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue Native- und Agarose-Kompositgele)	35
3.2.5.	Western Blotting.....	38
3.2.6.	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen.....	42
3.2.7.	Ko-Immunopräzipitation	43
3.2.8.	Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation.....	44
3.3.	Molekularbiologische Methoden	45
3.3.1.	Plasmidpräparation	45
3.3.2.	DNA-Agarosegelelektrophorese	46
3.3.3.	Isolierung der RNA aus dem Gelenkgewebe	48
3.3.4.	Reverse Transkription	49
3.3.5.	Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Real-Time-PCR.....	49
3.3.6.	PCR und Real-Time-PCR	50
4.	ERGEBNISSE	52
4.1.	Untersuchung der Interaktion zwischen p97 und CSN.....	52
4.1.1.	p97 interagiert in vivo mit dem gesamten CSN-Komplex	52
4.1.2.	Charakterisierung der an der Interaktion mit CSN5 beteiligten p97-Domänen	56
4.2.	Die Stabilität von HIF-1 α ist abhängig von MIF	57
4.2.1.	Die Inhibition von MIF in Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) führt zur Degradierung von HIF-1 α	58
4.2.2.	Die Expression von HIF-1 α -mRNA ist unabhängig von MIF	60
4.2.3.	Die Expression von VEGF-A-mRNA wird durch MIF-Inhibition herunterreguliert	61
5.	DISKUSSION	63
5.1.	CSN und p97 formieren einen ATP-abhängigen Komplex, welcher dem regulatorischen 19S-Partikel des Proteasoms ähnelt.....	64
6.2.	Die Beteiligung des CSN-Partikels am Abbau von HIF-1 α	68
5.2.	Die Inhibition von MIF führt zum vermehrten Abbau von HIF-1 α im UPS ...	69
5.3.	Ausblick.....	72
6.	ZUSAMMENFASSUNG	73
	SUMMARY	75
7.	ABKÜRZUNGEN	77
8.	LITERATURVERZEICHNIS	79

9. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	91
10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	92
11. DANKSAGUNG	93
12. LEBENSLAUF.....	94

1. EINLEITUNG

1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System

1.1.1. Aufbau und Funktionen des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der eukaryotischen Zelle

Die Funktionalität einer Zelle hängt von der Erhaltung des Gleichgewichtes im intrazellulären Proteinstoffwechsel ab. Somit stellt die Erkennung und schnelle Entfernung fehlgefalteter, gealterter oder regulierender Proteine eine vitale Aufgabe jeder Zelle dar. Diese Aufgabe wird vom Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) übernommen, für dessen Entdeckung Avram Hershko, Aaron Ciechanover und Irwin Rose den Nobelpreis für Chemie des Jahres 2004 erhielten. Dieser enzymatische Abbauprozess findet sowohl im Zytosol als auch im Nucleus statt und erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt erfolgt die Markierung der Substrate durch kovalente Konjugation an Ubiquitin (Ub), einem 8,5 kDa großen Polypeptid (Ciechanover, 2005). Dieser Vorgang wird Ubiquitinylierung genannt. Im folgenden Schritt werden die ubiquitinylierten Proteine einem Multienzymkomplex, dem Proteasom, präsentiert und anschließend degradiert.

Die Ubiquitinylierung beginnt mit der ATP-abhängigen Aktivierung des Ub. Dabei entsteht eine Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und einem Cysteinrest des Ub-aktivierenden Enzyms (E1). Im nächsten, intermediären Schritt wird das aktivierte Ub auf einen Cysteinrest des Ub-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Abschließend erfolgt die Übertragung des Ub auf das Substrat, welche von der Ub-Proteinligase (E3) katalysiert wird. Hierbei wird das aktivierte Ub auf einen Lysinrest des Substrates transferiert, wobei eine Isopeptidbindung entsteht (Abbildung 1) (Pickart, 2001 a, b).

Durch die Übertragung eines einzigen Ub-Moleküls (Monoubiquitinylierung) wird das Substrat verschiedenen intrazellulären Funktionen zugeordnet und kann in der Folge z.B. lysosomal sortiert werden (Abbildung 1) (Pickart, 2001 b ; Schnell und Hicke, 2003). Die Übertragung mehrerer Ub-Moleküle (Polyubiquitinylierung) ist dagegen die Voraussetzung für den Abbau des Substrates durch das Proteasom. Dabei bindet jedes nachkommende Ub-Molekül an einen Lysinrest des vorgeschalteten Ubiquitins. Damit ein Substrat vom Proteasom erkannt werden kann, bedarf es einer

Polyubiquitinylierung mit mindestens vier Ubiquitin-Molekülen (Thrower et. al., 2000), wobei die Verknüpfung einzelner Ubiquitin-Moleküle über Lysin 48 (K48) erfolgen muss.

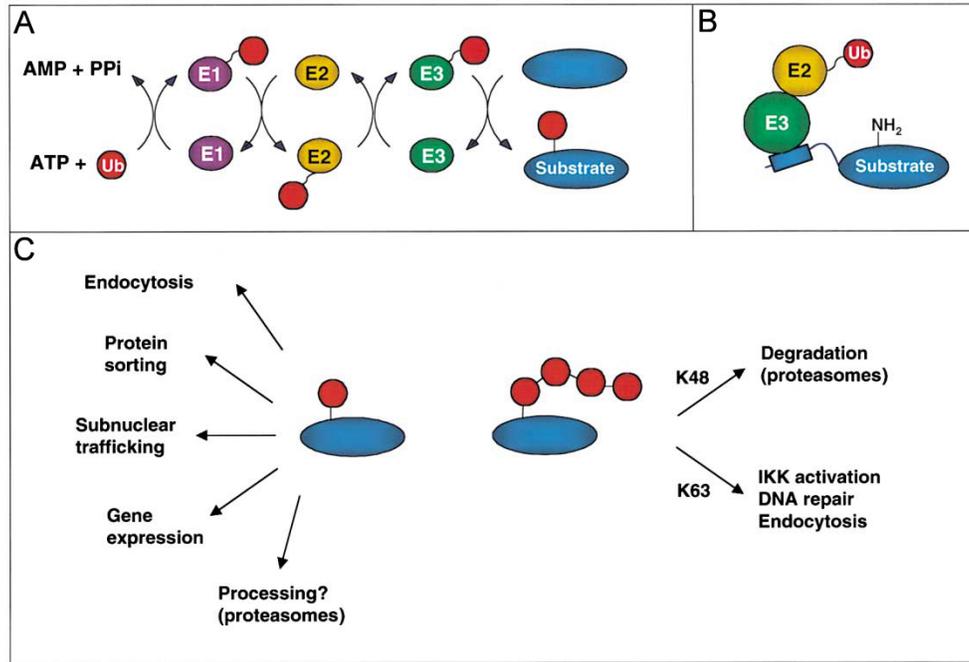


Abbildung 1: Mechanismus der Ubiquitinylierung und spezifische Funktionen

A: Ubiquitin wird durch E1 (s. Text) aktiviert und im nächsten Schritt auf E2 übertragen. Das Substratprotein (blau) sowie E2-Ub binden spezifisch an die E3 Proteinligase, welche das aktivierte Ubiquitin auf das Substrat überträgt. **B:** die E3 Proteinligase bindet das ubiquitinylierte konjugierende Enzym E2 und das Substrat an zwei verschiedenen Bindungsstellen. Das Substrat wird oft durch ein spezifisches Ubiquitinylierungssignal erkannt. **C:** links sind spezifische Funktionen der Monoubiquitinylierung genannt, rechts Funktionen der Polyubiquitinylierung. Über K48 polyubiquitinylierte Proteine werden proteasomal abgebaut, erfolgt die Ubiquitinylierung über K63 kann dies zur Endozytose der ubiquitinylierten Proteine führen, oder sie können in DNA-Reparaturmechanismen eingreifen (entnommen aus Pickart, 2001 b)

Im zweiten Schritt des UPS erfolgen die ATP-abhängige Entfaltung und der Abbau von poly-Ub-markierten Proteinen durch das 26S-Proteasom – dem Kernstück des UPS (Schwechheimer und Deng, 2001; Pickart und Cohen, 2004). Das 26S-Proteasom setzt sich aus zwei großen Komplexen zusammen (Abbildung 2). Der 20S-Kernkomplex ist eine hohlzylindrische Struktur. Sie besteht aus vier homologen Ringen, welche jeweils aus sieben unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut sind (Unno et al., 2002). Die proteolytische Aktivität des 20S-Komplexes findet sich dabei im Inneren der

Hauptkammer des Hohlzylinders (Borissenko und Groll, 2007). Die Erkennung der poly-Ub-Ketten und Entfaltung der Substrate sind Funktionen des regulatorischen 19S-Komplexes, welcher dem 20S-Kernkomplex auf beiden Enden deckelartig anliegt (Liu et al., 2002). Hierbei beinhaltet jeder 19S-Komplex etwa 15-20 Untereinheiten, welche sich auf zwei Subkomplexe verteilen (Glickman und Ciechanover, 2002). Auf diese Weise entstehen der Deckel sowie ein ringförmiger Subkomplex – die Basis (Abbildung 2). Der Deckel besteht aus neun Untereinheiten, welche u. a. die poly-Ub-Ketten erkennen und Zn^{2+} -abhängig die Deubiquitinylierung des Substrates katalysieren. Anschließend werden die poly-Ub-Ketten durch Deubiquitinylierungsenzyme (DUBs) zu einzelnen Ub-Molekülen abgebaut, um eine kompetitive Hemmung an den Bindungsstellen für polyubiquitinylierte Substrate zu verhindern (Amerik und Hochstrasser, 2004). Die Basis besteht aus mindestens sechs Untereinheiten, welche ATPase-Aktivität aufweisen und die Substratentfaltung und Translokation vermitteln.

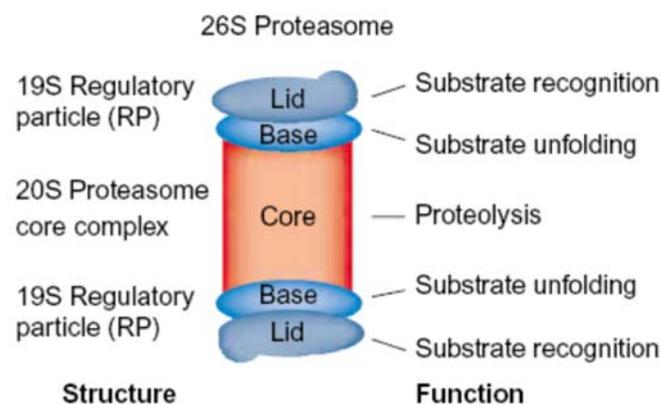


Abbildung 2: Struktur und funktionelle Einteilung des 26S-Proteasoms

Das 26S-Proteasom setzt sich aus dem regulatorischen 19S-Komplex (unterteilt in die Subkomplexe Deckel (Lid) und Basis (Base)) und dem proteolytischen 20S-Kernkomplex (Core) zusammen. Den einzelnen Komplexen sind **rechts** die Funktionen zugeordnet (entnommen aus Schwechheimer und Deng, 2001).

1.1.2. Die Bedeutung des UPS in Zellphysiologie und Pathologie

Die proteosomale Degradierung von Proteinen beeinflusst eine Vielzahl von intrazellulären Steuermechanismen. So limitiert das UPS beispielsweise die Aktivität zahlreicher Transkriptionsfaktoren, darunter NF- κ B, c-Myc und c-Jun, indem es diese

aus regulatorischen Kreisläufen eliminiert. Infolge dessen kann die Expression zahlreicher Gene entweder verlangsamt oder induziert werden.

Ein wichtiges Zielprotein der proteasomalen Degradierung ist der Tumorsuppressor p53. Zu den Hauptfunktionen von p53 gehört die Steuerung des Zellzyklus DNA-geschädigter Zellen, in welchen p53 einen Zellzyklusarrest bewirkt und den Zelluntergang durch Apoptose induziert. Das p53 spielt eine bedeutende Rolle in zahlreichen humanen Tumorzelllinien, wobei Punktmutationen im p53-Gen besonders häufig zu finden sind und zu einem Funktionsverlust des Proteins führen können (Hollstein et al., 1991). Die Rolle des UPS im Abbau von p53 wurde durch zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Studien nachgewiesen (Levine et al., 1991, Maki et al., 1996). Es ist weiterhin bekannt, dass Humane Papillomaviren (HPV) die proteasomale Degradierung von p53 in infizierten Zellen zu beschleunigen scheinen. Sie können somit zur Karzinogenese zahlreicher Tumoren, so z.B. des Zervixkarzinoms, beitragen (Scheffner und Whitaker, 2003). Allerdings konnte dieser in zahlreichen Erkrankungen auftretende Pathomechanismus, welcher für einen vorzeitigen proteasomalen Abbau von Schlüsselproteinen verantwortlich zu sein scheint (Abbildung 3), bisher noch nicht ausreichend geklärt werden.

Ein weiteres Zielprotein des UPS ist der Hypoxie-induzierte Faktor 1α (HIF- 1α). Die Aktivität von HIF- 1α kann in allen eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden, wobei dieser in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor mehr als 100 Gene zu regulieren vermag (Weidemann et al., 2008). Dabei erfüllt HIF- 1α seine Aufgabe als intrazellulärer Sauerstoffsensoren und vermittelt bei erniedrigten Sauerstoffkonzentrationen eine Stressreaktion der Zelle (Nizet und Johnson, 2009). HIF- 1α beeinflusst darüber hinaus den Stoffwechsel, die Angiogenese, die Zelldifferenzierung und die Apoptose von Tumorzellen (Maxwell, 2005). Mehrere Studien beschreiben die Rolle von HIF- 1α in der Tumorprogression sowie in ischämischen Erkrankungen des Herzmuskels und des Gehirns (Harris et al., 2002; Semenza et al., 2003). Unter hypoxischen Bedingungen entgeht HIF- 1α der Polyubiquitinylierung und Prozessierung im UPS und beeinflusst über seine Transkriptionsprodukte, darunter vor allem der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), die lokale Aggressivität sowie das Metastasierungsverhalten solider Tumoren (Jaakkola, P. et al., 2001).

Eine bedeutende Funktion des UPS ist die Qualitätskontrolle der im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisierten Proteine. So sind etwa 30% aller neu synthetisierten ER-Produkte fehlgefaltet, unterliegen einer Selektion und anschließend dem proteasomalen Abbau, um eine intrazelluläre Akkumulation zu verhindern (Rivett und Hearn, 2004). Da das Proteasom nicht im ER lokalisiert ist, bedarf es eines Mechanismus, welcher die retrograde Translokation der Substrate aus dem ER in das Zytosol ermöglicht. Diese Aufgabe wird durch Chaperone vermittelt, welche als hochkonservierte Komplexe u.a. für die Erkennung fehlgefalteter Sekundärstrukturen von Proteinen verantwortlich sind (Carvalho et al., 2006, Leidhold und Voos, 2007). Die retrograde Translokation defekter Proteine ist ATP-abhängig und wird vor allem durch das Chaperon p97 (ebenfalls bekannt als Cdc48p oder valosin-containing protein (VCP)) realisiert (Halawani und Latterich, 2006). Anschließend werden die Substrate im UPS prozessiert und degradiert. Hierbei spricht man von einer ER-assoziierten Degradierung (ERAD). Störungen der ERAD können zu einer toxischen Akkumulation fehlgefalteter Proteine in der Form von Aggresomen führen (Vij, 2008). Diese spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Morbus Alzheimer, zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen und Tumorerkrankungen (Gao et al., 2008; Hoshino et al., 2007; Ishigaki et al., 2004) (Abbildung 3).

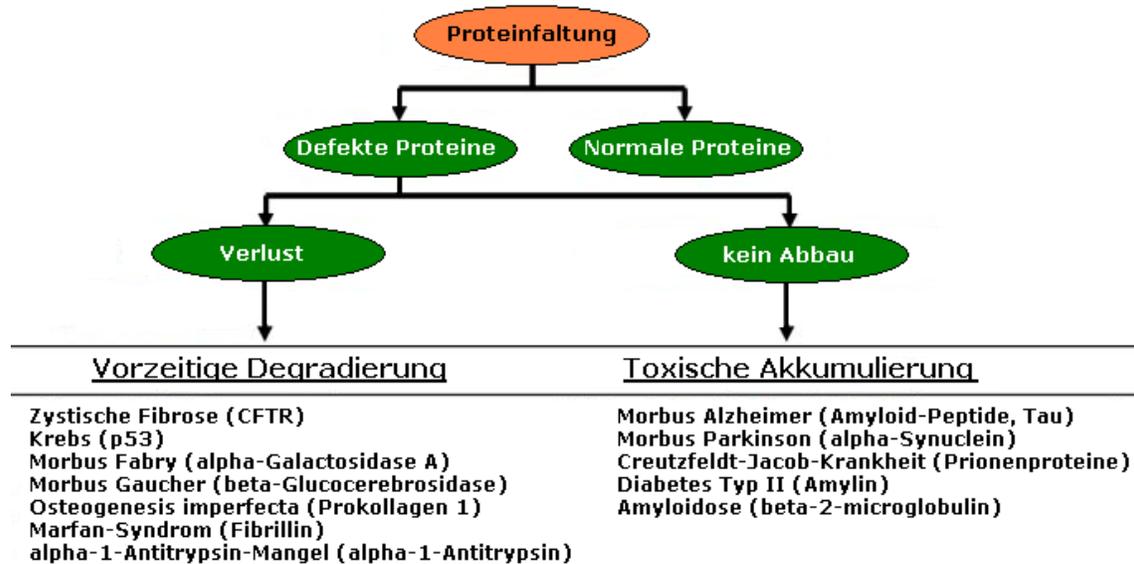


Abbildung 3: Zusammenfassung der durch Proteinfehlfaltung verursachten Krankheiten

Störungen durch Proteinfehlfaltung können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Links sind die Folgen vorzeitiger Entfernung fehlgefalteter Proteine durch das UPS oder im Rahmen der ERAD, rechts die Folgen der toxischen Akkumulierung fehlgefalteter Proteine gezeigt. Betroffene Proteine sind in Klammern aufgeführt (modifiziert nach Vij, 2008).

1.1.3. Therapeutische Ansätze, die auf das UPS zielen

Zahlreiche Studien neuer therapeutischer Ansätze von Tumorerkrankungen haben das UPS als ein molekulares Ziel definiert. Dabei stellt beispielsweise die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren (z.B. Velcade®, Bortezomib) eine häufige Vorgehensweise dar (Ciechanover, 2011). Die Inhibition des UPS führt unter anderem zu Veränderungen im Haushalt der Cycline und blockiert den Zellzyklus an den Phasentübergängen zwischen der G1/S- bzw. G2/M-Phase, sodass in der Folge eine Caspase-unabhängige Apoptose in den exponierten Tumorzellen induziert wird (Shah et al., 2001; Kroemer et al., 2001). Dieser Mechanismus konnte in Tumorzellen des Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphoms (Schenkein et al., 2002), des Multiplen Myeloms (Martinelli et al., 2001) sowie in zahlreichen anderen Tumorzelltypen erfolgreich ausgelöst werden. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren die Effektivität konventioneller Radio- und Chemotherapie von soliden Tumoren zu erhöhen vermag. Dabei scheinen Proteasom-Inhibitoren die

Sensitivität von Tumorzellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Chemotherapeutika zu erhöhen (Li et al., 2001, Crawford et. al., 2011).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das UPS in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse involviert zu sein scheint. Dabei können die vielversprechenden, therapeutischen Ansätze auf dem Gebiet der Radio- und Hämatonkologie als wichtiger Hinweis auf das noch zu erforschende Potential dieses Systems verstanden werden (de Bettignies und Coux, 2010).

1.2. Die Rolle der ATPase p97 im UPS

1.2.1. Die Struktur von p97

Die 97-kDa große, multifunktionelle Typ II AAA-ATPase p97 (ATPases Associated with a variety of Activities) ist ein hochkonserviertes Protein in eukaryotischen Zellen, welches ubiquitär vorkommt und bis zu 1% der intrazellulären Proteinmasse ausmacht (Vale, 2000; Maurizi und Li, 2001). Jedes p97-Molekül besitzt zwei charakteristische ATPase-Domänen, welche als AAA-Domänen bezeichnet werden (Neuwald et al., 1999; Zwickl und Baumeister, 1999; Ogura und Wilkinson, 2001; Vij, 2008). Elektronenmikroskopische und kristallographische Untersuchungen zeigen, dass das Homohexamere bildende p97 (Wang et al, 2003) aus zwei übereinander gestapelten Ringen mit einer zentralen Pore aufgebaut ist (Dreveny et al., 2004) (Abbildung 4). Dabei scheint der Öffnungsgrad der zentralen Pore dynamisch zu sein und durchläuft ATP-abhängige Konformationsänderungen (DeLaBarre und Brunger, 2005; Davies et al., 2008; Beskow et al., 2009). Studien beschreiben die strukturelle Ähnlichkeit des etwa 580 kDa großen p97-Homohexamers mit der Basis des proteasomalen 19S-Komplexes, welcher aus einem Heterohexamer mit ATPase-Aktivität besteht (Jentsch and Rumpf, 2007).

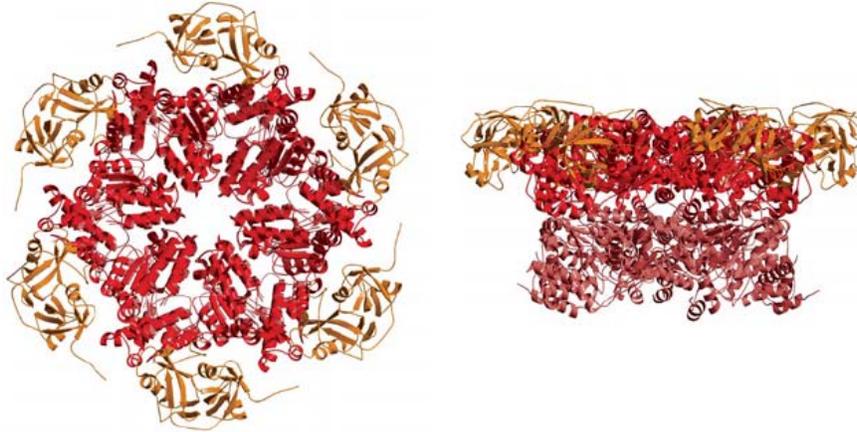


Abbildung 4: Kristallographische Darstellung eines p97-Homohexamers

Dargestellt ist die dreidimensionale Ringstruktur von p97 mit einer Pore im Zentrum. Ansicht von oben (**links**) und von der Seite (**rechts**) (entnommen aus Dreveny et al., 2004).

Jede Untereinheit des p97-Homohexamers beinhaltet eine N-terminale Domäne (N), zwei ATPase-Domänen (D1 und D2) sowie eine C-terminale Domäne (C). Die N-terminale Domäne bindet an poly-Ub-Ketten und ist somit für die Erkennung von Substraten im Rahmen der ERAD verantwortlich. Die beiden ATPase-Domänen vermitteln die Aktivität von p97 als Chaperon und sind für die Oligomerisation der einzelnen Untereinheiten verantwortlich (Abbildung 5) (Wang et al., 2003). Die C-terminale Domäne scheint an der Substratentfaltung beteiligt zu sein (Beskow et al., 2009).

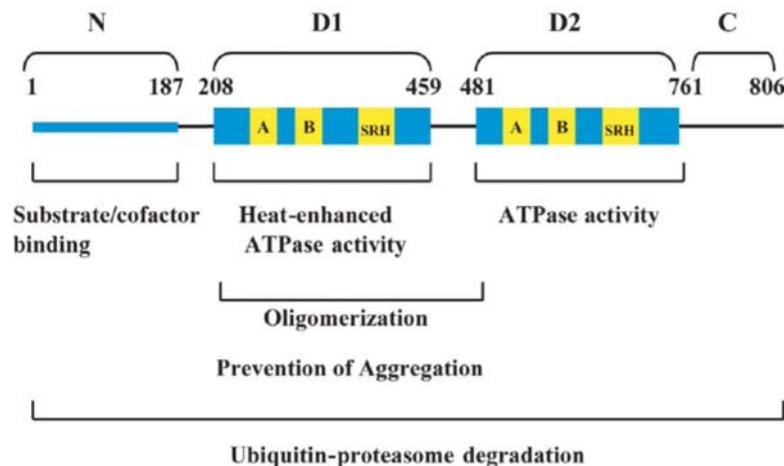


Abbildung 5: Die Funktionalität einzelner p97-Domänen

Jede AAA+-ATPase-Domäne beinhaltet ein Walker-A-Motiv (A) sowie ein Walker-B-Motiv, welche für die ATP-Bindung und Hydrolyse verantwortlich sind. Das SRH-Motiv (Second Region of Homology) liegt sowohl in D1, als auch in D2 vor (entnommen aus (Beskow et al., 2009).

1.2.2. Die Funktionen von p97 und dessen Rolle in der proteasomalen Degradierung

Das Homohexamer p97 spielt eine große Rolle bei einer Reihe intrazellulärer Aktivitäten. So ist es an Mechanismen der postmitotischen Membranfusion (Cao K., 2004), der Transkriptions- und Zellzykluskontrolle (Hitchcock et al., 2001) sowie der Apoptoseinduktion beteiligt (Yeung et al., 2008). Seine Hauptfunktion erfüllt das p97 allerdings als Chaperon im Rahmen der ERAD. Hierbei extrahiert es ubiquitinylierte Substrate aus den Lipidmembranen des Endoplasmatischen Retikulums sowie aus regulatorischen Proteinkomplexen, um diese anschließend dem 26S-Proteasom zu präsentieren (Halawani und Latterich, 2006). Neuere Studien besagen, dass p97 auch an der Entfaltung und Degradierung löslicher zytosolischer Proteine beteiligt zu sein scheint, wobei seine exakte Funktionsweise hier noch nicht ausreichend geklärt werden konnte (Beskow et al., 2009).

Als Beispiel für die Proteinextraktion aus Komplexen wird in der Literatur neben anderen der Transkriptionsfaktor NF- κ B beschrieben. In seiner inaktivierten Form liegt NF- κ B im Zytoplasma vor und bildet einen Proteinkomplex mit dem Inhibitor I κ B (1, 2). Eine Stimulierung der Zelle führt zu einer Phosphorylierung von I κ B α , welches anschließend polyubiquitinyliert werden kann. Das ubiquitinylierte I κ B α wird nun von der N-terminalen Domäne des p97 erkannt und gebunden. Dieser Schritt führt in der Folge zu einer Dissoziation des Proteinkomplexes aus NF- κ B und I κ B (Dai et al., 1998). Während das nun aktivierte NF- κ B als Dimer in den Nucleus transloziert wird, führt p97 seinen polyubiquitinylierten Bindungspartner I κ B α der proteasomalen Degradierung zu (Abbildung 6) (Dai et al., 1998).

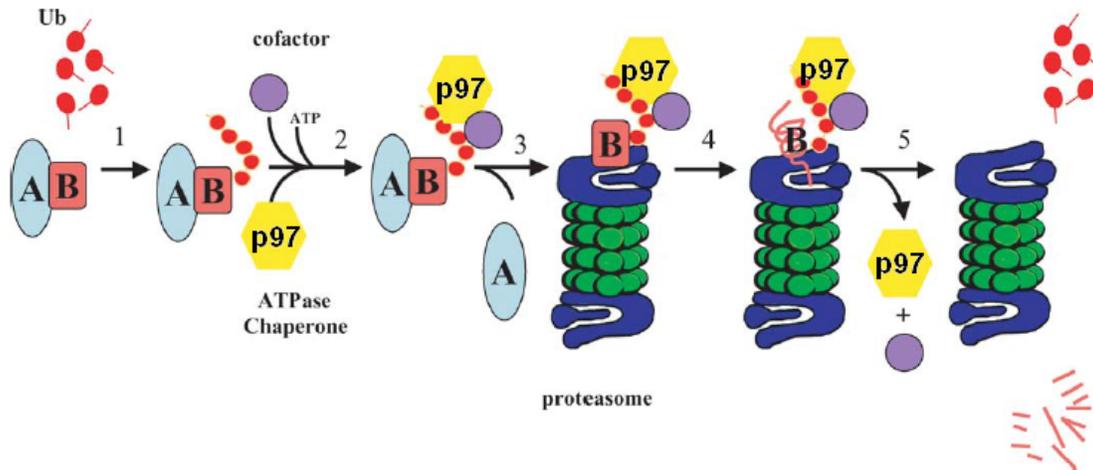


Abbildung 6: Die Rolle des Chaperons p97 im UPS

Schritt 1: Protein B, welches sich in einem Komplex mit Protein A befindet, wird ubiquitinyliert. **Schritt 2:** p97 bindet in Anwesenheit eines Kofaktors über seine N-terminale Domäne an die poly-Ub-Kette von Protein B. **Schritt 3:** p97 löst den Proteinkomplex A/B unter ATP-Hydrolyse auf und präsentiert das ubiquitinylierte Protein B dem Proteasom. **Schritte 4 und 5:** Das betroffene Protein wird deubiquitinyliert, aufgefaltet und im Proteasom degradiert (entnommen aus Wang et al., 2004).

1.2.3. p97 interagiert mit seinen Substraten über Adapterproteine

Die Fülle der Aufgaben von p97 lässt sich durch die große Anzahl seiner direkten und indirekten Interaktionspartner verdeutlichen (Abbildung 7) (Dreveny et al., 2004). Hierbei werden die zahlreichen Funktionen von p97 durch Adapterproteine moduliert, welche einen Komplex mit p97 bilden. So wird seine Beteiligung am Mechanismus der homotypischen Membranfusion im Golgi-Apparat über die Komplexbildung mit p47 vermittelt. Dabei fungiert p47 als Verbindungsstück zum Membranfusionsprotein Syntaxin V (Yuan et al., 2001; Dreveny et al., 2004; Beskow et al., 2009) und interagiert mit p97 über seine UBX-Domäne (Ubiquitin regulatory X) (Schuberth und Buchberger, 2008). UBX-Domänen verdanken ihren Namen der Homologie ihrer Aminosäuresequenz zu Ubiquitin (Hofmann und Bucher, 1996) und binden an die N-terminale Domäne von p97. Mehrere *in vitro*-Studien zeigen, dass p97 zahlreiche Interaktionspartner, darunter Ubiquitin, aber auch ohne Anwesenheit eines Adapterproteins binden kann (Thoms, S., 2002; Song, C., 2007). Allerdings scheint sein *in vivo*-Interaktionsprofil und die Funktionalität in der ERAD von Adapterproteinen abzuhängen, welche über eine UBX-Domäne verfügen (Schuberth und Buchberger,

1.3. Die Rolle des COP9-Signalosoms (CSN) und des Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktors (MIF) im UPS

1.3.1. Struktur und Funktion des CSN

Das COP9-Signalosom (Constitutive Photomorphogenesis Protein 9 Containing Complex, CSN) ist ein hochkonservierter Proteinkomplex, welcher ursprünglich als ein Suppressor licht-abhängigen Wachstums im Kreuzblütengewächs *Arabidopsis* beschrieben wurde (Wei et al., 1994; Wei und Deng 1999). Das CSN, welches u.a. die katalytische Untereinheit CSN5 beinhaltet, wurde erstmalig aus humanen Erythrozyten isoliert und stellt einen wichtigen regulatorischen Komplex im UPS dar (Seeger et al., 1998).

Das CSN wandert bei einer Gelfiltration mit einer Masse von 450 kDa (Wei und Deng, 2003) und ist aus acht heterologen Untereinheiten zusammengesetzt. Dabei richtet sich deren Nomenklatur nach ihrem Molekulargewicht, wobei die größte Untereinheit als CSN1 und die kleinste als CSN8 bezeichnet wird (Kato und Yoneda-Kato, 2009). *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass die in den Holokomplex integrierten Untereinheiten eine höhere Stabilität aufweisen, als ihre monomeren Formen. Es konnte zudem experimentell gezeigt werden, dass der Verlust einer einzigen Untereinheit zur Abnahme der Stabilität des gesamten CSN führt (Busch et al., 2007; Wei et al., 2008). CSN5 stellt hierbei eine Ausnahme dar, da es auch als Monomer stabil und biologisch aktiv bleiben kann (Wei et al., 2008).

Charakteristischerweise weisen sechs Untereinheiten des CSN eine PCI-Domäne (Proteasom, COP9-Signalosom, Initiationsfaktor 3) sowie zwei Untereinheiten eine MPN-Domäne (Mpr1-Pad1-N-terminal) auf. Beide Domänen werden ebenso in den Untereinheiten des *Lids* im regulatorischen 19S Komplex des Proteasoms gefunden (Huang et al., 2005). Jedes der acht CSN-Untereinheiten hat ein paraloges Pendant im *Lid*, so daß eine enge funktionelle Verwandtschaft dieser Komplexe angenommen wird (Glickman et al., 1998). Elektronenmikroskopische Vergleichsuntersuchungen zeigten bei beiden Komplexen eine zentrale Einkerbung sowie große Ähnlichkeiten bezüglich Form und Molekulargewicht (Wei und Deng, 2003). Zusammengenommen drängt sich damit die Hypothese auf, daß das CSN als alternatives *Lid* für das Proteasom fungieren kann (Schwechheimer und Deng, 2001; Fu et al., 2001; Mikus und Zundel, 2005).

Die Funktionen des CSN werden durch die Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten und ihrer Interaktionspartner bestimmt (Abbildung 8). So ist das CSN über seine zahlreichen Interaktionspartner an der DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Transkription, Phosphorylierung von Proteinen und der Regulierung des UPS beteiligt (Kato und Yoneda-Kato, 2009). Eine besondere Rolle spielt hierbei die Untereinheit CSN5 (auch als JAB1 bezeichnet), welche einen Großteil der CSN-Funktionen vermittelt. In der Abb. 8 sind einige Funktionen des CSN aufgelistet.

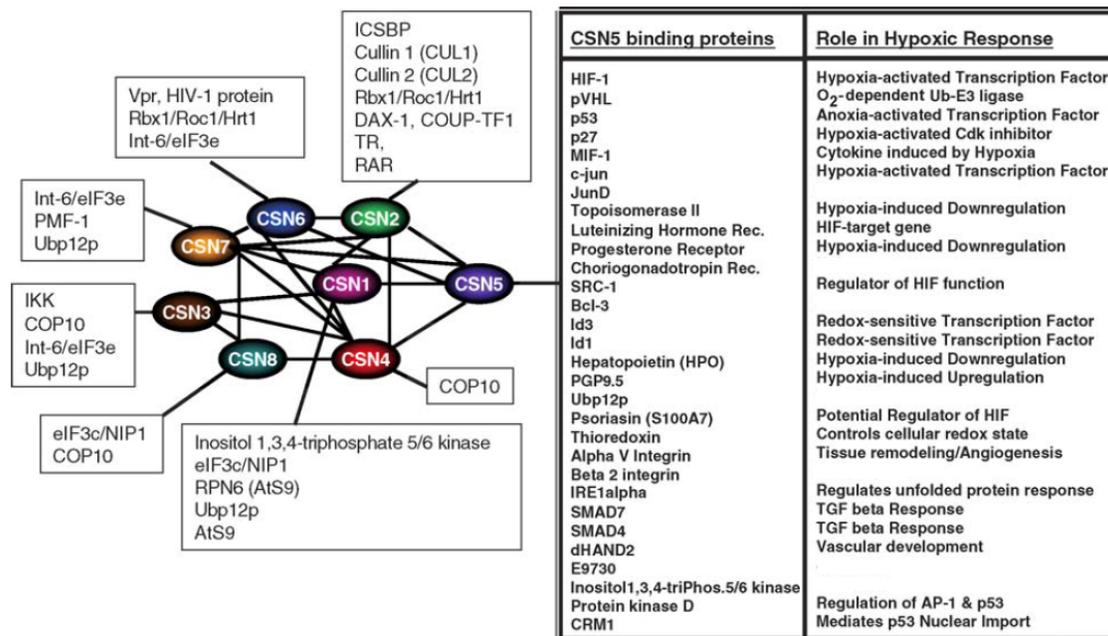


Abbildung 8: Interaktionspartner des CSN in eukaryoten Zellen.

Die Darstellung zeigt im farbigen Teil die Interaktionen der CSN-Untereinheiten untereinander sowie ihre spezifischen und individuellen Bindungspartner außerhalb des CSN. Die Interaktionspartner von CSN5 (Tabelle rechts) sind besonders zahlreich und spielen unter anderem eine Rolle bei der Regulierung der Zellantwort auf Hypoxie (Mikus und Zundel, 2005).

1.3.2. Das CSN hat eine Metalloproteaseaktivität und deneddyliert SCF E3 Ligasen

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass CSN5 eine Metalloprotease-/Isopeptidaseaktivität besitzt, die vom N-terminal gelegenen JAMM-Motiv (Jab1/MPN domain-associated metalloisopeptidase motif) ausgeübt wird (Cope und Deshaies, 2003, Ambroggio et al., 2004). Interessanterweise besitzt die zum CSN5 paraloge Untereinheit

des proteasomalen *Lids*, RPN11, ebenfalls ein ähnliches JAMM-Motiv, welches für die Deubiquitylierung von Substraten des 26S-Proteasoms sorgt (Verma et al., 2002). Beide Untereinheiten entfalten ihre Metalloprotease/Isopeptidase-Aktivität ausschließlich als Bestandteile der ihnen übergeordneten Komplexe (Cope et al., 2002; Bellare et al., 2006;), nicht aber als Monomere. Eine wichtige regulatorische Aufgabe des CSN ergibt sich aus seiner Interaktion mit SCF-E3-Ubiquitinligasen (Skp1, Cullin, F-Box), E3 Ligasen aus der CRL-Familie (Cullin-RING-Ligase-Familie), welche den letzten Schritt der Ubiquitylierung katalysieren. Ein typischer SCF-Komplex setzt sich aus einem Cullin (z.B. Cull1 oder Cull2), einem Zn²⁺-haltigen RING-Finger-Protein Rbx1, Skp1 sowie einem F-Box-Protein zusammen, welches die SCF-Substrate für die Ubiquitylierung rekrutiert (Abbildung 9, 10) (Wei und Deng, 2003). Dabei wird die Aktivität des SCF-Komplexes durch die kovalente Verknüpfung des Ubiquitin-ähnlichen Proteins Neural precursor cell expressed developmentally downregulated 8 (NEDD8) mit der Cullin Untereinheit, Neddylierung genannt, moduliert (Mikus und Zundel, 2005; Bornstein et. al., 2006). Die Neddylierung des Cullins führt zu einer Aktivierung des SCF-Komplexes in seiner Eigenschaft als E3-Ubiquitinligase. *In vitro* vermag das CSN die Aktivität des SCF-Komplexes durch Deneddylierung der Cullin-Untereinheit zu inhibieren. Allerdings scheint die Deneddylierung von Cullinen *in vivo* einen umgekehrten Effekt auf die SCF-Aktivität zu entfalten. Zunächst wurde daher angenommen, dass das Cullin-associated and neddylation dissociated protein 1 (CAND1) als Regulatorprotein an den deneddylierten SCF-Komplex bindet und zu dessen Dissoziation und Inaktivierung beiträgt (Petroski und Deshaies, 2005). Die Neddylierung des Cullins führt zur Dissoziation von CAND1 und zur erneuten Assemblierung des SCF-Komplexes und der Wiederaufnahme seiner Ubiquitinligase-Aktivität (Abbildung 9). In einem neueren Modell wird angenommen, dass das Cullin in Abwesenheit von Substraten des SCF-Komplexes einen zyklischen Adapterwechsel mithilfe des CAND1 vollzieht (CAND1-Zyklus) und erst durch die Neddylierung in den CSN-Zyklus eintritt (Schmidt et al., 2009).

1.3.3. Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor beeinflusst die Aktivität des COP9 Signalosoms

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, welches 1966 als eines der ersten proinflammatorischen T-Zell-

Zytokine beschrieben wurde (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966). Die inzwischen gut untersuchten Funktionen des 12,5 kDa MIF-Moleküls sind vielfältig und umfassen u.a. seine Rollen als funktioneller Antagonist des Tumorsuppressors p53 (Hudson et al., 1999), als Regulator des Toll-like-Rezeptors 4 (Roger et al., 2003) sowie als Chemokin bei der Migration von Leukozyten (Bernhagen et al., 2007). MIF spielt weiterhin eine wichtige Rolle in der Pathogenese zahlreicher chronisch-entzündlicher sowie onkologischer Erkrankungen, so z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis sowie beim Neuroblastom (Ren et al., 2006; Cooke et al., 2009).

Eine funktionelle Verknüpfung von MIF und CSN bzw. dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) erschien möglich, nachdem entdeckt wurde, dass MIF mit CSN5 und CSN6 direkt interagiert (Kleemann et al., 2000). Die Bindung von MIF wird dabei von den MPN-Domänen der CSN-Untereinheiten 5 und 6 vermittelt (Burger-Kentischer et al., 2005). Darüberhinaus wurde beschrieben, daß der Verlust von MIF die Chk1/Chk2-empfindlichen DNA-Schädigungskontrollpunkte vom SCF-abhängigen Abbau entscheidender Zellzyklus-regulatoren wie Cdc25A, E2F1 und DP1 entkoppelt, so daß solche Zellen genetisch instabiler werden (Nemajerova et al., 2007a). Diese Wirkungen von MIF sind von dessen Interaktion mit CSN5 abhängig.

Weitere Studien beschrieben MIF als wichtigen Regulator der Deneddylase-Funktion des CSN. In diesem Zusammenhang scheint MIF durch seine Interaktion mit CSN5 dessen Anlagerung an die SCF E3-Ubiquitinligasen zu verhindern und somit die Deneddylierung von Cullinen zu unterbrechen (Nemajerova et al., 2007b) (Abbildung 9). Hieraus wurde geschlussfolgert, dass die Interaktion von MIF mit CSN5 durch Inhibition der Deneddylase-Funktion zu einer Stabilisierung und Aktivitätszunahme des neddylierten SCF-Komplexes, aber auch zur Akkumulation seiner ubiquitinylierten Substrate kommt.

MIF wird also benötigt, um eine optimale Zusammensetzung und Funktion von SCF E3 Ligasen zu gewährleisten. In diesem Kontext wird MIF zunehmend als ein neues molekulares Ziel in der Therapie chronisch-entzündlicher und onkologischer Erkrankungen betrachtet.

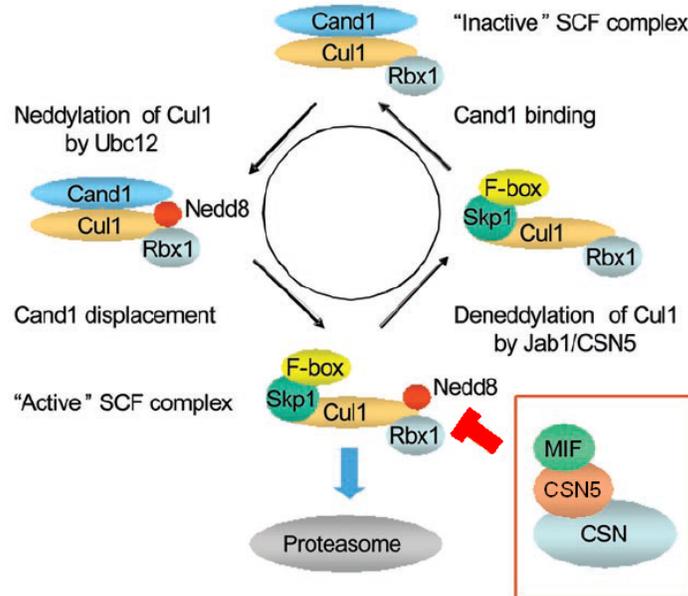


Abbildung 9: MIF reguliert die Deneddylase-Aktivität des CSN über CSN5

Eine SCF E3-Ubiquitinligase setzt sich aus einem Cullin (hier Cul1), dem *Scaffoldprotein* Skp1 und einem spezifischen F-Box-Protein zusammen. Die Deneddylierung von Cul1 erfolgt durch CSN5 im CSN. Anschließend dissoziiert der SCF-Komplex durch Bindung von Cand1 an das nicht neddylierte Cul1. MIF inhibiert die Deneddylierung von Cul1, indem es an CSN5 bindet (rote Box rechts) (nach Nemaierova et al., 2007b).

1.3.4. Das CSN reguliert die zelluläre Hypoxieantwort

Der Deneddylase-Funktion von CSN5 wird eine große Bedeutung für die Pathogenese zahlreicher inflammatorischer und onkologischer Erkrankungen beigemessen, und es gilt als wichtiges therapeutisches Zielmolekül. So wurde in CSN5-depletierten Tumorzellen des hepatozellulären Karzinoms eine Akkumulation von neddylierten Cullinen nachgewiesen, wodurch die Tumorprogression vermindert wurde (Lee et al., 2011). Interessanterweise scheint in diesem Fall auch der proteasomale Abbau von HIF-1 α an der Tumorprogression beteiligt zu sein (Miyachi et al., 2008). Dabei interagiert CSN5 sowohl mit HIF-1 α , als auch mit der HIF-1 α -spezifischen E3-Ligase pVHL (Abbildung 8) (Bemis et al., 2004). pVHL formiert über Elongin B/C einen SCF-Komplex mit Rbx1 und Cul2, dessen Aktivität vom Neddylierungsstatus von Cullin 2 abhängt. CSN5 beeinflusst als Bestandteil des COP9 Signalsoms die Aktivität von pVHL, indem es die Dissoziation des polyubiquitylierten HIF-1 α vom SCF-Komplex fördert und anschließend Cul2 deneddyliert (Abbildung 10) (Miyachi et al., 2008). Das

CSN spielt also eine wesentliche Rolle bei der Ubiquitinylierung von HIF-1 α und reguliert damit dessen proteasomalen Abbau.

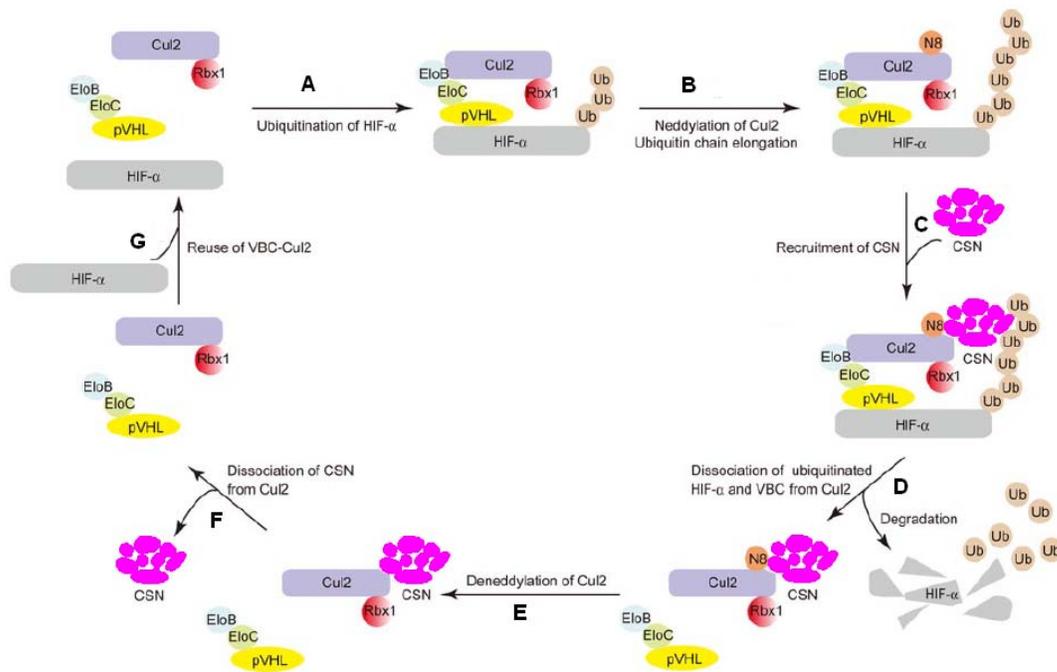


Abbildung 10: CSN-vermittelte Ubiquitinylierung und Abbau von HIF-1 α

A: Der VBC-Komplex (pVHL, Elongin B, Elongin C) bindet HIF-1 α und assoziiert mit Cul2-Rbx1 zum SCF-Komplex, welcher HIF-1 α ubiquitinyliert. **B:** Die Neddylierung von Cul2 ermöglicht die Verlängerung der poly-UB-Kette. **C:** CSN wird in den Komplex rekrutiert und bindet an das Cul2. **D:** CSN vermittelt die Dissoziation des SCF-Komplexes. Das frei gewordene HIF-1 α wird anschließend im 26S-Proteasom abgebaut. **E:** CSN deneddyliert Cul2. **F:** Schließlich löst sich das CSN wieder vom Cul2-Rbx1 Komplex. **G:** Der VBC-Komplex sowie das Cul2-Rbx1 können wiederverwendet werden. (Miyachi et al., 2008).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern des Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktors wurde erstmals die ATPase p97 als indirekter Interaktionspartner von MIF identifiziert (Cayli, 2008). Zuvor wurde bereits gezeigt, dass MIF auch mit CSN5 interagiert (Burger-Kentischer et al., 2005) und so die Deneddylase-Aktivität dieser katalytisch aktiven Untereinheit des CSN-Komplexes inhibieren kann (Nemajerova et al., 2007b). Hieraus entstand die Hypothese einer Interaktion zwischen p97 und CSN5, welche späterbestätigt werden konnte (Cayli, 2008).

Primäres Ziel dieser Arbeit war es daher, die Interaktion zwischen p97 und CSN5 näher zu untersuchen, wobei zunächst die Beteiligung des gesamten CSN-Komplexes an der Interaktion mit dem p97-Homohexamer mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden sollte. Anschließend sollten die an der Interaktion mit CSN beteiligten Domänen von p97 näher charakterisiert werden, wobei Deletionskonstrukte von p97 verwendet wurden.

Über CSN5 ist bekannt, dass es nicht nur mit MIF, sondern auch mit HIF-1 α interagiert (Bemis et al., 2004). Zudem ist etabliert, dass MIF für die maximale Stabilisierung von HIF-1 α erforderlich ist und z.B. in Pankreaskarzinomzellen für die Hypoxie-induzierte Interaktionen zwischen CSN5 und HIF-1 α benötigt wird (Winner, M. et al., 2007). MIF scheint also über das CSN Einfluß auf das Ubiquitin-Proteasom-System zu nehmen, um somit in den Abbau von HIF-1 α einzugreifen. Darüber hinaus wird ebenfalls vermutet, dass auch p97 am proteosomalen Abbau von HIF-1 α beteiligt ist und dieses hierfür über das UBXD7-Adapterprotein rekrutiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, die biologische Aufgabe von MIF im Zusammenhang mit der Interaktion zwischen p97 und CSN anhand eines Beispiels zu verstehen. MIF wurde aufgrund seiner bereits beschriebenen Rolle im UPS zum Ziel eines spezifischen Inhibitors, welcher im Tiermodell einer kollagen-induzierten Arthritis eingesetzt werden sollte. In diesem Zusammenhang sollte HIF-1 α als wichtiges Zielprotein beider Komplexe näher betrachtet werden.

2. MATERIALIEN

2.1. Chemikalien

Acrylamid 30%	Roth, Karlsruhe
d-Adenosin-5'-Triphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau-Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Brilliant-Blau G-250 Konzentrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Baktotrypton	SIFIN, Berlin
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol	Roche, Mannheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Histidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Becton Dickinson,
Heidelberg	
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
QIAzol [®] Lysereagenz	Qiagen, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trockenmilchpulver (fettfrei)	Bio-Rad, München
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Xylenecyanol FF	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNAse-OFF [™] Dekontaminationslösung	PureBiotech, USA

2.2. Enzyme

KpnI	Promega, Mannheim
Apyrase	BioLabs, New England, USA
DNase I	Roche Diagnostics,
Mannheim	

2.3. Antikörper

Primärantikörper (Wirt)	Firma	Verdünnung
Anti-CSN5 (Kaninchen)	Santa Cruz, USA	1:500
Anti-CSN1 (Kaninchen)	Biomol, Hamburg	1:1.000
Anti-p97/VCP (Maus)	ABR, USA	1:1.000
Anti-p97/VCP (Kaninchen)	Santa Cruz, USA	1:200
Anti-FLAGM2 (Maus)	Sigma, Steinheim	1:10.000
Anti-HIF-1 α (Kaninchen)	Novus Biologicals, USA	1:500
Anti-GAPDH (Kaninchen)	Cell Signaling, USA	1:1.000

Sekundärantikörper (Wirt)	Firma	Verdünnung
Anti-Kaninchen-HRP (Ziege)	ICN, Ohio, USA	1:10.000
Anti-Maus IgG (Kaninchen)	Cell Signaling, USA	1:3.000

2.4. Zelllinien

Für die Experimente in der Zellkultur wurden folgende, durch die unten genannten Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellte, Zelllinien verwendet:

NIH 3T3
(Mausfibroblasten)

(AG Eickelberg, München)

HEK 293T
(Humane Epithelial Kidney-Zellen) (AG Chakraborty, Gießen)

HeLa
(Humane Zervixkarzinom-Zellen) (AG Chakraborty, Gießen)

2.5. Proteine und CSN

His-VCP (AG Meinhardt, Gießen)
 GST-Jab1/CSN5 (AG Meinhardt, Gießen)
 CSN (AG Dubiel, Berlin)
 Aus humanen Erythrozyten
 aufgereinigt (nach Hetfeld et al.
 2005).

2.6. Kits

PureYield[®] Midiprep Plasmid Purification System Promega, Mannheim
 Kit for Molecular Weights (14-500 kDa, non-denaturing) Sigma-Aldrich, Steinheim
 RNeasy[®] Microarray Tissue Mini Kit Qiagen, Hilden
 QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit Qiagen, Hilden
 iQ SYBR[®] Green Real-Time PCR Supermix BioRad, München

2.7. Zellkulturmedien und Antibiotika

Rinderserumalbumin Invitrogen, Karlsruhe
 Dulbecco's Minimal Essential Medium PAA Laboratories, Cölbe
 Fötale Kälberserum Invitrogen, Karlsruhe
 L-Glutamin PAA Laboratories, Cölbe
 Penicillin/Streptomycin PAA Laboratories, Cölbe
 Trypsin PAA Laboratories, Cölbe
 Optimem - serumfrei Invitrogen, Karlsruhe
 Ultrasaline A PAA Laboratories, Cölbe

2.8. Geräte

Heraeus Biofuge Fresco	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Labofuge 400R	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Minizentrifuge MC 6	Sarstedt, Nümbrecht
Blaulichtransilluminator Visi-Blue	UVP, Cambridge (UK)
Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spektralphotometer	GE Healthcare, Freiburg
Wasserbad HAAKE SWB25	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank Genkingen Klasse II, BDk-S 1800	BDK, Sonnenbühl-
Mikro-Dismembrator S International	B. Braun Biotech.
Geldokumentationseinrichtung mit UV-Transilluminator Gel Jet Imager 2000	Intas, Göttingen
Easypet 4420 Pipette	Eppendorf, Hamburg
Heizblock DB-2A	Techne, Cambridge (UK)
Horizontal Minielektrophoresesystem PerfectBlue	PEQLAB, Erlangen
CO ₂ -Brutschrank CB	Binder, Tullingen
Mikrowelle	Samsung, Schwalbach
Umkehrmikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg
Inkubationsschüttler Certomat IS Melsungen	B. Braun Biotech,
Mini-Rocker-Schüttler MR-1	PEQLAB, Erlangen
Schüttelapparat 3017	GFL, Burgwedel

NuPAGE Pre-Cast Gel System	Invitrogen, Karlsruhe
SDS-Gelelektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Semi-Dry-Elektroblotter	PEQLAB, Erlangen
Wet-Elektroblotter Xcell II Module	Invitrogen, Karlsruhe
Vertikales Elektrophoresesystem PerfectBlue	PEQLAB, Erlangen
Hochgeschwindigkeitszentrifuge Sorvall RC5C	Thermo Fisher Scientific Inc. Inc. Waltham, USA
Ultrazentrifuge Sorvall Ultra Pro 80 Rotor: AH-628-SW	Thermo Fisher Scientific Inc. Inc. Waltham, USA
NanoDrop 1000 Photospektrometer	Thermo Fisher Scientific Inc. Inc. Waltham, USA

2.9. Sonstige Materialien

Protein Assay Reagenz	BioRad, München
DNA Ladder (1 kb)	Promega, Mannheim
Amersham ECL Western Blot Nachweissystem	GE Healthcare, Freiburg
Hybond ECL Nitrocellulosemembran	GE Healthcare, Freiburg
Protein Größenmarker	Serva, Heidelberg
Protease Inhibitor Cocktail P8340	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thyreoglobulin Größenmarker	Sigma-Aldrich, Steinheim
Röntgen Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg
Protein G-Sepharose 4B Fast Flow	Amersham, Freiburg
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
25 ml Serologische Pipette	Falcon, New Jersey, USA
GraphPad PRISM 3.0 Statistiksoftware	GraphPad, La Jolla, USA

2.10. Expressionskonstrukte

Folgende Wildtyp- und Deletionskonstrukte von p97/VCP wurden für die Experimente verwendet:

1. pFLAG-CMV2-VCP (Wildtyp, Mitsuo Tagaya, Tokyo University, Japan)
2. pFLAG-CMV2-N (aa 1–198) (VCP-Domäne, Dr. S. Fang, Maryland University)
3. pFLAG-CMV2-D1 (aa 199–470) (VCP-Domäne, Dr. S. Fang, Maryland University)
4. pFLAG-CMV2-D2 (aa 471–806) (VCP-Domäne, Dr. S. Fang, Maryland University)
5. pFLAG-CMV2-ND1 (aa 1–470) (VCP-Domäne, Dr. S. Fang, Maryland University)
6. pFLAG-CMV2-D1D2 (aa 199-806) (AG Meinhardt)

Für die Klonierung der Expressionskonstrukte wurde das mit einem N-terminalen FLAG-Tag versehene Plasmid pCMV2 (Sigma) als Vektor verwendet (Abbildung 11) (Ballar et. al., 2006). Das Wildtyp Konstrukt wurde von Mitsuo Tagaya beschrieben und zur Verfügung gestellt (Nagahama et al., 2003), die Deletionskonstrukte 2-5 stammen von Shengyun Fang (Ballar et al., 2006). Zur Herstellung des D1D2-Konstruktes wurde pCMV2-FLAG-VCP mit den Primern D1D2for (mit der Schnittstelle Bgl II) und D1D2rev (mit der Schnittstelle Kpn I) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit einem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt, mit Bgl II und Kpn I nachgeschnitten, erneut aufgereinigt und in den ebenfalls mit Bgl II und Kpn I geschnittenen und über ein Agarosegel gereinigten Vektor pCMV2-FLAG-D1 ligiert. Diese Klonierungsarbeiten wurden von Jörg Klug geplant und von Suada Fröhlich (beide AG Meinhardt) durchgeführt. Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen:

Primer D1D2for:

5'-GAA AGA TCT aat GAA GTA GGC TAT GAT-3'

- Die Bgl II-Schnittstelle ist unterstrichen.
- Das Codon aat kodiert für Aminosäure #199.

Primer D1D2rev:

5'-GAT GGT ACC TTA gcc ATA CAG-3'

- Die Kpn I-Schnittstelle ist unterstrichen.
- Das Codon gcc auf dem Gegenstrang kodiert für Aminosäure #806.

2.11. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten sieben Wochen alte, immature, männliche DBA1/J Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Für die *in vivo* Untersuchungen wurde Gewebe aus einem Tierversuch verwendet, welcher im Auftrag des Labors von Prof. Richard Bucala (Yale University School of Medicine, USA) mit Genehmigung der dortigen Ethikkommission durchgeführt wurden. Das vorliegende Protokoll „*Role of MIF in Arthritis*“ wurde von dem Yale Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) unter der Nummer 2009-10700 im Jahr 2009 genehmigt und ist unter iacuc@yale.edu abrufbar.

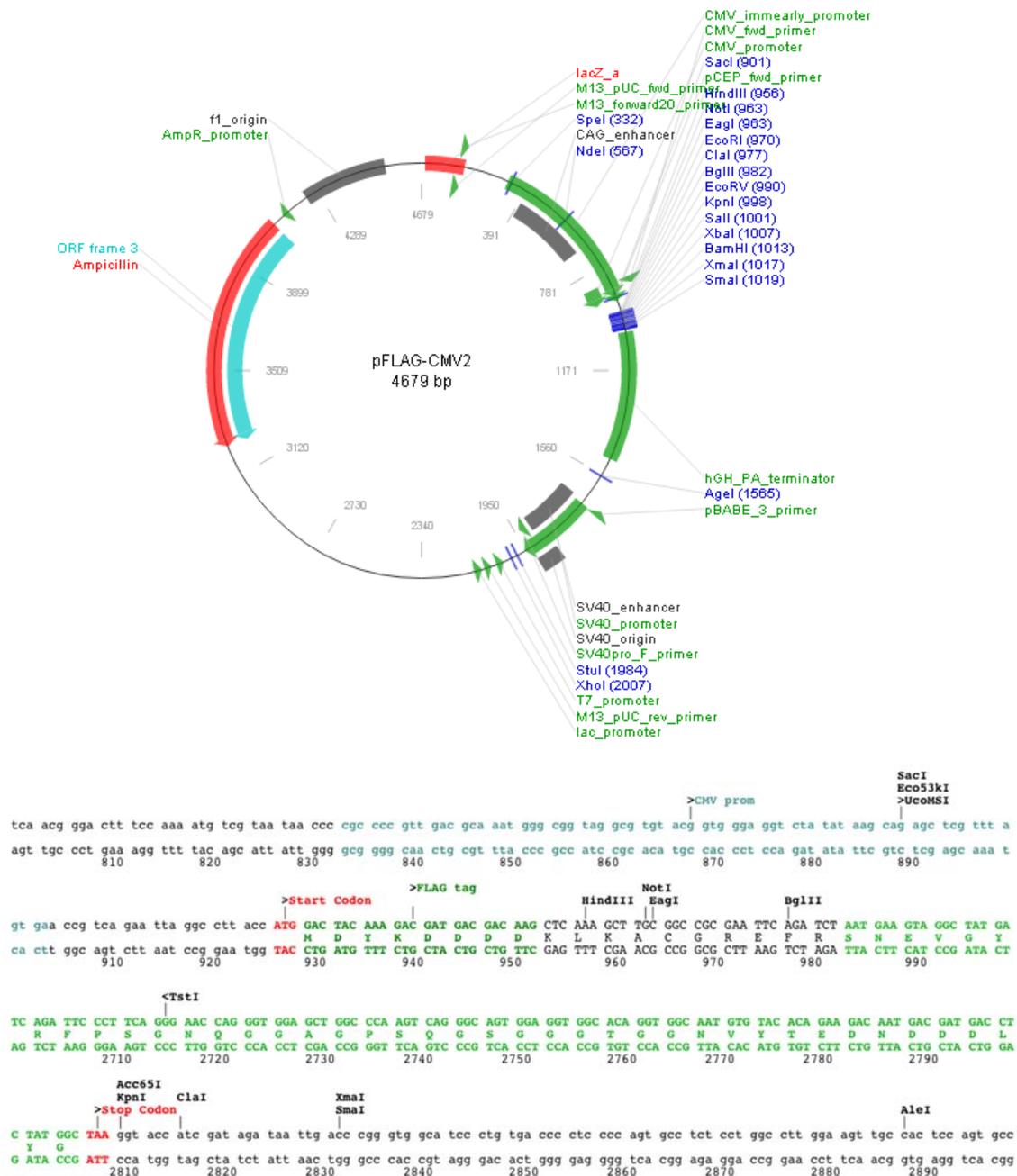


Abbildung 11: Vektorkarte pCMV2-D1D2

Dargestellt sind die Vektorkarte des pCMV2-Plasmids (**oben**) sowie Kartenausschnitte von pFLAG-CMV2-D1D2 (**unten**). Der CMV Promotor ist blau markiert, das Startcodon ATG in rot, der FLAG Tag in dunkelblau und der D1D2-Abschnitt in hellgrün hervorgehoben (nach Anderson et. al., 1989). Die Klonierungsstellen Bgl II und Kpn I sind ebenfalls eingezeichnet. Die Abbildungen wurden mit SerialCloner 2.5 erzeugt.

3. METHODEN

3.1. Techniken in der Zellkultur und im Tierexperiment

3.1.1. Zelllinien und Zellkultur

Für die Zellkultur wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin zur Bakteriostase verwendet. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Dabei betrug die maximale Konfluenz vor einer Passagierung etwa 90 %. Vor der Passagierung wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen zweimal mit einer 37°C warmen physiologischen Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurden sie für 2-3 min mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L EDTA) pro 75 cm²-Kulturflasche bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Hiernach wurde das Trypsin durch die Zugabe von 7 ml DMEM inaktiviert. Die gesamte Zellsuspension wurde dann für 10 min bei 500x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde der Zelleniederschlag in frischem Medium resuspendiert und je nach Bedarf in einem Verhältnis von bis zu 1:6 in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die Lagerung der Zellen wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 mit dem frisch zubereiteten Gefriermedium (70 % DMEM, 10 % FKS, 20 % DMSO) verdünnt. Danach wurden die Einfriergefäße in einen Einfrierbehälter (Mr. Frosty Nalgene, Thermo Scientific) für eine Stunde in einen Kühlschrank und anschließend über Nacht in einen -80°C Tiefkühlschrank gestellt, bevor sie dann in Flüssigstickstoff gelagert wurden. Um die Zellsuspension nach der Lagerung in Flüssigstickstoff aufzutauen, wurde das Einfriergefäß für 1-2 min in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten, und die Zellen wurden dann sofort in einer mediumgefüllten Zellkulturflasche ausgesät.

3.1.2. Transfektion von Zellen

Bei der Transfektion handelt es sich um eine Methode, welche es ermöglicht, Fremd-DNA (z.B. Plasmid-DNA) in eukaryote Zellen einzubringen. Man unterscheidet

hierbei eine stabile Transfektion, also den dauerhaften Einbau der Fremd-DNA in das Genom der Wirtszelle, von einer transienten Transfektion, welche das kurzzeitige Einbringen der Fremd-DNA in die Wirtszelle bedeutet. In dieser Studie wurde lediglich die transiente Transfektion mittels eines chemischen Verfahrens, der Lipofektion, durchgeführt.

Für die transiente Transfektion wurden Gewebekulturplatten in einem Format mit 6 Vertiefungen ausgewählt. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen in den Vertiefungen der Gewebekulturplatten ausgesät und in einem serum- sowie antibiotikahaltigen Medium kultiviert, bis eine Konfluenz von etwa 70-80 % erreicht worden war. Vor der Transfektion wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen und in etwa 2 ml eines antibiotikafreien Mediums pro Vertiefung inkubiert. Bei der Lipofektion wird das genetische Material mit Hilfe von Liposomen, die mit der Zytoplasmamembran der Wirtszellen verschmelzen, in das Zellinnere eingebracht. Für diesen Zweck wurden in einem Reaktionsgefäß stets 2,5 µg Plasmid-DNA mit 125 µl Optimem gemischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 2,5 µl Lipofectamin mit ebenfalls 125 µl Optimem vermischt. Beide Lösungen wurden anschließend miteinander vermischt und für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die optimale Bindung der Plasmid-DNA an die Liposomen zu erreichen. Im Anschluss daran wurde die Transfektionslösung langsam in das Medium in den Vertiefungen der Gewebekulturplatte pipettiert. Die Platte wurde vorsichtig geschwenkt, um die Transfektionslösung gleichmäßig in den Vertiefungen zu verteilen. Hiernach wurden die Zellen für 24 h bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen lysiert. Das Medium wurde dazu abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, welches hiernach gründlich abgesaugt wurde. Die Zellen wurden dann mit 200 µl RIPA-Zellysepuffer je Vertiefung bedeckt und für 15 min auf Eis gelagert. Dabei wurde kurz vor der Zellyse der Protease Inhibitor Cocktail in einer Verdünnung von 1:1.000 mit dem RIPA-Zellysepuffer vermischt, um die Aktivität der freigesetzten Proteasen im Lysat zu inhibieren. Das Zellysat wurde dann mit einem Zellschaber in den Vertiefungen der Gewebekulturplatten gesammelt, mit einer 1 ml Spritze durch eine 27G Kanüle gepresst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Zur Entfernung von Zellbruchstücken und Membranresten wurde das Zellysat bei 13.000x g für 10 min bei

einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, der geklärte Überstand aliquotiert und entweder direkt weiterverwendet oder bei –20°C gelagert.

RIPA-Zellysepuffer (1x):

Tris-HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Igepal	1 % (v/v)
Proteaseinhibitor-Cocktail	1 % (v/v)

3.1.3. Das Tiermodell einer Kollagen-induzierten Arthritis (CIA)

Die DBA1/J-Mäuse wurden für die Studie „Anti-arthritic Therapeutic and Prophylactic Efficacy of Test Compound MIF098 in a Collagen-Induced Arthritis Model in DBA/1J Mice“ (Richard Bucala, Yale Universität, New Haven, Connecticut, USA) verwendet. Nach ihrer Auslieferung an das Washington Biotechnology Institute (Guilford, Columbia, USA) wurde dort am Tag 1 bei allen Tieren eine Kollagen-induzierte Arthritis (CIA, Collagen-Induced Arthritis) durch subkutane Injektionen von Kollagen Typ II aus dem Rind ausgelöst (Cho et al., 2007). Diese Prozedur wurde am Tag 21 bei allen Tieren wiederholt, um einen Booster-Effekt zu erreichen.

Die Tiere wurden in drei experimentelle Behandlungsgruppen eingeteilt. Am Tag 28 erfolgte die erste Behandlung der Tiere. Die Mäuse aus der Behandlungsgruppe 1 wurden als Kontrollgruppe definiert und fortan täglich mit zwei intraperitonealen Injektionen von 5 ml/kg inkomplettem Freund-Adjuvans (ICFA, Sigma) behandelt. Die Mäuse aus der Gruppe 2 wurden fortan täglich mit einer intraperitonealen Injektion von 10 ml/kg einer 0,9%igen NaCl-Lösung mit 0,3 mg/ml Prednisolon (Sigma) behandelt. Die Mäuse aus der Gruppe 3 wurden täglich zwei Mal täglich mit einer intraperitonealen Injektion von in 5 ml/kg ICFA aufgelöstem MIF098, einem niedermolekularen MIF-Inhibitor, in der Dosierung von 20 mg/kg behandelt.

Am Tag 41 erfolgte die letzte Behandlung der Tiere. Am Tag 42 wurden die entzündeten Gelenke der Mäuse entnommen, in Histo-Kassetten platziert, anschließend

in Flüssig-Stickstoff schockgefroren und bei einer Temperatur von -80°C an das Labor von Richard Bucala verschickt.

3.1.4. Herstellung von Gewebelysaten

Die bei -80°C aufbewahrten Gelenkpräparate wurden in einem auf -80°C vorgekühlten Schüttelbehälter des Mikro-Dismembrators platziert und bei einer Schüttelfrequenz von 2.500 min^{-1} über 1 min homogenisiert. Das pulverisierte Gelenk wurde anschließend in $500\text{ }\mu\text{l}$ Homogenat-Lysepuffer innerhalb von 30 min bei einer Temperatur von 4°C aufgelöst. Zur Entfernung von Gewebe- und Membranresten wurden die Lysate bei $13.000\times\text{ g}$ für 10 min bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration der Proben mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Alle Proben wurden auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml Homogenat-Lysepuffer eingestellt.

Homogenat - Lysepuffer (1x):

Tris-Base pH 8,0	67,5 mM
NaCl	150 mM
Proteaseinhibitor-Cocktail	5 % (v/v)

3.2. Biochemische Methoden

3.2.1. Messung der Proteinkonzentration

Die photometrische Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) unter Verwendung einer kommerziellen Stammlösung (Protein Assay Reagenz, BioRad) und nach den Angaben des Herstellers. Zur Eichung wurden Verdünnungen von Rinderserumalbumin eingesetzt. Die Messungen erfolgten 5 min nach Ansetzen der Messlösungen bei Raumtemperatur und 595 nm .

3.2.2. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das SDS Polyacrylamid-Gel besteht aus einem Trenngel (ca. 80% der Gesamtgellänge), dem ein Sammelgel (ca. 20% der Gesamtgellänge) vorgeschaltet wird (8x9 cm, HxB). In einem polymerisierten Gel bestimmt vor allem die Konzentration des Acrylamids dessen Gittergröße. Zur Polymerisation des flüssigen Gelgemisches wurden kurz hintereinander der Radikalstarter APS und der Polymerisierungskatalysator TEMED hinzugegeben. Zuerst wurde die Trenngel-Mischung zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch zwei seitliche Abstandshalter 1 mm voneinander getrennt, in einem Plastikgestell senkrecht fixiert und nach unten abgedichtet waren. Oberhalb des Trenngels wurde zwischen den Glasplatten etwa 1 cm für das Sammelgel frei gelassen. Das Trenngel wurde mit Wasser überschichtet um den die Polymerisation inhibierenden Sauerstoff von der Geloberfläche fernzuhalten. Nach der Polymerisation wurde das Trenngel mit der Sammelgel-Mischung überschichtet, und ein Kamm zur Aussparung der Probenaschen eingesteckt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das gesamte Plastikgestell in der Elektrophorese-Kammer eingespannt. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer gefüllt und die Probenaschen mit Puffer gereinigt.

Die Proben wurden zuvor mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei einer Temperatur von 95°C denaturiert und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde für etwa 1 h bei einer konstanten Spannung von 18 V/cm Gellänge durchgeführt. Für die Elektrophorese von Proben aus Immunpräzipitationsexperimenten wurden NuPAGE Fertiggele benutzt, bei welchen durch einen 4-12 %igen Polyacrylamid-Gradienten, im Vergleich mit einem herkömmlichen Gel, ein bessere Auftrennung erreicht werden kann. Dabei wurde ein MES-Puffer als Elektrophoresepuffer eingesetzt. Die Elektrophorese dauerte hier etwa 1,5 h bei einer konstanten Spannung von 150 V.

Trenngel (12,5 % Acrylamid):

1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS-Lösung (w/v)	100 µl
30 % Acrylamid - Bisacrylamid-Lösung – (37,5:1)	4,17 ml
Destilliertes Wasser	3,17 ml
10 % APS (w/v)	50 µl
TEMED	5 µl
Gesamtvolumen	10 ml

Sammelgel (4 % Acrylamid):

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
10 % SDS-Lösung (w/v)	50 µl
30 % Acrylamid - Bisacrylamid-Lösung – (37,5:1)	0,65 ml
Destilliertes Wasser	3,00 ml
10 % APS (w/v)	25 µl
TEMED	5 µl
Gesamtvolumen	5 ml

Elektrophoresepuffer (10x):

Glycin	192 mM
Tris	25 mM
SDS-Lösung	0,1 % (w/v)

SDS-Probenpuffer (5x):

Tris-HCl pH 6,8	250 mM
SDS	10 % (w/v)
Glycerin	50 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,5 % (v/v)

MES-Elektrophoresepuffer (20x):

MES	1 M
Tris-HCl pH 7,3	1 M
SDS-Lösung	2 % (w/v)
EDTA	20 mM

3.2.3. Protein-Bindungsassay:

Für den *in vitro*-Protein-Bindungsassay dienten in dieser Studie zur Analyse einer Interaktion zwischen zwei ultragroßen Proteinkomplexen folgende Ansätze:

Bindungspuffer (5x):

Tris-HCl pH 7,2	210 mM
Glycerol (w/v)	30 % (w/v)
dATP	5 mM
MgCl ₂	5 mM

Protein Bindungsassay-Probenpuffer (2x):

Tris-HCl pH 7,2	100 mM
Glycerol	10 % (w/v)
Coomassie Blue G-250	0,5 % (w/v)
KCl	150 mM

3.2.4. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Blue Native- und Agarose-Kompositgele)

Die Analyse von physiologisch intakten, oligomeren Proteinstrukturen in einem Polyacrylamid-Gel schließt die Verwendung von denaturierenden oder reduzierenden Reagenzien wie z.B. SDS oder DTT aus. Da ein Verzicht auf SDS zur Folge hat, dass Proteine während der Elektrophorese unterschiedlich geladen sein können, wurden Blue Native Gele eingesetzt (Niepmann, 2006; Schägger und Jagow, 2006), bei welchen das nicht denaturierende Coomassie Brilliant-Blue G-250, welches sowohl dem Proben- wie dem Kathodenpuffer beigemischt wird, das SDS ersetzt. Auf diese Weise wird ebenfalls eine Auftrennung der Proteine nach Molmasse erreicht. Es wurden kontinuierliche Gradientengele ohne Sammelgel eingesetzt mit denen auch Proteine und Proteinkomplexe mit sehr unterschiedlicher Molmassen (> 300 kDa) aufgetrennt werden konnten. Für den Polyacrylamid-Konzentrationsgradienten wurden zwei Trenngel-Mischungen angesetzt. Die „leichte“ Mischung A enthielt 4 % Acrylamid während die „schwere“ Mischung B 18 % Acrylamid beinhaltete. Für die Herstellung eines 4-18 %igen Gradienten wurde eine weitporige serologische Pipette verwendet. Nach der Hinzugabe von APS und TEMED in beide Mischungen wurden zuerst 3 ml der leichten Mischung A in die Pipette gesogen. Danach wurden 3 ml der schweren Mischung B vorsichtig in die Pipette gesogen, so dass eine scharfe Dichtegrenze zwischen beiden Lösungen sichtbar wurde. Daraufhin wurden vorsichtig 2-3 Luftblasen durch die Pipette hochgezogen, wodurch die beiden Mischungen miteinander vermischt wurden und ein Acrylamid-Konzentrationsgradient entstand. Nun wurde das Gemisch zügig zwischen zwei Glasplatten gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Probenaschen eingesteckt. Nach der Polymerisation des Gradientengels wurde der Kamm entfernt und das gesamte Plastikgestell in die Elektrophoresekammer eingespannt. Das Innenreservoir der Elektrophoresekammer wurde mit dem farbstoffhaltigen Elektrophorese-Kathodenpuffer A gefüllt, während das Außenreservoir mit dem Elektrophorese-Anodenpuffer gefüllt wurde.

Für die Blue Native PAGE wurden die Proteinproben 1:1 mit Nativem Probenpuffer verdünnt und für 30 min inkubiert bevor sie ohne Hitzedenaturierung in die gespülten Probenaschen geladen wurden. Die Elektrophorese wurde über etwa 16 h bei einer konstanten Spannung von 15 V/cm Gellänge durchgeführt. Nach etwa einem Drittel der Laufzeit wurde der Kathodenpuffer A durch den Kathodenpuffer B ersetzt,

um den nicht gebundenen Farbstoff Coomassie Blue G-250 aus dem Gel zu entfernen. Da die Elektrophorese unter diesen Bedingungen eine große Wärmeentwicklung mit sich brachte, wurde sie bei einer Temperatur von 4°C im Kühlraum durchgeführt.

Proteinkomplexe mit einer Masse von etwa 1 MDa konnten in einem 4-18 %igen Polyacrylamid-Gradientengel nicht mehr aufgelöst werden. Um derart große Makromoleküle auftrennen zu können, wurde versuchsweise die Acrylamid-Konzentration der leichten Mischung A auf 2 % reduziert. Diese Gele polymerisierten jedoch nur unzureichend und waren in der Handhabung schwierig. Stattdessen wurden dann Agarose-Acrylamid-Komposit- Gradientengele eingesetzt, die bereits bei Untersuchungen der RNA-Polymerase II verwendet worden waren (Suh et al., 2005) und in denen der Agaroseanteil den nur 2%igen Polyacrylamidanteil in der Leichten Mischung stabilisiert. Für die Herstellung eines solchen Gels wurde die Leichte Mischung A in zwei Teilen angesetzt. Zunächst wurde eine 1%ige Agaroselösung in einem 100 ml Erlenmeyerkolben angesetzt und in einem Wasserbad bei 45°C gelagert (Teil A). Teil B war eine Leichte Mischung mit einem 2%igen Acrylamidanteil der bereits APS zugesetzt war und die ebenfalls in einem Erlenmeyerkolben auf 45°C gebracht wurde. Danach wurden beide Lösungen vereinigt, durch leichtes Schütteln gut durchmischt und 1-2 min bei 45°C im Wasserbad gelagert. Anschließend wurden TEMED und Schwere Mischung B hinzugegeben. Nachdem das Gel gegossen war, wurde es noch für etwa 15 min bei 4°C gelagert, um ein vollständiges Gelatinieren der Agarose zu ermöglichen. Danach wurde das Gel für 1 h bei Raumtemperatur gelagert, um eine möglichst vollständige Polymerisation des Acrylamids zu erreichen. Die Elektrophoresebedingungen waren die gleichen wie bei der herkömmlichen Blue Native Gelelektrophorese.

Leichte Mischung A (4 % Acrylamid):

1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
30 % Acrylamid – Bisacrylamid-Lösung – (37,5:1)	1,33 ml
Destilliertes Wasser	6,12 ml
10 % APS (w/v)	50 µl
TEMED	5 µl
Gesamtvolumen	10 ml

Leichte Mischung A (2 % Acrylamid-Komposit):**Teil A**

1 % Agaroselösung (w/v) (aq)	5 ml
------------------------------	------

Teil B

1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
30 % Acrylamid – Bisacrylamid-Lösung – (37,5:1)	0,65 ml
Destilliertes Wasser	1,8 ml
10 % APS (w/v)	50 µl
TEMED	5 µl
Gesamtvolumen	10 ml

Schwere Mischung B (18 % Acrylamid):

1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
30 % Acrylamid – Bisacrylamid-Lösung – (37,5:1)	6 ml
Destilliertes Wasser	1,45 ml
10 % APS (w/v)	50 µl
TEMED	5 µl
Gesamtvolumen	10 ml

Elektrophorese-Kathodenpuffer A (1x):

Glycin	192 mM
Tris	25 mM
Coomassie Blue G-250	0,002 % (w/v)

Elektrophorese-Kathodenpuffer B (1x):

Glycin	192 mM
Tris	25 mM

Elektrophorese-Anodenpuffer (10x):

Tris-HCl pH 8.8	1 M
-----------------	-----

Nativer Probenpuffer (2x):

Tris-HCl pH 8,0	100 mM
Glycerin	40 % (w/v)
Coomassie Blue G-250	0,5 % (w/v)

3.2.5. Western Blotting

Im Western Blot werden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-, Polyvinylidenfluorid- oder Nylonmembran übertragen, um anschließend ein oder mehrere Proteine mittels Antikörperreaktionen auf der Membran spezifisch nachzuweisen. Der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die hier verwendete Nitrocellulosemembran erfolgte mittels semi-dry Blotting. Dabei werden Polyacrylamid-Gel und Membran sandwichartig von mit Puffern getränkten Filterpapieren eingerahmt. Der genaue Aufbau war wie folgt:

KATHODE

- 4 Lagen Filterpapier, mit Kathodenpuffer imprägniert
- Trenngel, in Kathodenpuffer gewaschen
- Nitrocellulosemembran, in Anodenpuffer angefeuchtet
- 4 Lagen Filterpapier, mit Anodenpuffer imprägniert
- 4 Lagen Filterpapier, mit konzentriertem Anodenpuffer imprägniert

ANODE

Kathode und Anode sind flächenhafte Elektroden aus Edelstahl zwischen denen für 1 h ein konstanter Strom von 2,5 mA/cm² Gelfläche angelegt wurde. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Blotten für 2 min mit

dem roten Azofarbstoff Ponceau S gefärbt, welcher die positiv geladenen Aminogruppen von Proteinen reversibel bindet und mit PBS-Tween leicht ausgewaschen werden kann. Nach dem Auswaschen des Farbstoffs wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen in Blockingreagenz auf Trockenmilchbasis auf einem Schüttler für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in das Blockingreagenz gegeben und die Membran über Nacht bei 4°C weiter inkubiert. Die Membran wurde dreimal für jeweils 5-10 min mit PBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem im Blockingreagenz gelösten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal mit PBS-Tween gewaschen, bevor sie zwecks Visualisierung der Immunkomplexe unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung für 60 sec mit einer frisch zubereiteten ECL-Lösung (1 ml ECL-Lösung A, 100 µl ECL-Lösung B, 0,3 µl ECL-Lösung C) überschichtet wurde. Die mit ECL-Lösung getränkte Membran wurde zwischen zwei Folien gelegt und mit einem Röntgenfilm für die Dauer von 1-20 min in einer Kassette exponiert, der anschließend entwickelt und fixiert wurde.

Um die in einer Blue Native PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurde das Wetblot-Verfahren verwendet, das besser als der Semi-Dry Blot für den Transfer von sehr großen, nativen Proteinkomplexen geeignet ist. Das native Polyacrylamid-Gel und die Membran werden dabei von mehreren Lagen Filterpapier und zwei Matten auf jeder Seite sandwichartig eingerahmt. Diese Anordnung wird dann in eine Kompressionskassette eingespannt, welche anschließend in einen mit Transferpuffer gefüllten Tank zwischen zwei vertikalen Elektroden positioniert wird. Der genaue Aufbau war wie folgt:

KATHODE

- 2 Matten, im Transferpuffer imprägniert
- 3 Lagen Filterpapier, im Transferpuffer imprägniert
- Natives Gel, im Transferpuffer gewaschen
- Nitrocellulosemembran, in Transferpuffer angefeuchtet
- 3 Lagen Filterpapier, im Transferpuffer imprägniert
- 2 Matten, im Transferpuffer imprägniert

ANODE

Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V für 1 h bei Raumtemperatur. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem oben beschriebenen Protokoll.

Wenn die Detektion mit mehreren Antikörpern nacheinander erfolgen sollte, wurde die Membran vor der Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper zunächst gestrippt. Dazu wurde die Membran dreimal für jeweils 5-10 min mit PBS-Tween gewaschen und dann für 2 min bei einer Temperatur von 60°C in Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal für jeweils 5-10 min mit PBS-Tween gewaschen, bevor für 1 h in Blockingreagenz bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Der Stripping-Erfolg wurde mit dem zuletzt benutzten Sekundärantikörper kontrolliert.

Kathodenpuffer:

6-Aminohexansäure	40 mM
Tris-HCl pH 9,4	25 mM
Methanol	20 % (v/v)

Anodenpuffer:

Tris-HCl pH 10,4	30 mM
Methanol	20 % (v/v)

Konzentrierter Anodenpuffer:

Tris-HCl pH 10,4	300 mM
Methanol	20 % (v/v)

Ponceau S-Lösung:

Ponceau S	0,2 % (w/v)
Trichloressigsäure	3 % (w/v)

PBS-Tween

NaCl	138 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄	1,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Tween	0,1 % (v/v)

Blockingreagenz:

NaCl	138 mM
KCl	2,7 mM
NaH ₂ PO ₄	1,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Tween	0,1 % (v/v)
Trockenmilchpulver	5 % (w/v)

ECL-Lösung:**ECL-Lösung A** (bei 4°C gelagert)

Luminol	50 mg
Tris-HCl pH 8,6 – 100 mM	200 ml
Gesamtvolumen	200 ml

ECL-Lösung B (bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert)

para-Hydroxycoumarinsäure	11 mg
DMSO	10 ml
Gesamtvolumen	200 ml

ECL-Lösung C (bei 4°C im Dunkeln gelagert)

H ₂ O ₂	35 % (v/v)
-------------------------------	------------

Transferpuffer:

Tris	2,5 g
Glycin	12,25 g
Methanol	50 ml
Destilliertes Wasser	950 ml
Gesamtvolumen	1 L

Stripping-Puffer:

Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
SDS	2 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	100 mM

3.2.6. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine können mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant-Blue G-250 unspezifisch angefärbt werden. Hierfür wurde das Gel direkt nach der Elektrophorese für 1 h bei Raumtemperatur mit Fixierlösung inkubiert um die Proteine zu fixieren. Danach wurde das Gel über Nacht mit der Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert und am nächsten Tag solange mit der Waschlösung entfärbt, bis ein hintergrundfreies, gut dokumentierbares Ergebnis erreicht worden war.

Fixierlösung:

Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	50 % (v/v)

Färbelösung:

Coomassie Blue G-250	0,1 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)

Waschlösung:

Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	50 % (v/v)

3.2.7. Ko-Immunopräzipitation

Die Ko-Immunopräzipitation ist eine für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen verwendete Methode, mit der Zielproteine durch den Einsatz eines spezifischen Antikörpers aus einer Lösung aufkonzentriert werden können. Vorab wird der Antikörper *in vitro* an einen festen Träger gekoppelt und anschließend mit einem Proteingemisch, z.B. mit einem Zelllysats, inkubiert. Der Antikörper bindet an sein spezifisches Antigen, welches so gemeinsam mit Interaktionspartnern an die Matrix gebunden wird, um anschließend in einem Western Blot analysiert werden zu können. In dieser Studie wurden mit Protein G gekoppelte Sepharose-Beads als Matrix verwendet. Protein G ist ein bakterielles Zellwandprotein, welches durch seine hohe Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen viele Antikörper zu immobilisieren vermag. Für diesen Zweck wurden 30-40 µl einer Protein G-Sepharose Beads-haltigen Suspension dreimal mit PBS gewaschen und bei einer Temperatur von 4°C für die Dauer von 3 h mit 1-2 µg des in 1 ml PBS resuspendierten Antikörpers auf einem Schüttler mit Drehscheibe bei etwa 10-15 rpm inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein

frisches Zelllysate hergestellt. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurden die Sepharose-Beads erneut drei mal für je 5-10 min mit PBS gewaschen und bei einer Temperatur von 4°C für mindestens 3 h auf dem Schüttler mit Drehscheibe bei etwa 10-15 rpm mit dem geklärten Zelllysate inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Beads einmal mit dem RIPA-Zelllysepuffer sowie zweimal mit kaltem PBS gewaschen, welches anschließend möglichst vollständig abgenommen wurde. Daraufhin wurden die Sepharose-Beads in einem Volumen von 25 µl SDS-Probenpuffer (3x) resuspendiert und für 10 min auf 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben für 30 sec bei 500 rpm zentrifugiert und der Überstand für die SDS-PAGE verwendet.

3.2.8. Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation

Mit der Glycerin-Dichtegradientenzentrifugation können intrazelluläre Bestandteile unterschiedlicher Dichte aufgetrennt werden. Dazu wurden zunächst zwei glycerinhaltige Trennlösungen angesetzt, die schwere Trennlösung A mit 40 % Glycerin sowie die leichte Trennlösung B mit 10 % Glycerin. Für die Ultrazentrifugation wurden zuerst 7 ml der schweren Lösung A in ein Zentrifugationsröhrchen mit einem Volumen von 15 ml pipettiert und vorsichtig mit 7 ml der leichten Lösung B überschichtet. Anschließend wurde 1 ml des im RIPA-Lysepuffer aufgenommenen Zelllysates auf die Oberfläche der oberen leichten Lösung B pipettiert. Aufbau des Gradienten und die Trennung von Organellen und Proteinkomplexen erfolgten dann durch Zentrifugation über 22 h bei 27.000 rpm und 4°C in einem AH-628 Ausschwingrotor. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Dichtegradient schichtweise durch Abnahme von Proben mit dem Gesamtvolumen von jeweils 1 ml fraktioniert. Damit die relativ geringe Proteinmenge einer Fraktion in einem kleinen Volumen konzentriert werden konnte, wurden die Proteinproben mit Aceton präzipitiert. Dazu wurden 300 µl aus jeder Fraktion entnommen und mit 1,2 ml Aceton in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei einer Temperatur von -20°C gelagert und am nächsten Tag für 30 min bei 13.000x g und 4°C zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurden die gefällten Proteine in 25 µl SDS-Probenpuffer (1x) aufgenommen.

Schwere Lösung A:

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NaCl	120 mM
EDTA	1 mM
β -Mercaptoethanol	1 mM
Glycerol	40 % (v/v)

Leichte Lösung B:

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
NaCl	120 mM
EDTA	1 mM
β -Mercaptoethanol	1 mM
Glycerol	10 % (v/v)

3.3. Molekularbiologische Methoden**3.3.1. Plasmidpräparation**

Für die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen wurden größere Mengen von Plasmid-DNA benötigt. Alle Plasmide wurden zunächst in *E. coli* DH5 α transformiert und amplifiziert. Dazu wurde eine zuvor transformierte Bakterienkolonie mit einer Impföse von der Agar-Platte abgenommen und in 200 ml SOB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin gegeben. Die Kultur wurde bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien abzentrifugiert, und die Plasmide unter Verwendung des PureYield™ Plasmid Midiprep Systems nach Herstellerangaben isoliert. Nach der Isolation wurde die DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Vor der Transfektion in eukaryotische Zellen wurden alle Plasmide mittels Linearisierung durch Restriktion kontrolliert. Das Ergebnis wurde mittels einer DNA-Agarosegelelektrophorese überprüft.

SOB-Medium (nach Hanahan):

Baktotrypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl 1 M	2,5 ml
Gesamtvolumen	1 L

* Nach dem Autoklavieren des Mediums wurden 10 ml einer 1 M MgCl₂-Lösung hinzugefügt

3.3.2. DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Molekülen in Abhängigkeit von ihrer Größe. Dabei bildet die in TAE-Puffer aufgelöste Agarose nach der Polymerisation eine Gelmatrix, in welcher die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode wandern. Für die Analyse der isolierten Plasmid-DNA wurden 1 %ige Agarosegele hergestellt, indem die zuvor abgewogene Agarose durch Aufkochen im Mikrowellenherd in TAE-Puffer aufgelöst und in eine Gelform gegossen wurde, um dort über die Dauer von etwa 30 min bei Raumtemperatur zu gelieren. Der aufgekochten Agarose-Lösung wurden nach erster Abkühlung 0,01 % einer Ethidiumbromidstammlösung (5 mg/ml H₂O) zugegeben. Der rotorangene Phenanthridin-Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare von doppelsträngigen Nukleinsäuren und fluoresziert dann im ultravioletten Licht. Das Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gelegt. Anschließend wurden die zuvor mit dem DNA-Probenpuffer versetzten Proben in die Geltaschen geladen. Als Größenmarker wurde die 1kb DNA-Ladder verwendet. Die Elektrophorese dauerte etwa 1 h bei einer konstanten Spannung von 2-4 V/cm Gellänge. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator angeschaut und dokumentiert.

TAE-Puffer (50x):

Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
Gesamtvolumen	1 L

DNA-Probenpuffer (10x):

Bromphenol Blau	0,025 %
Xylenecyanol FF	0,025 %
Glycerol	30 %

3.3.3. Isolierung der RNA aus dem Gelenkgewebe

Das ubiquitäre Auftreten von RNasen erfordert im Umgang mit RNA-haltigen Proben besondere Vorkehrungen. Sämtliche Arbeitsflächen und Geräte wurden mit einer RNase-Dekontaminationslösung gereinigt. Im weiteren Verlauf wurde mit sterilen, autoklavierten Einmalwaren bzw. hitzesterilisierten Glaswaren gearbeitet. Während des Arbeitens wurden RNase-dekontaminierte Handschuhe getragen.

Die bei -80°C aufbewahrten Gelenkpräparate wurden in den vorgekühlten, RNase-dekontaminierten Schüttelbehälter des Mikro-Dismembrators (Braun) gegeben und bei einer Schüttelfrequenz von 2.500 min^{-1} über 1 min zermahlen. Das Pulver wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml QIAzol[®] Lysereagenz durch mehrfaches auf- und abpipettieren durchmischt und über 5 Minuten Inkubation bei RT aufgelöst. Als nächstes wurden 200 μl Chloroform Eppendorf hinzugegeben und die Probe durch sanftes Schütteln gut durchmischt. Nach 3 min Inkubation bei RT wurden die Proben bei $13.000\times g$ für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten drei Phasen unterschieden werden: eine untere rötliche Phase mit genomischer DNA, eine mittlere Phase mit Protein sowie eine obere wässrige Phase mit der gesamten RNA. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in einem Volumenverhältnis von 1 : 1 mit 70%igem Ethanol vermischt. Die Proben wurden auf RNeasy[®]-Mini-Säulen aufgetragen und die RNA durch Kurzzentrifugation bei $13.000\times g$ und RT auf der Säulenmatrix immobilisiert. Die immobilisierte RNA wurde nach drei Waschschritten (s. Herstellerangaben) von der Matrix eluiert und in 50 μl RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentrationen wurden spektrophotometrisch (NanoDrop 1000 Spektrophotometer, ThermoScientific, USA) bestimmt, und die Proben bei -80°C gelagert.

Für eine anschließende RT-PCR wurden DNA-Verunreinigungen mit Hilfe des DNase-haltigen QuantiTect[®] DNA-Wipeout-Puffers entfernt. Dazu wurden 1 μg RNA zu 2 μl Wipeout-Puffer in einem Gesamtvolumen von 14 μl RNase-freiem Wasser gelöst und für 5 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt für die RT-PCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

3.3.4. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist eine Reaktion, bei welcher isolierte RNA in cDNA umgeschrieben wird. Hierbei wird das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, um zu der RNA komplementäre DNA-Stränge (cDNA) herzustellen, welche dann als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet werden kann. Damit kann die Expression eines Gens auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden. Für den RT-PCR-Ansatz wurde das QuantiTect® Reverse Transcription-Kit und -Protokoll verwendet. Dabei wurde 1 µg der RNA-Probe mit einem Mastermix versetzt, der die Reverse Transkriptase, einen dNTP-Mix sowie einen Primer-Mix enthält. Zur cDNA-Synthese wurde der Ansatz 15 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 95°C für 2 min inaktiviert. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.3.5. Verwendete Oligonukleotid-Primer für die Real-Time-PCR

Die verwendeten Sequenzen der Oligonukleotid-Primer (Spezies Maus) wurde mithilfe des Programms Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) ermittelt. Anschließend wurden sie auf ihre Sequenzspezifität überprüft und über die W.M. Keck Facility (Biotechnology Resource Laboratory, Yale, New Haven, CT., USA) bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden in Reinstwasser aufgenommen (100 pmol/µl) und bei -20°C gelagert.

Gen	Primer-Sequenz	Fragmentgröße	Annealing Temp.
HIF-1α	FW: 5' - AAG AAA CCG CCT ATG ACG TG - 3' RV: 5' - CCA CCT CTT TTT GCA AGC AT - 3'	302 bp	52°C
VEGF A	FW: 5' - GAG ACC CTG GTG GAC ATC - 3' RV: 5' - TTT CTT TGG TCT GCA TTC - 3'	237 bp	51°C
β-Actin	FW: 5' - ATA TCG CTG CGC TGG TCG TC - 3' RV: 5' - AGG ATG GCG TGA GGG AGA GC - 3'	517 bp	57°C

3.3.6. PCR und Real-Time-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifizierung eines DNA-Abschnitts bekannter Sequenz. Der Vorgang der Amplifizierung verläuft polyzyklisch. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierung der DNA-Matrize, gefolgt von der Anlagerung der Primer (= Annealing) und der anschließenden Verlängerung der angelagerten Primer in 3'-Richtung (= Elongation).

Die Real-Time-PCR ist eine Methode zur quantitativen Expressions-Analyse von Genen, welche auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR basiert. Die Quantifizierung von Genen wird durch Fluoreszenz-Messungen ermöglicht, die während der Amplifikation durchgeführt werden. Die Fluoreszenzintensität nimmt dabei proportional zur Menge der amplifizierten DNA zu und erlaubt so einen Rückschluss auf die Quantität der Ziel-DNA solange die Amplifikation spezifisch erfolgt. Gemessen wurde die Fluoreszenz von freiem und an die DNA gebundenem SYBR-Green, einem Cyanin-Farbstoff. Während der Elongation bindet SYBR-Green in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA, wodurch die Intensität der Gesamtfluoreszenz ansteigt. Die Fluoreszenz wird jeweils am Ende eines PCR- Zyklus gemessen, um den Mengenzuwachs an amplifizierter DNA gegenüber dem Vorzyklus zu bestimmen. Je mehr cDNA in der Probe vorliegt, desto weniger Zyklen werden benötigt, um eine statistisch signifikante Intensitätserhöhung des Fluoreszenzsignals gegenüber dem Hintergrund zu erreichen. Dieser Zyklus wird als Amplifikations-Schwellenwert C_t bezeichnet (Gibson et al., 1996; Freeman et al., 1999). Für die Ablesung dieser Schwellenwerte wurden durch das verwendete Real-Time PCR System (iCycler, Biorad) spezifische Kurven der einzelnen PCR-Produkte erstellt. Dabei kann durch den Vergleich der C_t -Werte eine Aussage über die in den Proben vorhandene Ausgangsmenge der Matrizen-DNA gemacht werden. Zur Überprüfung der Amplifikationsspezifität werden durch den iCycler zum Ende eines jeden PCR-Laufes spezifische Schmelzkurven erstellt. Die parallele Dokumentation der zur steigenden Temperatur (ΔT) umgekehrt proportional sinkenden Fluoreszenz (ΔF) durch die Aufschmelzung der erzeugten doppelsträngigen PCR-Fragmente ergibt im Idealfall einen einzigen Maximalwert $-\Delta F/\Delta T$. Für die Eliminierung von Ungenauigkeiten beim Pipettieren wurde für jede Probe eine Verdünnungsreihe gemessen.

Real-Time-PCR-Ansatz

iQ SYBR® Green Real-Time PCR Supermix (2x)	12,5 µl
Forward Primer (100 pmol/µl)	0,6 µl
Revers Primer (100 pmol/µl)	0,6 µl
cDNA-Vorlage	1 µl
Millipore-Wasser ad	10,3 µl
Gesamtvolumen	25 l

4. ERGEBNISSE

4.1. Untersuchung der Interaktion zwischen p97 und CSN

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die regulatorische Untereinheit CSN5 ihre Deneddylase-Aktivität ausschließlich als Bestandteil des CSN-Komplexes, nicht aber als Monomer entfalten kann (Cope et al., 2002; Bellare et al., 2006). Dabei besteht der etwa 450 kDa große CSN-Komplex aus acht heterologen Untereinheiten (CSN1-CSN8) (Kato und Yoneda-Kato, 2009). Nach dem die Proteininteraktion zwischen p97 und CSN5 (Dissertation Sevil Cayli, 2009) publiziert wurde, stellte sich die Frage nach der Beteiligung des gesamten CSN-Komplexes sowie des p97-Homohexamers an dieser Interaktion.

4.1.1. p97 interagiert *in vivo* mit dem gesamten CSN-Komplex

Zunächst wurde die Beteiligung des gesamten CSN-Komplexes an der Interaktion mit p97 untersucht. Hierfür wurden Proteinextrakte aus lysierten HEK293T-Zellen verwendet. Diese wurden mit einem 10-40%igen Glycerol-Dichtegradienten fraktioniert (siehe 4.2.8.). Der Immunoblot zeigte eine Akkumulation von p97, CSN1 sowie CSN5 in den Fraktionen 13 und 14 (Abbildung 12A). Zum Vergleich erfolgte eine Auftrennung der Proteinextrakte mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Säule (HPLC-Säule). Die beiden Fraktionen wurden in einer Blue Native PAGE aufgetrennt, wobei die Fraktion 14 das 660 kDa große Thyreoglobulin-Dimer als Molekulargrößenmarker enthielt. Anschließend wurde die Fraktion 14 für die Immunopräzipitation von CSN1 verwendet. Für diese Untereinheit des CSN ist aus anderen Studien bekannt, dass sie mit CSN2, 3, 5 und 8 ko-präzipitiert und eine zentrale Position in der Struktur des CSN-Komplexes einnimmt (Tsuge et al., 2001; Abbildung 8).

Beim Immunoblot konnte anschließend gezeigt werden, dass sowohl p97 als auch CSN5 mit CSN1 ko-präzipitiert werden (Abbildung 12B), was die vermutete *in vivo* Interaktion von p97 mit dem gesamten CSN-Komplex unterstützt.

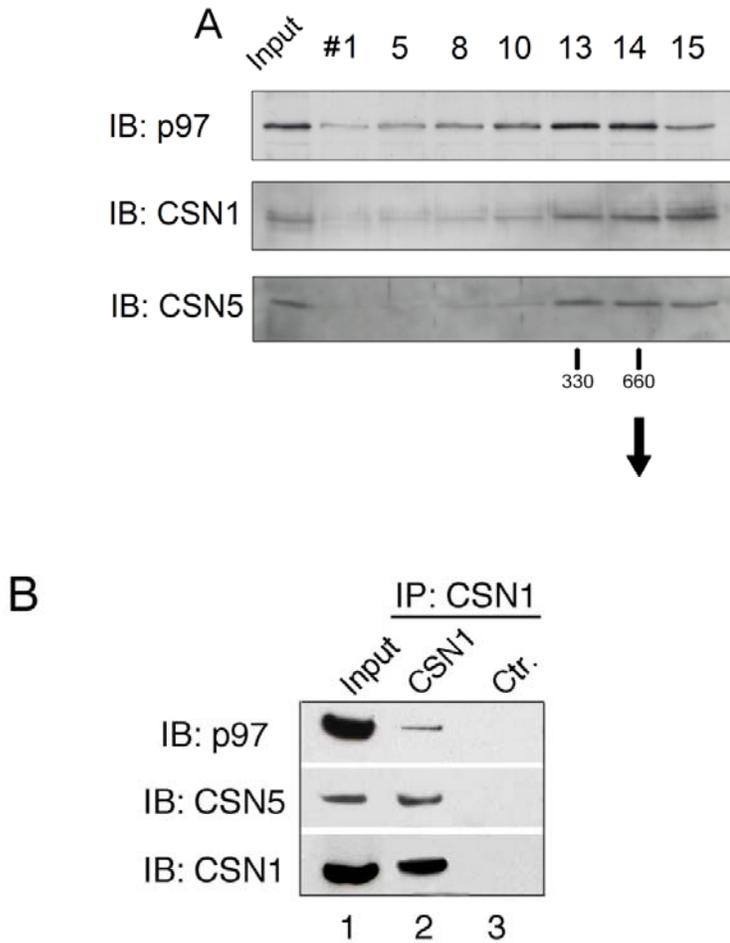


Abbildung 12: Interaktion von p97 mit dem gesamten CSN-Komplex

A: p97 kofraktioniert mit den CSN-Untereinheiten CSN1 und CSN5 bei einer Glycerol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Die einzelnen Proteinfractionen wurden mit Aceton präzipitiert. Die Proteine wurden durch eine 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot detektiert (benutzte Antikörper links, aufgetragene Fractionen oben, molekulare Größenmarker (kDA) unten im Bild. Der Input entsprach 2 % des Gesamtlysates.). **B:** Die Proteine aus der Thyreoglobulin-Dimer-haltigen Fraction wurden für eine Immunopräzipitation von CSN1 verwendet. Im Immunoblot wurden CSN1 sowie das ko-präzipitierte p97 und CSN5 detektiert. Als Kontrolle (Ctr.) wurde ein Isotyp-Kontrollantikörper verwendet. (Die hier verwendete Fraction wurde mittels HPLC/Gelfiltration gewonnen, die gemeinsam mit Jörg Klug durchgeführt wurde. Der Western Blot wurde gemeinsam mit Sevil Cayli durchgeführt und ist in Ihrer Dissertation ebenfalls aufgeführt). p97 und CSN bilden *in vitro* einen ATP-abhängigen Komplex

Im nächsten Schritt wurde die Interaktion zwischen dem aus humanen Erythrozytenkonzentraten isolierten CSN (Hetfeld et al., 2005) und rekombinantem p97, welches nach bakterieller Expression über einen His-Tag aus Einschlusskörperchen aufgereinigt wurde, *in vitro* untersucht (Cayli et al., 2009). Um die Abhängigkeit dieser Interaktion von der ATPase-Aktivität des p97 (Beskow et al., 2009) zu untersuchen, wurden im Protein-Bindungsassay beide Proteinproben in einem Bindungspuffer (siehe 4.2.3.) mit oder ohne 1 mM ATP inkubiert. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Proben für die Dauer von 30 min mit einem nativen Probenpuffer versetzt, welcher an die Lagerungspuffer der einzelnen Proteinlösungen angepasst war. Hiernach wurden die Proben im nativen Polyacrylamid-Agarose-Kompositgel aufgetrennt und im Immunoblot analysiert (siehe 4.2.4). Der CSN-Komplex migrierte hierbei als eine deutlich erkennbare Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 450 kDa (Abbildung 13, Spur 1). Der überwiegende Teil des p97 migrierte als eine etwa 600 kDa große Bande, wobei dieses Molekulargewicht von einem biologisch aktiven p97-Homohexamer erwartet wurde (Abbildung 13, Spur 5). Das Vorliegen eines p97-Homohexamers konnte durch dessen Dissoziation in Monomere bestätigt werden, wobei diese charakteristischerweise erst durch die Zugabe hoher Harnstoffkonzentrationen gelingt (Song et al., 2007). Hierfür wurde das rekombinante p97 mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Harnstoff inkubiert (Spuren 6 und 7).

Es konnte gezeigt werden, dass ein p97-Homohexamer ausschließlich in Anwesenheit von ATP an das CSN binden kann. Dabei formiert sich ein hochmolekularer, oligomerer Komplex (p97hex-CSN), welcher signifikant größer ist als 660 kDa, was dem Molekulargewicht des Thyreoglobulin-Dimers entspricht (Spuren 2-4).

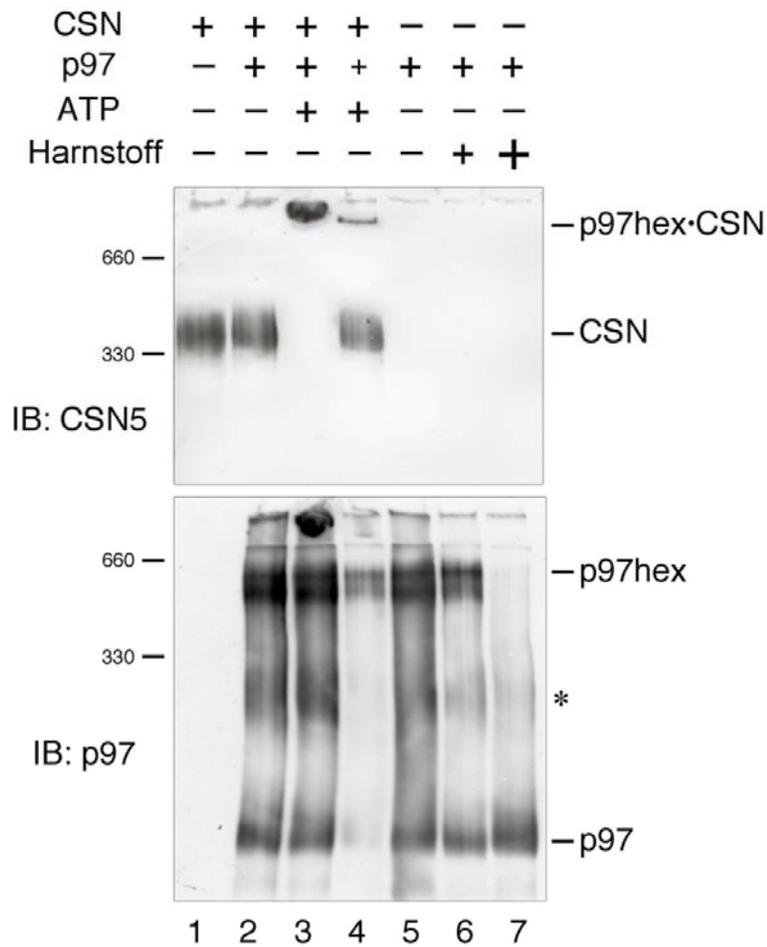


Abbildung 13: p97 und CSN bilden ATP-abhängig einen Komplex

Aus Erythrozyten isoliertes CSN (1,4 µg) und aufgereinigtes p97 (6 µg; 1,2 µg in **Spur 4**) wurden nach Auftrennung im nativen 2-18%igen Polyacrylamid-Agarose-Kompositgel im Immunoblot untersucht. Dabei wurden die Komplexe einzeln oder nach 2-stündiger Präinkubation beider Komplexe mit oder ohne 1 mM ATP auf das Gel aufgetragen. 4M (**Spur 6**) bzw. 6M (**Spur 7**) Harnstoff wurden für die Dissoziation der p97-Homohexamere verwendet und 1 h lang mit den Proteinproben inkubiert. Putative p97-Homotrimere sind mit (*) gekennzeichnet. Als Molekulargrößen-Marker wurde Thyreoglobulin (5µg; 660 kDa als Dimer, 330 kDa als Monomer) verwendet. Im Ergebnis bildete sich ein hochmolekularer, Komplex aus CSN und p97, im Bild als p97hex-CSN gekennzeichnet (**Spuren 3 und 4**).

4.1.2. Charakterisierung der an der Interaktion mit CSN5 beteiligten p97-Domänen

Für die Analyse der an der Interaktion mit CSN5 beteiligten Domänen der ATPase p97 wurden Deletionskonstrukte von p97 verwendet, welche über das N-terminal verknüpfte Fusionspeptid FLAG markiert wurden. Vor der Transfektion wurden die aus *E.coli*-Bakterien vom Stamm DH5 α isolierten DNA-Plasmide einer Linearisierung mit dem Restriktionsenzym Kpn1 unterzogen und in einem 1%igen Agarosegel analysiert. Anschließend wurden die FLAG-markierten Expressionskonstrukte für den p97-Wildtyp sowie für die N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-202), die D1-Domäne (Aminosäuren 203-450), die D2-Domäne (Aminosäuren 451-807), die ND1-Domänen (Aminosäuren 1-450) und die D1D2-Domänen (Aminosäuren 203-807) in HEK293T-Zellen transfiziert (siehe 3.10. und 4.1.2.). Die Analyse der Zelllysate im Immunoblot bestätigte zunächst die Expression der Proteine (Abbildung 14, linkes Bild, Spuren 1-7). Im Anschluss erfolgte die Immunopräzipitation von CSN5. Weder die N-Domäne, noch die D1- oder D2-Domänen konnten hierbei einzeln ko-präzipitiert werden (Abbildung 14, rechtes Bild, Spuren 9-11). Der p97-Wildtyp sowie die ND1- und D1D2-Proteinmutanten zeigten hingegen eine deutliche Ko-Präzipitation mit CSN5, wobei D1D2 über die geringste Affinität zu verfügen schien.

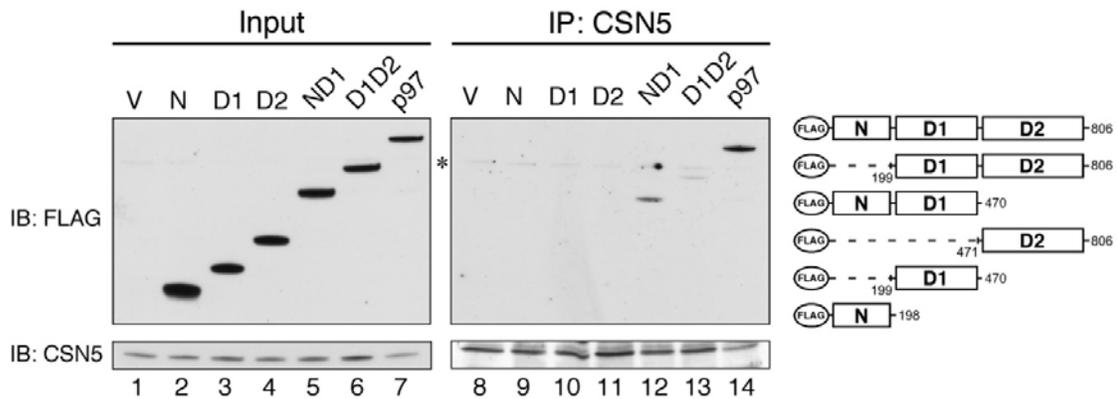


Abbildung 14: CSN5-interagierende Domänen von p97

Rechts sind die verwendeten Deletionskonstrukte von p97, welche in HEK293T-Zellen transfiziert wurden, schematisch dargestellt. Als Kontrolle wurde der Leervektor (V) verwendet. Die Expression der FLAG-markierten Proteine sowie die Anwesenheit von CSN5 wurde durch Immunoblotting (**linkes Bild, Spuren 1-7**) überprüft. Bei der Immunopräzipitation von CSN5 wurden der p97-Wildtyp, die ND1-Domänen sowie die D1D2-Domänen ko-präzipitiert (**rechtes Bild, Spuren 12-14**). Eine unspezifische Bande ist mit (*) gekennzeichnet.

4.2. Die Stabilität von HIF-1 α ist abhängig von MIF

Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern von MIF ergab sich der Nachweis einer Interaktion zwischen dem Chaperon p97 und dem regulatorischen Proteinkomplex CSN (Dissertation Sevil Cayli, 2009, Cayli et al., 2009). Um die biologische Aufgabe dieser Interaktion anhand eines Beispiels zu verstehen, wurde HIF-1 α als wichtiges Zielprotein beider Komplexe im Rahmen des UPS ausgewählt. Seit 2008 ist bekannt, dass die Ubiquitylierung von HIF-1 α auf die Gegenwart von CSN im Arbeitszyklus der Cullin-Ring-Ligasen und insbesondere auf die Deneddylase-Aktivität von CSN5 angewiesen ist (Miyachi et al., 2008). Seit 2007 ist weiterhin bekannt, dass MIF die Deneddylase-Aktivität von CSN zu inhibieren vermag (Nemajerova et al., 2007b; Schmidt et al., 2009). Weitere Studien haben gezeigt, dass p97 mit HIF-1 α interagiert und seine proteasomale Degradierung vermittelt (Alexandru et al., 2008). Daher sollte im folgenden Studienabschnitt der regulatorische Einfluss von MIF auf die Stabilität von HIF-1 α im Rahmen dessen Degradierung im UPS näher untersucht werden.

4.2.1. Die Inhibition von MIF in Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis (CIA) führt zur Degradierung von HIF-1 α

Die Untersuchung der Rolle von MIF in der proteasomalen Degradierung von HIF-1 α wurde an DBA/1J-Mäusen im Rahmen der Studie „Anti-arthritic Therapeutic and Prophylactic Efficacy of Test Compound MIF098 in a Collagen-Induced Arthritis Model in DBA/1J Mice“ (Richard Bucala, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA) durchgeführt. Nach dem Auslösen einer Kollagen-induzierten Arthritis (Collagen-Induced Arthritis, CIA) wurden die Tiere in drei experimentelle Behandlungsgruppen eingeteilt. Die Mäuse aus der Gruppe 1 wurden als Kontrolltherapietiere definiert und nur mit inkomplettem Freund-Adjuvans (ICFA) behandelt. Die Tiere aus der Gruppe 2 erhielten das entzündungshemmende Prednisolon, während den Versuchstieren aus der Gruppe 3 ein hochspezifischer MIF-Inhibitor, das MIF098 (Jorgensen et al., 2011; Sun et al., 2013) verabreicht wurde (Abbildung 15). MIF098 ist in der Lage, die biologische Aktivität von MIF zu inhibieren und zeigte *in vitro* eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber MIF in Gelenkfibroblasten (Jorgensen et al., 2011) sowie *in vivo* in einem Tiermodell einer bronchopulmonalen Dysplasie (Sun et al., 2013).

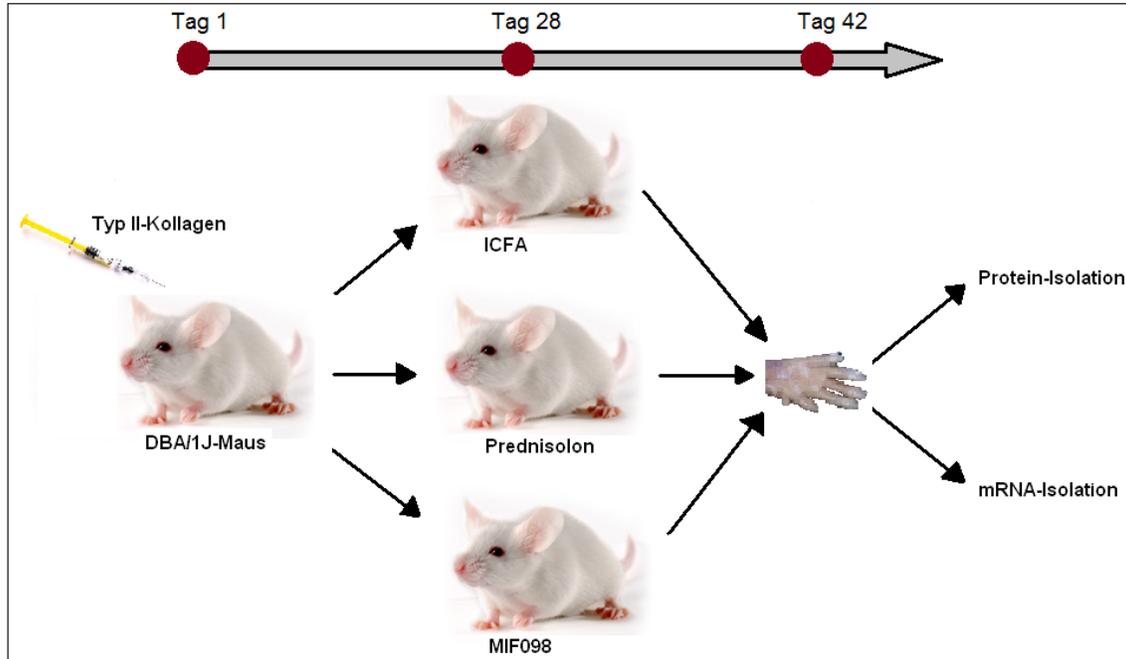


Abbildung 15: Experimentelles Design des CIA-Tierversuchs.

Gezeigt ist das Behandlungsschema der DBA/1J-Mäuse. Zunächst wurde mittels Injektion von Typ II-Kollagen eine Arthritis induziert (**links**). Anschließend erfolgten Therapieversuche in drei experimentellen Gruppen mit ICFA (Kontrollgruppe), Prednisolon sowie dem spezifischen MIF-Inhibitor 098 (**mitte**). Zwei Wochen nach Therapiebeginn wurden die Tiere geopfert, um aus den entzündeten Gelenken das Gesamtprotein sowie die mRNA zu isolieren (**rechts**).

Das aus den entzündeten Gelenken der Mäuse isolierte Gesamtprotein (siehe 4.1.4.) wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Immunoblot untersucht (Abbildung 16). Dabei zeigten sich bei den Versuchstieren aus der ICFA-Gruppe unterschiedlich große, jedoch deutlich detektierbare Banden von HIF-1 α (Spuren 1-3). Die mit Prednisolon behandelten Versuchstiere zeigten ein inhomogenes Muster bei der Detektion von HIF-1 α (Spuren 4-6). Bei allen mit dem MIF-Inhibitor behandelten Versuchstieren dagegen konnten nur minimale Mengen von HIF-1 α detektiert werden (Spuren 7-9).

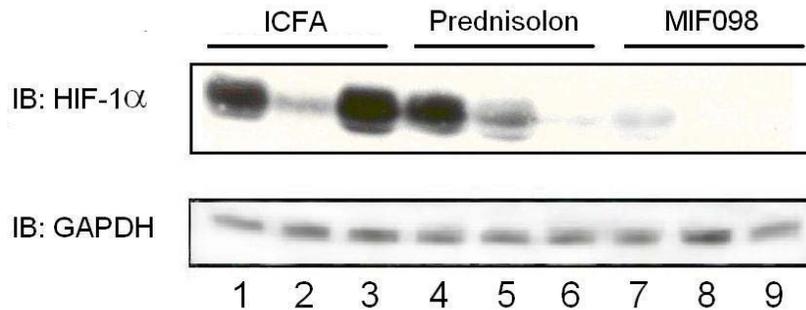


Abbildung 16: Die Inhibition von MIF führt zu einer Destabilisierung von HIF-1α in CIA-Mäusen

Aus jeder Behandlungsgruppe wurden randomisiert jeweils drei Tiere entnommen, um die isolierten Gesamtproteinextrakte der entzündeten Gelenke im Immunoblot auf die Präsenz von HIF-1α zu untersuchen. Die aufgetragene Proteinmenge wurde in allen Proben angeglichen und mittels GAPDH-Detektion überprüft.

4.2.2. Die Expression von HIF-1α-mRNA ist unabhängig von MIF

Die in Abbildung 16 gezeigte Untersuchung des Einflusses von MIF098 auf die Konzentration von HIF-1α gab keinen Aufschluss über den Wirkungsmechanismus, welcher sich hinter dieser Veränderung in den Zellen der entzündeten Gelenke verbirgt. Um den Einfluss von MIF auf die Genexpression von HIF-1α zu untersuchen, wurde die Total-RNA aus den entzündeten Gelenken der Versuchstiere der Gruppen 1-3 isoliert (siehe 4.3.3.). Als Kontrolle wurde die Total-RNA aus Gelenken von unbehandelten DBA/1J-Mäusen isoliert. Anschließend wurde die isolierte RNA spektrophotometrisch quantifiziert, einer Aufreinigung durch DNase-I-Verdau unterzogen und in cDNA umgeschrieben. Mithilfe der quantitativen Real-time-PCR wurde anschließend das HIF-1α-Expressionsmuster untersucht. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden zur Eliminierung einer Fehlinterpretation der Daten durch die unterschiedliche Ausgangsmenge der Gesamt-RNA ein konstitutiv exprimiertes Gen (house-keeping-Gen), das β-Aktin, zu den einzelnen Proben in Relation gesetzt. So wurde zunächst die Differenz aus dem C_t -Wert (siehe 4.3.6.) von HIF-1α mit dem C_t -Wert von β-Aktin gebildet (ΔC_t). Im Anschluss daran wurden die Differenzen der ΔC_t -Werte von unbehandelten (Kontrolle) und behandelten Tieren (ICFA, Prednisolon oder

MIF098) gebildet ($\Delta\Delta C_t$). Aus diesem Wert wurde die relative Expression mit Hilfe der Funktion 2^{-x} berechnet und in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 17). Nach statistischer Auswertung der Daten mittels t-Test ließ sich in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung der relativen HIF-1 α -Expression gegenüber den Messwerten der Kontrollgruppe zeigen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Genexpression von HIF-1 α nicht durch die Inhibition von MIF beeinflusst wird.

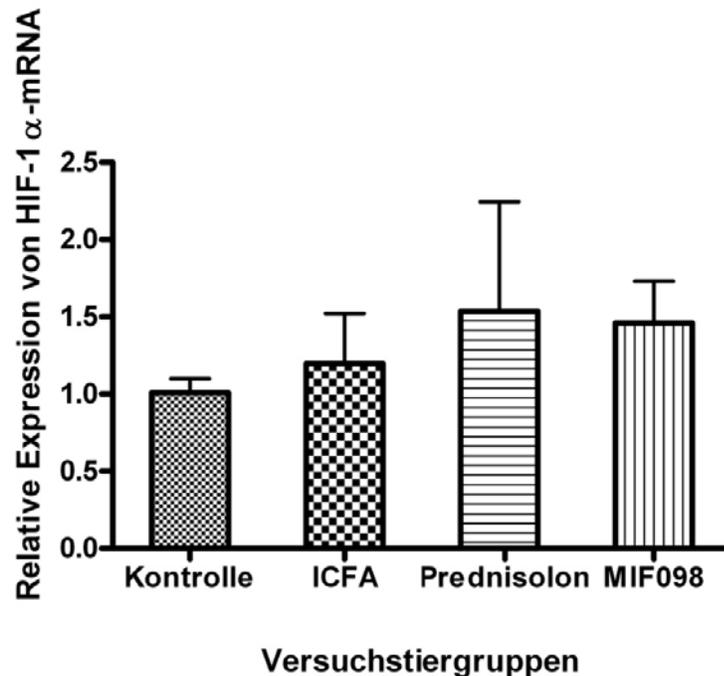


Abbildung 17: Die Expression von HIF-1 α -mRNA ist unabhängig vom MIF-Inhibitor MIF098 oder Prednisolon

Die Quantifizierung der HIF-1 α -mRNA-Expression erfolgte mit Hilfe der Real-time-PCR. Die Messwerte der Therapiegruppen (ICFA, Prednisolon, MIF098; n=6 Versuchstiere pro Gruppe) wurden untereinander sowie mit den Messwerten der Kontrollgruppe (n=3 unbehandelte DBA/1J-Mäuse) verglichen. Zum Nachweis der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test durchgeführt (alle $p > 0,05$).

4.2.3. Die Expression von VEGF-A-mRNA wird durch MIF-Inhibition herunterreguliert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von MIF zu einer Degradierung von HIF-1 α in den entzündeten Gelenken führt, sollte nun überprüft werden, inwiefern dies auch zu funktionellen Konsequenzen für HIF-1 α als

Transkriptionsfaktor führt. Dazu wurde der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-A) als wichtiges Ziel-Gen von HIF-1 α ausgewählt und die relative Expression von VEGF-A-mRNA in den Versuchstieren mit Hilfe der Real-time-PCR quantifiziert. Das Ergebnis zeigte in der Gruppe der MIF-inhibierten Versuchstiere eine signifikante Abnahme der Expression von VEGF-A-mRNA im Vergleich mit allen anderen Gruppen (Abbildung 18).

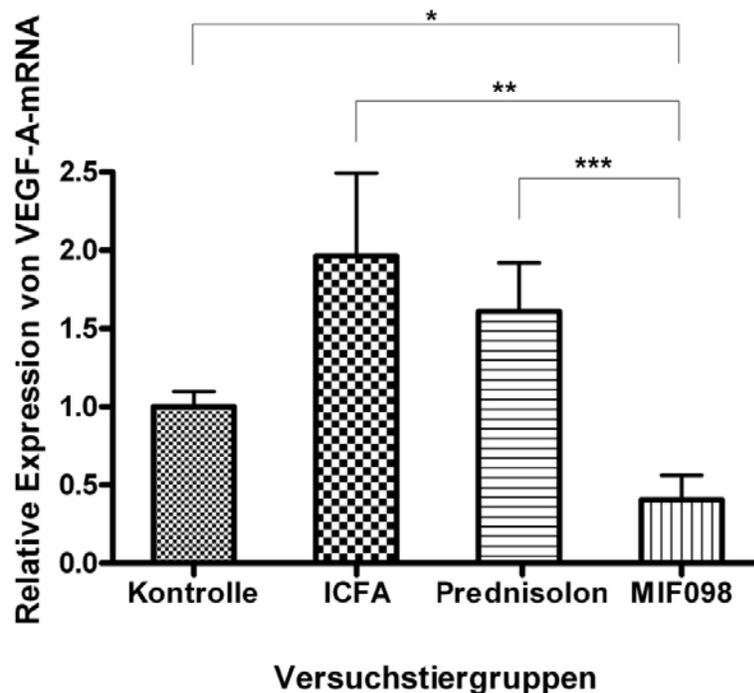


Abbildung 18: MIF-Inhibition führt zu einer Abnahme der VEGF-A-mRNA-Expression

Die Quantifizierung der VEGF-A-mRNA-Expression erfolgte mit Hilfe der Real-time-PCR. Die Messwerte der Therapiegruppen (ICFA, Prednisolon, MIF098; n=6 Versuchstiere pro Gruppe) wurden untereinander sowie mit den Messwerten der Kontrollgruppe (n=3 unbehandelte DBA/1J-Mäuse) verglichen. Die statistische Signifikanz wurde mit einem t-Test bestimmt (GraphPad PRISM). Nur die mit MIF098 behandelten Versuchstiere zeigten gegenüber der Kontrollgruppe (*p<0,05), der ICFA-Gruppe (**p<0,02) sowie der Prednisolon-Gruppe (**p<0,02) eine signifikante Abnahme der Expression von VEGF-A-mRNA.

5. DISKUSSION

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) übernimmt in eukaryotischen Zellen die Kontrolle über die Lebensdauer von Proteinen. Dabei spielt die schrittweise Ubiquitynylierung von Zielproteinen eine wesentliche Rolle in einer Vielzahl von physiologischen Prozessen. Die Deregulierung von Komponenten dieses Systems kann zur Entstehung von Pathologien wie Krebs und zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen beitragen (Hoeller und Dikic, 2009). Neben dem Proteasom stellen die Cullin-RING-Ubiquitinligasen die wichtigste Komponentengruppe des UPS dar, deren Aktivität durch den Neddylierungsstatus der Cullin-Untereinheit moduliert wird (Schmidt et al., 2009). In diesem Zusammenhang übernimmt das COP9-Signolosom (CSN) eine wesentliche Aufgabe, indem dessen Untereinheit CSN5 durch seine Deneddylase-Funktion den Aktivitätsgrad der SCF-Ubiquitinligasen zu modulieren vermag (Petroski und Deshaies, 2005; Bornstein et al., 2006). Mehrere Studien haben des weiteren zeigen können, dass der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF), ein ursprünglich als proinflammatorisches Zytokin beschriebenes Protein (Calandra et al., 1994), durch seine Interaktion mit CSN5 (Kleemann et al., 2000) die Aktivität der SCF-Ubiquitinligasen zu kontrollieren vermag (Nemajerova et al., 2007b; Schmidt et al., 2009). Der im Detail verborgen gebliebene Wirkungsmechanismus von MIF im Rahmen des UPS sowie dessen vielfältige biologische Funktionsweise gaben Anlass zu einer systematisch durchgeführten Suche nach neuen MIF-Interaktionspartnern (Cayli, 2008). Ein Ergebnis dieser Studie war die Identifizierung von p97 als indirekten Interaktionspartner von MIF, wobei CSN5 als Bindeglied zwischen diesen beiden Bindungspartnern zu fungieren scheint (Cayli et al., 2009, Abbildung 19).

Aktuelle Studien betrachten p97, welches u.a. für seine Funktion als Chaperon im System der ER-assoziierten Degradierung bekannt ist, als wichtige Komponente im UPS und zeigen seine Bedeutung für die proteasomale Prozessierung löslicher zytosolischer Proteine (Alexandru et al., 2009; Beskow et al., 2009). In Anbetracht dieser Resultate erfolgte in dieser Arbeit eine genauere Untersuchung der Interaktion zwischen p97 und dem CSN.

5.1. CSN und p97 formieren einen ATP-abhängigen Komplex, welcher dem regulatorischen 19S-Partikel des Proteasoms ähnelt

Da die regulatorische Untereinheit CSN5 ihre Deneddylase-Aktivität ausschließlich als Bestandteil des CSN, nicht aber als Monomer entfalten kann (Cope et al., 2002, Bellare et al., 2006), wurde zunächst untersucht, ob auch der CSN Holokomplex mit p97 interagieren kann. Hierfür wurden Proteinextrakte aus lysierten HEK293T-Zellen in einem Glycerol-Dichtegradienten fraktioniert, um anschließend eine Fraktion in der CSN1, CSN5 und p97 nachweisbar war, einer Immunopräzipitation mit Anti-CSN1 Antikörper zu unterziehen. CSN1 wurde als Zielprotein gewählt, da diese Untereinheit mit CSN2, 3, 5 und 8 ko-präzipitiert werden kann und eine zentrale Ankerrolle für den CSN Holokomplex spielt (Tsuge et al., 2001). Im Ergebnis zeigte sich, dass sowohl p97 als auch CSN5 mit CSN1 ko-präzipitiert werden, was eine *in vivo* Interaktion von p97 mit dem CSN Holokomplex nahelegt.

Damit stellte sich die Frage, ob diese Interaktion auch *in vitro* mit aufgereinigten Komponenten reproduziert werden konnte. Hierfür wurde ein natives Polyacrylamid-Agarose-Kompositgel verwendet (Niepmann und Zheng, 2006), das in der Lage ist diese hochmolekularen Komplexe aufzutrennen. Dabei stellte sich heraus, dass die Bindung zwischen isoliertem CSN und rekombinantem p97-Homohexamer nur in Anwesenheit von ATP möglich ist. Bei der Inkubation beider Komplexe mit ATP bildete sich ein hochmolekularer Komplex, in dem CSN und p97 nachgewiesen werden konnten.

p97 besitzt zwei ATPase Domänen (D1 und D2), die ATP binden und hydrolysieren können. Die beiden ATPase-Domänen D1 und D2 zeigen dabei signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Hydrolyseaktivität. Zwar ist die Bindungsaffinität gegenüber ATP bei beiden Domänen gleich hoch, doch scheint die Affinität gegenüber ADP bei der D1-Domäne deutlich zu überwiegen (Briggs et al., 2008). Damit besitzt die D2-Domäne eine deutlich höhere ATP-Hydrolyseaktivität als D1.

p97 bildet ein fassförmiges Homohexamer, welches aus zwei gestapelten Ringen zusammengesetzt ist (Wang et al, 2003), so daß sich im Inneren eine zentrale Pore bildet (Dreveny et al., 2004). Für die Oligomerisation von p97 wird die Aktivität der beiden ATPase-Domänen benötigt. Über die ATPase-Aktivität der D2-Domäne kommt es zu

einer Konformationsänderung, die den Öffnungsgrad der zentralen Pore beeinflusst (DeLaBarre und Brunger, 2005; Davies et al., 2008; Beskow et al., 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die N-terminale Domäne, welche vor allem für die Interaktion mit den Adapterproteinen und Substraten von p97 verantwortlich ist, ebenfalls eine nukleotidabhängige Konformationsänderung vollziehen kann (Tang et al., 2010). So konnte auch nachgewiesen werden, daß die Interaktion von p97 mit dem Werner-Syndrom-Protein, einem weiteren Interaktionspartner von p97, ATP-abhängig erfolgt (Indig et al., 2005). Damit könnte sowohl eine ATP-abhängige Konformationsänderungen der N-Domäne, als auch die Konformationsänderungen der beiden ATPase-Domänen eine Voraussetzung für die Interaktion mit CSN 5 bzw. dem CSN HoloKomplex darstellen. Unklar bleibt, ob dafür die Bindung von ATP ausreicht oder ob es auch hydrolysiert werden muß.

Darüberhinaus wurde untersucht, welche p97 Domänen für die Interaktion mit dem CSN notwendig sind. p97 besitzt zwei charakteristische AAA⁺-ATPase-Domänen (D1 und D2) sowie eine N-terminale Domäne (N). Die Interaktionsmechanismen von p97 sind Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. So vermag p97 sowohl direkt (Dai und Li, 2001), als auch über Kofaktoren und Adapterproteine (Dreveny et al., 2004; Richly et al., 2005) mit seinen Bindungspartnern zu interagieren. Dabei stellt die Kopplung von p97 an Adapterproteine eine Voraussetzung für die Bindung von ubiquitinylierten Substraten im UPS dar (Alexandru et al., 2009), welche über die N-Domäne gebunden werden. Für die Charakterisierung der Interaktion zwischen p97 und dem CSN wurden Expressionskonstrukte, die für verschiedene p97 Deletionsproteine kodieren, in einem Ko-präzipitationsassay eingesetzt. So konnte der p97-Wildtyp effektiv mit einem Anti-CSN5-Antikörper kopräzipitiert werden, wogegen dies bei der ND1-Mutante deutlich schwächer ausfiel und die D1D2-Mutante nur noch sehr schwach mitgefällt wurde. Diese Befunde lassen den Schluß zu, daß sowohl die N-Domäne wie auch beide ATPase-Domänen D1 und D2 einen Anteil an der Bindung zum CSN beitragen.

Die meisten Bindungspartner von p97 sind auf Adapterproteine angewiesen, über welche ihre Interaktionen mit der N-Domäne zustande kommen. Dabei verfügen die Adapterproteine zumeist über eine UBX-Domäne, um die N-Domäne von p97 zu erkennen, sowie über eine Ubiquitin-assoziierte Domäne, um die polyubiquitinylierten Substrate zu rekrutieren (Jentsch und Rumpf, 2007; Schubert und Buchberger, 2008). In

strukturellen Analysen konnte gezeigt werden, dass die ND1-Domäne von p97 mit der C-terminalen UBX-Domäne von p47, einem zentralen Adapterproteine der ERAD, interagiert (Jentsch und Rumpf, 2007). Interessanterweise konnte eine Interaktion der Deubiquitinase Valysin-containing protein/p47 Complex-Interacting Protein p135 (VCIP 135) mit p97 gezeigt werden (Wang et al., 2004 b), wobei auch hier eine UBX-Domäne an der Interaktion beteiligt zu sein scheint (Uchiyama et al., 2002). Die direkte Interaktion zwischen CSN und p97 verdeutlicht dabei den besonderen Charakter dieser Bindung, da das CSN offenbar über seine Untereinheit CSN5 ohne Adapterproteine im nicht-ubiquitylierten Zustand gebunden werden kann.

Zahlreiche weitere Adapterproteine, darunter p47, Ufd1p, SVIP und Ataxin3 (Nagahama et al., 2003; Bruderer et al., 2004; Zhong et al., 2004) binden wie CSN5/CSN vor allem über die ND1-Domänen an p97. Das mehrere Interaktionspartner eines Proteins über die gleiche(n) Domäne(n) gebunden werden, konnte auch für das CSN5 und seine MPN-Domäne gezeigt werden (Burger-Kentischer et al., 2005). Da CSN5 ein gut beschriebener Interaktor des MIF ist (Kleemann et al., 2000), besteht die Möglichkeit, daß MIF mit p97 um die Bindung an CSN5/CSN kompetiert und so die Rekrutierung von polyubiquitylierten Proteinen an das Proteasom modifizieren kann (s.a. Abbildung 19 C).

Für alle CSN-Untereinheiten existieren paraologe Proteine im *Lid* des Proteasom, so daß eine funktionelle Verwandtschaft beider Komplexe vermutet werden kann (Glickman et al., 1998, Bech-Otschir et al., 2002; Wei et al., 2008;). So beinhaltet auch die proteasomale Lid-Untereinheit RPN11 ein MPN⁺-Motiv, welches ebenfalls bei CSN5 identifiziert wurde (Verma et al., 2002) und in beiden Komplexen für deren Deubiquitylase-Aktivität verantwortlich ist. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen beider Komplexe zeigten sich zudem große Ähnlichkeiten bezüglich Form und Molekulargewicht (Wei und Deng, 2003).

Darüberhinaus besitzt das p97-Oligomer eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Basis des Proteasoms, welche aus sechs unterschiedlichen ATPasen (Rp1-6) besteht (Jentsch and Rumpf, 2007). CSN und p97 könnten also als alternative Lid-Basis-Struktur („CSN-Partikel“, Cayli et al., 2009, Abbildung 19) für das Proteasom fungieren (Schwechheimer und Deng, 2001; Mikus und Zundel, 2005; Wei et al., 2008), wobei p97 die Funktion übernehmen könnte, ubiquitylierte Proteine zu binden und diese dem Proteasom zu präsentieren (Elsasser und Finley, 2005). Diese

Hypothese wird durch einen weiteren Befund gestützt, demzufolge die Inaktivierung von CSN zu einer Akkumulierung von an p97 gebundenen polyubiquitinylierten Proteinen führt (Cayli et al., 2009). Das CSN könnte also auch auf diese Art und Weise an der Prozessierung von Substraten im UPS beteiligt sein.

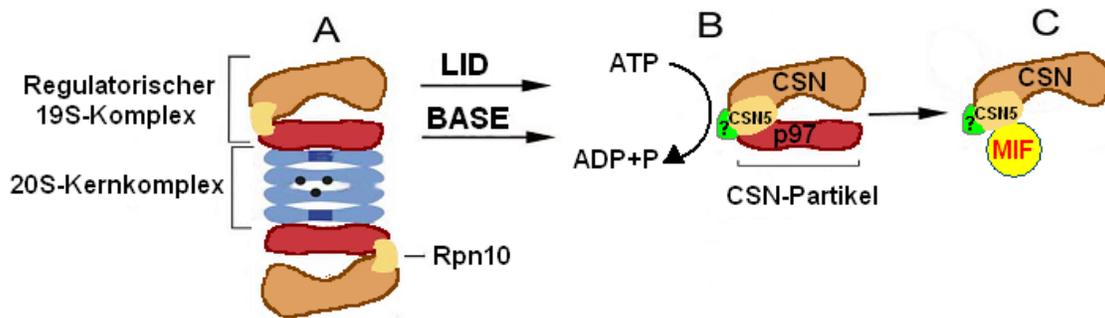


Abbildung 19: CSN und p97 formieren ATP-abhängig das CSN-Partikel, einen Komplex, welcher dem regulatorischen 19S-Komplex des Proteasoms ähnelt

Unter (A) ist eine schematische Darstellung des 26S-Proteasoms zu sehen (modifiziert nach Elsasser und Finley, 2005). Das 26S-Proteasom setzt sich zusammen aus einem 20S-Kernkomplex (**blau**) und zwei regulatorischen 19S-Komplexen, welche in einen Lid-Subkomplex (**braun**) und einen Basis-Subkomplex (Base) (**rot**) unterteilt sind. Der Basis-Subkomplex beinhaltet sechs ATPasen (Rpt1-6) sowie vier nicht-ATPasen (Rpn1, 2, 10 und 13). Der Lid-Subkomplex beinhaltet sechs Proteine mit PCI-Domänen (Rpn3, 5, 6, 7, 9 und 12) sowie zwei Proteine mit MPN-Domänen (Rpn8 und 11). Das unter (B) dargestellte Modell verdeutlicht die Analogie des ATP-abhängig formierten CSN-Partikels mit dem regulatorischen 19S-Komplex des Proteasoms. Das grün-unterlegte Fragezeichen (?) deutet eine mögliche Beteiligung der proteasomalen Proteine Rpn 1, 2, 10 und 13 an der Struktur des CSN-Partikels an. Unter (C) ist die Interaktion von MIF mit CSN5 gezeigt, welche p97 aus der Bindung mit dem CSN verdrängt (modifiziert nach Jung et al., 2009).

6.2. Die Beteiligung des CSN-Partikels am Abbau von HIF-1 α

p97 kann als molekulare „Gangschaltung“ des UPS betrachtet werden, welche in der Anwesenheit von Kofaktoren das Schicksal von Substratproteinen regulieren kann (Jentsch und Rumpf, 2007). Durch die Interaktion von p97 mit dem CSN werden die Funktionen des dadurch formierten CSN-Partikels durch die Deneddylase-Funktion von CSN5 erweitert, wodurch die Aktivität der E3-Ligasen und damit der Ubiquitinylierungsstatus von Substraten gesteuert werden kann. So könnten mit Hilfe von Adapterproteinen über die N-terminale Domäne von p97 fehlgefaltete und/oder ubiquitinylierte Substrate rekrutiert werden, um anschließend mit Hilfe der vielfältigen Aktivitäten der einzelnen CSN-Untereinheiten ihre proteasomale Degradierung zu steuern (Abbildung 20).

Ein Substrat von p97 ist der Hypoxie-induzierte Faktor 1 α (HIF-1 α), eine Untereinheit des HIF-Komplexes. Der als zentraler Regulator der Zellhypoxie beschriebene HIF-Komplex stellt einen heterodimeren Transkriptionsfaktor dar, dessen Expression von der intrazellulären Sauerstoffkonzentration abhängig ist (Semenza und Wang, 1992; Wang et al., 1995). Hierbei setzt sich der aktive, DNA-bindende HIF-Komplex einerseits aus dem konstitutiv exprimierten HIF-1 β und andererseits aus einer der beiden ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen stabilen Untereinheiten HIF-1 α oder HIF-2 α zusammen (Jaakkola et al., 2001). Im Zustand der Normoxie durchläuft HIF-1 α einen Zyklus aus kontinuierlicher Synthese und anschließender Degradierung im UPS. Im ersten Schritt seiner Degradierung erfolgt die Hydroxylierung zweier Prolinreste durch spezifische Prolyl-Hydroxylasen (Kaelin, WG. Jr., 2008). Durch diesen Schritt wird eine Bindungsstelle für das von-Hippel-Lindau-Protein (pVHL) generiert, welches einen HIF-1 α -spezifischen E3-Ligasekomplex rekrutiert. In diesem Komplex assoziiert pVHL mit Elongin B/C sowie mit Cullin2 und RING-box-Protein 1 (Rbx1) (Kaelin, WG. Jr., 2008) (Abbildung 20 A-C). Durch die Polyubiquitinylierung und den im Anschluss erfolgenden proteasomalen Abbau wird HIF-1 α daran gehindert, mit HIF-1 β zu dimerisieren und seine Funktion als Transkriptionsfaktor zu entfalten.

Im Rahmen zahlreicher Untersuchungen zum proteasomalen Abbau von HIF-1 α ist bekannt geworden, dass dieser Faktor über den UBXD7-Adapter mit p97 interagiert und somit zu den wichtigsten Substraten von p97 gezählt werden kann (Alexandru et al., 2008). So konnte in p97-depletierten Zellen eine endogene Akkumulation von HIF-1 α

nachgewiesen werden, wobei in der Folge eine vermehrte Expression seiner Zielgene feststellbar war. Eine Interaktion von p97 mit pVHL konnte ebenso gezeigt werden (Alexandru et al., 2008). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass p97 maßgeblich am Abbau von HIF-1 α beteiligt zu sein scheint. Interessanterweise konnte auch die Beteiligung von CSN am proteasomalen Abbau von HIF-1 α nachgewiesen werden (Miyachi et al., 2008). So interagiert CSN5 sowohl mit HIF-1 α , als auch mit pVHL (Bemis et al., 2004). Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass das CSN die Aktivität des HIF-1 α -spezifischen E3-Ligasekomplexes beeinflussen kann, indem es die Dissoziation des polyubiquitinylierten HIF-1 α von pVHL induziert und im Anschluss daran Cullin2 deneddyliert (Miyachi et al., 2008). Zusammenfassend kann damit festgestellt werden, dass sowohl p97 als auch CSN als mögliche Bestandteile eines CSN-Partikels am Abbau ihres gemeinsamen Substrates, HIF-1 α , beteiligt zu sein scheinen (Abbildung 20 C-F).

5.2. Die Inhibition von MIF führt zum vermehrten Abbau von HIF-1 α im UPS

MIF inhibiert durch seine Interaktion mit CSN5 dessen Deneddylase-Aktivität und somit die Deneddylierung der Culline von E3-Ubiquitinligasen. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von ubiquitinylierten Substraten (Nemajerova et al., 2007b; Schmidt et al., 2009). MIF könnte darüber hinaus auch die Aktivität eines CSN-Partikels im UPS inhibieren. Um die funktionellen Auswirkungen von MIF auf HIF-1 α zu untersuchen, wurde hier das Mausmodell einer Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) verwendet, welches biologisch dem Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis ähnelt und für Untersuchungen von chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen konzipiert ist. Bei Rheumatoider Arthritis imponiert eine stark erhöhte Expression von MIF in allen entzündeten Geweben (Leech et al., 1999; Onodera et al., 1999; Santos und Morand, 2008;). Hierbei scheint MIF eine wesentliche proinflammatorische Rolle zu spielen. So ist bekannt, dass MIF an der Ausschüttung und Stabilisierung einer Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen, darunter Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1, Interleukin-6, sowie zahlreicher Matrix-Metalloproteasen (MMPs) beteiligt ist (Calandra et al., 1995; Onodera et al., 2004; Santos et al., 2004;).

Im Rahmen dieser Studie wurden CIA-Versuchstiere in drei Therapiegruppen eingeteilt und mit einem hochspezifischen MIF-Inhibitor behandelt. Anschließend wurden die endogenen Konzentrationen von HIF-1 α in den entzündeten Gelenken der Versuchstiere mittels Western Blot untersucht. Dabei ergab sich im Vergleich aller Individuen in der Gruppe der Versuchstiere, die mit dem MIF-Inhibitor behandelt worden waren, eine deutlich verminderte Konzentration von HIF-1 α . Folglich kann angenommen werden, dass die Abnahme der HIF-1 α -Proteinkonzentration in den entzündeten Gelenken durch die Inhibition der endogenen MIF-Aktivität verursacht wurde. Allerdings erlaubt dieser Befund keine Aussage über den genauen Mechanismus. Die quantitative Messung der HIF-1 α -mRNA mittels Real-time-PCR ergab jedoch keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression nach Inhibition von MIF, während die quantitative Messung der VEGF-A-mRNA als HIF-Zielgen einen signifikanten Abfall der Expression infolge des Verlustes von HIF-1 α zeigte. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass MIF an einer posttranslationalen Regulierung der HIF-1 α -Konzentration beteiligt zu sein scheint.

Weitere Studien bieten interessante Ansätze, um den Wirkungsmechanismus von MIF bei der Stabilisierung von HIF-1 α zu erklären. So konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α als Transkriptionsfaktor an der Expression von MIF in der Brustkrebszelllinie MCF-7 beteiligt ist (Larsen et al., 2008). In einer wegweisenden Studie von Winner et al. wurde beschrieben, dass die Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit MIF-siRNA zu einem Totalverlust des HIF-1 α -Proteins führte (Winner et al., 2007a). Um die vermutete Rolle von MIF in der proteasomalen Degradierung von HIF-1 α zu belegen wurde im gleichen Versuchsaufbau der Proteasominhibitor MG-132 eingesetzt. Nach Applikation einer MIF-siRNA konnte daraufhin HIF-1 α wieder detektiert werden, welches mit CSN5 ko-präzipitierbar war (Winner et al., 2007a). In einer weiteren Untersuchung wurde die Expression von HIF-1 α in der Jurkat-T-Zelllinie untersucht bei der der MIF-Inhibitor ISO-1 zum Einsatz kam (Gaber et al., 2011). Nach Inhibition von MIF mit ISO-1 wurde HIF-1 α vermehrt abgebaut bei gleichzeitig unveränderter Expression der HIF-1 α -mRNA.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass MIF eine wesentliche Rolle in der Hypoxie durch Stabilisierung von HIF-1 α spielt. Dabei könnte die Interaktion eines putativen CSN-Partikels mit der HIF-1 α -spezifischen E3-Ubiquitinligase einen

molekularen Schalter darstellen, welcher durch MIF „umgelegt“ werden kann, um die Degradierung von HIF-1 α im UPS zu stoppen (Abbildung 20, G).

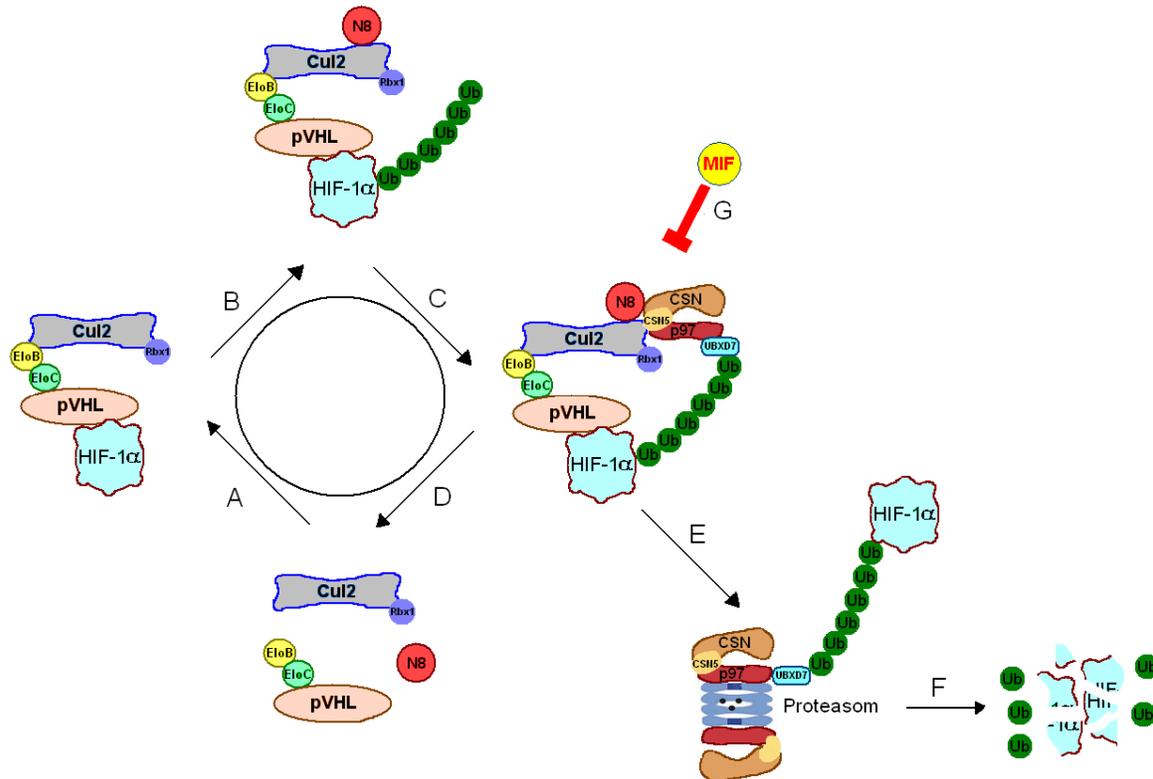


Abbildung 20: Modell einer Beteiligung des CSN-Partikels an der proteasomalen Degradierung von HIF-1 α

(A) In der Gegenwart von hydroxyliertem HIF-1 α bindet pVHL über Elongin B/C (EloB, EloC) Cullin2 und bildet so den spezifischen E3-Ubiquitinligase-Komplex. (B) Die Neddylierung (N8, rot) von Cullin2 fördert die Elongation der Polyubiquitin-Kette am HIF-1 α . (C) Das CSN-Partikel wird rekrutiert. p97 bindet über den UBXD7-Adapter die Polyubiquitin-Kette und fördert die Dissoziation von HIF-1 α . In der Folge wird Cullin2 durch CSN5 deneddyliert. (D) Der Komplex aus pVHL und Cullin2 zerfällt und wird für einen weiteren Zyklus im HIF-1 α -Abbau verwendet. (E) Das CSN-Partikel assoziiert mit dem Proteasom, wobei es in der Folge zur proteasomalen Degradierung von HIF-1 α kommt (F). In (G) ist die Rolle von MIF als Inhibitor der Aktivität des CSN-Partikels angedeutet. Dabei interagiert MIF mit CSN5 und verdrängt p97 aus dem Partikel. Weiterhin ist MIF dazu in der Lage, die Deneddylase-Aktivität von CSN5 zu modulieren. Folglich behindert MIF die proteasomale Degradierung von HIF-1 α (modifiziert nach Nemajerova et al., 2007b und Miyachi et al., 2008).

5.3. Ausblick

Die Erforschung der zellulären Hypoxieantwort spielt eine zentrale Rolle bei der Suche nach neuen Therapien für eine Vielzahl von Erkrankungen. Die Hypoxie gilt als entscheidender Faktor in der Pathogenese zahlreicher chronisch-entzündlicher und ischämischer Erkrankungen sowie in der Progression maligner Tumoren. Die hier gezeigten Zusammenhänge und Ergebnisse betonen die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems für die Regulierung der Hypoxie und definieren das CSN-Partikel als ein potentiell Ziel künftiger Therapien. Dabei stellt die Aktivität von MIF im Ubiquitin-Proteasom-System eine weitere vielversprechende Möglichkeit dar, einen Zugang zu den intrazellulären Kontrollmechanismen der Hypoxie zu erlangen. Hierfür sollte der molekulare Wirkungsmechanismus von MIF in diesem System in künftigen Studien besser charakterisiert werden, da bisher nur hypothetische Erklärungen für die hier gezeigten Effekte möglich sind.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin mit vielfältigen biologischen Funktionen. MIF spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese zahlreicher chronisch-entzündlicher sowie onkologischer Erkrankungen. Es ist weiterhin bekannt, dass MIF über eine Interaktion mit CSN5, einer katalytischen Untereinheit des CSN-Komplexes (auch Signalosom genannt), die Funktion von Cullin-Ring-Ligasen im Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) beeinflussen kann, indem es die Deneddylase-Aktivität von CSN5 inhibiert. Auf der Suche nach neuen Interaktionspartnern von MIF wurde auch die ATPase p97 als neuer, indirekter Interaktionspartner identifiziert. p97 spielt eine große Rolle bei einer Reihe intrazellulärer Aktivitäten. So ist es in seiner Funktion als Chaperon an der Entfaltung und am Abbau von den im endoplasmatischen Retikulum fehlgefalteten, aber auch löslichen zytosolischen Proteinen (z.B. auch HIF-1 α) beteiligt. Daraus entstand die Hypothese, das möglicherweise p97 und CSN5 direkt miteinander interagieren.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es daher, die Beteiligung des gesamten CSN-Komplexes an der Interaktion mit dem p97-Homohexamer nachzuweisen sowie die Interaktion zwischen p97 und CSN5 näher zu untersuchen. Zunächst wurde die Ko-Fraktionierung der Komplexe mittels Glycerol-Dichtegradientenzentrifugation, Immunopräzipitation der Zielproteine und Western Blot analysiert. Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass sowohl p97 als auch CSN5 mit CSN1, einer weiteren Untereinheit des Signalosoms, kopräzipitiert wurden. Zusätzlich wurde die Interaktion beider Komplexe mittels nativer Kompositgelelektrophorese untersucht. Hier zeigte der Immunoblot, dass sich bei der Inkubation beider Komplexe nur in Anwesenheit von ATP ein hochmolekularer Komplex bildete, in dem CSN und p97 nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurden die an der Interaktion mit CSN5 beteiligten Domänen von p97 näher untersucht. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit Deletionskonstrukten der einzelnen p97-Domänen transfiziert, um mit Hilfe von Immunopräzipitation der exprimierten Proteine die Interaktion mit CSN5 zu charakterisieren. Das Ergebnis ließ den Schluss zu, dass sich sowohl die N-terminale Domäne als auch beide ATPase-Domänen an der Bindung des Signalosoms beteiligen .

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Funktion eines Komplexes aus p97 und CSN sowie der Rolle von MIF. Hierfür wurde das Mausmodell einer Kollagen-induzierten Arthritis sowie ein spezifischer MIF-Inhibitor, MIF098, verwendet. Untersucht wurden Stabilität und Funktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , der sowohl mit CSN als auch mit p97 interagiert. In den entzündeten Gelenken der in drei experimentellen Gruppen eingeteilten Tiere zeigte sich eine signifikante Abnahme der HIF-1 α -Proteinkonzentration und der VEGF-A-mRNA-Expression in der mit dem MIF-Inhibitor behandelten Gruppe, wobei die Expression von HIF-1 α -mRNA unbeeinflusst blieb.

Die Ergebnisse zeigen, dass p97 und CSN ATP-abhängig einen hochmolekularen Komplex bilden, der sich vermutlich am proteasomalen Abbau des gemeinsamen Substrates, HIF-1 α , beteiligt. Dabei könnte die Interaktion dieses Komplexes mit der HIF-1 α -spezifischen E3-Ubiquitinligase einen molekularen Schalter darstellen, welcher durch MIF blockiert werden könnte, um die Degradierung von HIF-1 α im UPS zu hemmen.

SUMMARY

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is an abundant cytokine known to be involved in a variety of biological functions. It plays an important role in the pathogenesis of multiple systemic inflammatory disorders as well as in several cancer diseases. MIF is known for interacting with CSN5, a catalytic component of the CSN complex (Signalosome), thus modulating the functions of cullin-ring ligases within the ubiquitin-proteasome-system (UPS). This is mediated through inhibition of the deneddylase activity of CSN5. A systematic interactome screen revealed the ATPase p97 as an indirect interaction partner of MIF. The homohexameric p97 plays a pivotal role in several intracellular processes. For instance, it functions as a chaperone in processes such as protein turnover and proteasomal degradation of factors such as HIF-1 α . This prompted the hypothesis that p97 and CSN5 may be direct interaction partners.

Thus, the first goal of this study was to show the interaction between the entire CSN complex and the homohexameric p97 as well as to further characterize the interaction between p97 and CSN5. Initially, co-fractionation of the two complexes was analyzed using density gradient centrifugation, immunoprecipitation and immunoblotting. As a result, p97 as well as CSN5 co-precipitated with CSN1, another subunit of the signalosome. Additionally, the interaction of both protein complexes was verified using a discontinuous native gel electrophoresis in a composite gradient gel system. Here, the incubation of both complexes showed the formation of a high molecular weight structure which included both, CSN and p97. This association occurred only in the presence of ATP. To map the binding interface between p97 and CSN5, deletion constructs were used in HEK293T cells. The immunoprecipitation of the expressed proteins revealed that both, the N-terminal domain and the ATPase domains of the p97 are required for the interaction with the signalosome.

The second part of this study mainly focused on the function of the p97-CSN complex and the role of MIF in this context. Therefore, a specific MIF-inhibitor (MIF098) was used in an animal model of a collagen-induced arthritis. Here, the goal was to evaluate the stability and function of HIF-1 α , a transcription factor known to interact with both CSN and p97. As a result, a significant decrease of the protein concentration of HIF-1 α as well as a decrease of the VEGF-A-mRNA expression was observed in the inflamed joint tissue of animals treated with MIF098. At the same time, no alteration of the HIF-1 α -mRNA expression was observed.

In summary, this study demonstrates the ATP-dependent association of a high molecular complex containing p97 and CSN. This complex appears to be involved in the proteasomal degradation of HIF-1 α , a known substrate of both p97 and CSN. Specifically, the interaction of the p97-CSN-complex with the HIF-1 α -specific E3-ubiquitin ligase could represent a molecular switch, which – once blocked by MIF – is able to prevent the degradation of HIF-1 α within the UPS.

7. ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
CD74	Cluster of Differentiation 74
COP9	Constitutive Photomorphogenesis Protein 9 Containing Complex
CSN	COP9 Signalosom
CSN5	COP9 Signalosom Untereinheit 5
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemoluminescence
et al.	und andere
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradierung
FLAG	N-DYKDDDDK-C (Octapeptid)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
g	Gramm
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
His	Histidin
HRP	Horseradish peroxidase
Jab1	Jun-activation domain-binding protein 1
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
M	Mol/Liter

mg	Milligramm
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
μ	Micro
μg	Microgramm
μl	Microliter
NaCl	Natriumchlorid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	-log [H ⁺]
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewichtsverhältnis
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alexandru G, Graumann J, Smith GT, Kolawa NJ, Fang R, Deshaies RJ. UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. *Cell*. 2008 Sep 5;134(5):804-16.
2. Ambroggio XI, Rees DC, Deshaies RJ. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol*. 2004 Jan;2(1):E2.
3. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov 29;1695(1-3):189-207.
4. Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, Russell DW. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem*. 1989 May 15;264(14):8222-9.
5. Andre H, Pereira TS. Identification of an alternative mechanism of degradation of the hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2008 Oct 24;283(43):29375-84.
6. Aravind L, Ponting CP. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci*. 1998 May;7(5):1250-4.
7. Ballar P, Fang S. Regulation of ER-associated degradation via p97/VCP-interacting motif. *Biochem Soc Trans*. 2008 Oct;36(Pt 5):818-22.
8. Ballar P, Shen Y, Yang H, Fang S. The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem*. 2006 Nov 17;281(46):35359-68.
9. Baugh JA, Gantier M, Li L, Byrne A, Buckley A, Donnelly SC. Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Sep 8;347(4):895-903.
10. Bech-Otschir D, Seeger M, Dubiel W. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci*. 2002 Feb 1;115(Pt 3):467-73.
11. Bellare P, Kutach AK, Rines AK, Guthrie C, Sontheimer EJ. Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p. *RNA*. 2006 Feb;12(2):292-302.
12. Bemis L, Chan DA, Finkielstein CV, Qi L, Sutphin PD, Chen X, et al. Distinct aerobic and hypoxic mechanisms of HIF-alpha regulation by CSN5. *Genes Dev*. 2004 Apr 1;18(7):739-44.

13. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007 May;13(5):587-96.
14. Berse M, Bounpheng M, Huang X, Christy B, Pollmann C, Dubiel W. Ubiquitin-dependent degradation of Id1 and Id3 is mediated by the COP9 signalosome. *J Mol Biol.* 2004 Oct 15;343(2):361-70.
15. Beskow A, Grimberg KB, Bott LC, Salomons FA, Dantuma NP, Young P. A conserved unfoldase activity for the p97 AAA-ATPase in proteasomal degradation. *J Mol Biol.* 2009 Dec 11;394(4):732-46.
16. Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.* 1966 Jul 1;153(3731):80-2.
17. Borissenko L, Groll M. Diversity of proteasomal missions: fine tuning of the immune response. *Biol Chem.* 2007 Sep;388(9):947-55.
18. Bornstein G, Ganoth D, Hershko A. Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-box protein and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 1;103(31):11515-20.
19. Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S. Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J.* 2002 Feb 15;21(4):615-21.
20. Braun T, Carvalho G, Coquelle A, Vozenin MC, Lepelley P, Hirsch F, et al. NF-kappaB constitutes a potential therapeutic target in high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood.* 2006 Feb 1;107(3):1156-65.
21. Briggs LC, Baldwin GS, Miyata N, Kondo H, Zhang X, Freemont PS. Analysis of nucleotide binding to P97 reveals the properties of a tandem AAA hexameric ATPase. *J Biol Chem.* 2008 May 16;283(20):13745-52.
22. Bruderer RM, Brasseur C, Meyer HH. The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *J Biol Chem.* 2004 Nov 26;279(48):49609-16.
23. Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Thiele M, Schmucker J, Geiger G, Tovar GE, et al. Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif. *FEBS Lett.* 2005 Mar 14;579(7):1693-701.
24. Busch S, Schwier EU, Nahlik K, Bayram O, Helmstaedt K, Draht OW, et al. An eight-subunit COP9 signalosome with an intact JAMM motif is required for fungal fruit body formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 8;104(19):8089-94.
25. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, et al. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 1995 Sep 7;377(6544):68-71.

26. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*. 1994 Jun 1;179(6):1895-902.
27. Callige M, Kieffer I, Richard-Foy H. CSN5/Jab1 is involved in ligand-dependent degradation of estrogen receptor {alpha} by the proteasome. *Mol Cell Biol*. 2005 Jun;25(11):4349-58.
28. Cao K, Nakajima R, Meyer HH, Zheng Y. The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell*. 2003 Oct 31;115(3):355-67.
29. Carvalho P, Goder V, Rapoport TA. Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell*. 2006 Jul 28;126(2):361-73.
30. Cayli S. A Macrophage Migration Inhibitory Factor interactome screen identifies a complex of Jab1/CSN5 and Valosin-containing protein as an important mediator in the ubiquitin proteasome system. . Inauguraldissertation zur Erlangung des PhD an der Justus-Liebig-Universität Giessen 2008.
31. Cayli S, Klug J, Chapiro J, Frohlich S, Krasteva G, Orel L, et al. COP9 signalosome interacts ATP-dependently with p97/valosin-containing protein (VCP) and controls the ubiquitination status of proteins bound to p97/VCP. *J Biol Chem*. 2009 Dec 11;284(50):34944-53.
32. Chamovitz DA. Revisiting the COP9 signalosome as a transcriptional regulator. *EMBO Rep*. 2009 Apr;10(4):352-8.
33. Chamovitz DA, Segal D. JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO Rep*. 2001 Feb;2(2):96-101.
34. Cho YG, Cho ML, Min SY, Kim HY. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2007 Nov;7(1):65-70.
35. Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jan;6(1):79-87.
36. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: From a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Bioorg Med Chem*. 2013 Jun 15;21(12):3400-10.
37. Ciechanover A, Shkedy D, Oren M, Bercovich B. Degradation of the tumor suppressor protein p53 by the ubiquitin-mediated proteolytic system requires a novel species of ubiquitin-carrier protein, E2. *J Biol Chem*. 1994 Apr 1;269(13):9582-9.
38. Cooke G, Armstrong ME, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor (MIF), enzymatic activity and the inflammatory response. *Biofactors*. 2009 Mar-Apr;35(2):165-8.

39. Cope GA, Deshaies RJ. COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell*. 2003 Sep 19;114(6):663-71.
40. Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, et al. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science*. 2002 Oct 18;298(5593):608-11.
41. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal*. 2011 Jun;5(2):101-10.
42. Dai RM, Chen E, Longo DL, Gorbea CM, Li CC. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. *J Biol Chem*. 1998 Feb 6;273(6):3562-73.
43. Dai RM, Li CC. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol*. 2001 Aug;3(8):740-4.
44. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966 Jul;56(1):72-7.
45. de Bettignies G, Coux O. Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting. *Biochimie*. 2010 Nov;92(11):1530-45.
46. Dreveny I, Pye VE, Beuron F, Briggs LC, Isaacson RL, Matthews SJ, et al. p97 and close encounters of every kind: a brief review. *Biochem Soc Trans*. 2004 Nov;32(Pt 5):715-20.
47. Elsasser S, Finley D. Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol*. 2005 Aug;7(8):742-9.
48. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 1999 Jan;26(1):112-22, 24-5.
49. Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH, Vierstra RD. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J*. 2001 Dec 17;20(24):7096-107.
50. Gaber T, Schellmann S, Erekul KB, Fangradt M, Tykwinska K, Hahne M, et al. Macrophage migration inhibitory factor counterregulates dexamethasone-mediated suppression of hypoxia-inducible factor-1 alpha function and differentially influences human CD4+ T cell proliferation under hypoxia. *J Immunol*. 2011 Jan 15;186(2):764-74.
51. Gao P, Sun X, Chen X, Wang Y, Foster BA, Subjeck J, et al. Secretable chaperone Grp170 enhances therapeutic activity of a novel tumor suppressor, mda-7/IL-24. *Cancer Res*. 2008 May 15;68(10):3890-8.

52. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):995-1001.
53. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):373-428.
54. Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol.* 1998 Jun;18(6):3149-62.
55. Haglund K, Dikic I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.* 2005 Oct 5;24(19):3353-9.
56. Halawani D, Latterich M. p97: The cell's molecular purgatory? *Mol Cell.* 2006 Jun 23;22(6):713-7.
57. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):38-47.
58. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-79.
59. Hetfeld BK, Bech-Otschir D, Dubiel W. Purification method of the COP9 signalosome from human erythrocytes. *Methods Enzymol.* 2005;398:481-91.
60. Hitchcock AL, Krebber H, Fietze S, Lin A, Latterich M, Silver PA. The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell.* 2001 Oct;12(10):3226-41.
61. Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature.* 2009 Mar 26;458(7237):438-44.
62. Hofmann K, Bucher P. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci.* 1996 May;21(5):172-3.
63. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):49-53.
64. Hoshino T, Nakaya T, Araki W, Suzuki K, Suzuki T, Mizushima T. Endoplasmic reticulum chaperones inhibit the production of amyloid-beta peptides. *Biochem J.* 2007 Mar 15;402(3):581-9.
65. Huang X, Hetfeld BK, Seifert U, Kahne T, Kloetzel PM, Naumann M, et al. Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction. *FEBS J.* 2005 Aug;272(15):3909-17.
66. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med.* 1999 Nov 15;190(10):1375-82.

67. Indig FE, Partridge JJ, von Kobbe C, Aladjem MI, Latterich M, Bohr VA. Werner syndrome protein directly binds to the AAA ATPase p97/VCP in an ATP-dependent fashion. *J Struct Biol.* 2004 Apr-May;146(1-2):251-9.
68. Ishigaki S, Hishikawa N, Niwa J, Iemura S, Natsume T, Hori S, et al. Physical and functional interaction between Dornfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51376-85.
69. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001 Apr 20;292(5516):468-72.
70. Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, et al. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol.* 2002 Feb;4(2):134-9.
71. Jentsch S, Rumpf S. Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem Sci.* 2007 Jan;32(1):6-11.
72. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* 1997 Dec 1;57(23):5328-35.
73. Jorgensen WL, Trofimov A, Du X, Hare AA, Leng L, Bucala R. Benzisothiazolones as modulators of macrophage migration inhibitory factor. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011 Aug 1;21(15):4545-9.
74. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med.* 2009 Aug;30(4):191-296.
75. Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Nov;8(11):865-73.
76. Kaluz S, Kaluzova M, Stanbridge EJ. Does inhibition of degradation of hypoxia-inducible factor (HIF) alpha always lead to activation of HIF? Lessons learnt from the effect of proteasomal inhibition on HIF activity. *J Cell Biochem.* 2008 May 15;104(2):536-44.
77. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-63.
78. Kato JY, Yoneda-Kato N. Mammalian COP9 signalosome. *Genes Cells.* 2009 Nov;14(11):1209-25.
79. Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, et al. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature.* 2000 Nov 9;408(6809):211-6.

80. Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, et al. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol.* 1998 Jul 3;280(1):85-102.
81. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an overview. *Biochem Soc Symp.* 1999;66:1-15.
82. Larsen M, Hog A, Lund EL, Kristjansen PE. Interactions between HIF-1 and Jab1: balancing apoptosis and adaptation. Outline of a working hypothesis. *Adv Exp Med Biol.* 2005;566:203-11.
83. Larsen M, Tazzyman S, Lund EL, Junker N, Lewis CE, Kristjansen PE, et al. Hypoxia-induced secretion of macrophage migration-inhibitory factor from MCF-7 breast cancer cells is regulated in a hypoxia-inducible factor-independent manner. *Cancer Lett.* 2008 Jul 8;265(2):239-49.
84. Lee YH, Judge AD, Seo D, Kitade M, Gomez-Quiroz LE, Ishikawa T, et al. Molecular targeting of CSN5 in human hepatocellular carcinoma: a mechanism of therapeutic response. *Oncogene.* 2011 Oct 6;30(40):4175-84.
85. Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, et al. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* 1999 Aug;42(8):1601-8.
86. Leidhold C, Voos W. Chaperones and proteases--guardians of protein integrity in eukaryotic organelles. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Oct;1113:72-86.
87. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature.* 1991 Jun 6;351(6326):453-6.
88. Li QQ, Yunmbam MK, Zhong X, Yu JJ, Mimnaugh EG, Neckers L, et al. Lactacystin enhances cisplatin sensitivity in resistant human ovarian cancer cell lines via inhibition of DNA repair and ERCC-1 expression. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001;47 Online Pub:OL61-72.
89. Liu CW, Millen L, Roman TB, Xiong H, Gilbert HF, Noiva R, et al. Conformational remodeling of proteasomal substrates by PA700, the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem.* 2002 Jul 26;277(30):26815-20.
90. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res.* 1996 Jun 1;56(11):2649-54.
91. Martinelli G, Tosi P, Ottaviani E, Soverini S, Tura S. Molecular therapy for multiple myeloma. *Haematologica.* 2001 Sep;86(9):908-17.
92. Maurizi MR, Li CC. AAA proteins: in search of a common molecular basis. *International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins. EMBO Rep.* 2001 Nov;2(11):980-5.

93. Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Aug-Oct;16(4-5):523-30.
94. Mikus P, Zundel W. COPing with hypoxia. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Aug-Oct;16(4-5):462-73.
95. Miyauchi Y, Kato M, Tokunaga F, Iwai K. The COP9/signalosome increases the efficiency of von Hippel-Lindau protein ubiquitin ligase-mediated hypoxia-inducible factor- α ubiquitination. *J Biol Chem.* 2008 Jun 13;283(24):16622-31.
96. Nagahama M, Suzuki M, Hamada Y, Hatsuzawa K, Tani K, Yamamoto A, et al. SVIP is a novel VCP/p97-interacting protein whose expression causes cell vacuolation. *Mol Biol Cell.* 2003 Jan;14(1):262-73.
97. Nemajerova A, Mena P, Fingerle-Rowson G, Moll UM, Petrenko O. Impaired DNA damage checkpoint response in MIF-deficient mice. *EMBO J.* 2007a Feb 21;26(4):987-97.
98. Nemajerova A, Moll UM, Petrenko O, Fingerle-Rowson G. Macrophage migration inhibitory factor coordinates DNA damage response with the proteasomal control of the cell cycle. *Cell Cycle.* 2007b May 2;6(9):1030-4.
99. Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* 1999 Jan;9(1):27-43.
100. Niepmann M, Zheng J. Discontinuous native protein gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 2006 Oct;27(20):3949-51.
101. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009 Sep;9(9):609-17.
102. Oda S, Oda T, Nishi K, Takabuchi S, Wakamatsu T, Tanaka T, et al. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PLoS One.* 2008;3(5):e2215.
103. Ogura T, Wilkinson AJ. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells.* 2001 Jul;6(7):575-97.
104. Onodera S, Nishihira J, Koyama Y, Majima T, Aoki Y, Ichiyama H, et al. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates the expression of interleukin-8 messenger RNA in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients: common transcriptional regulatory mechanism between interleukin-8 and interleukin-1 β . *Arthritis Rheum.* 2004 May;50(5):1437-47.
105. Onodera S, Tanji H, Suzuki K, Kaneda K, Mizue Y, Sagawa A, et al. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine.* 1999 Feb;11(2):163-7.

106. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jan;6(1):9-20.
107. Pickart CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell.* 2001 Sep;8(3):499-504.
108. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503-33.
109. Pickart CM, Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Mar;5(3):177-87.
110. Pye VE, Dreveny I, Briggs LC, Sands C, Beuron F, Zhang X, et al. Going through the motions: the ATPase cycle of p97. *J Struct Biol.* 2006 Oct;156(1):12-28.
111. Ren Y, Chan HM, Fan J, Xie Y, Chen YX, Li W, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis in vitro and in vivo by targeting macrophage migration inhibitory factor in human neuroblastoma. *Oncogene.* 2006 Jun 15;25(25):3501-8.
112. Rendon BE, Willer SS, Zundel W, Mitchell RA. Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent tumor microenvironmental adaptation. *Exp Mol Pathol.* 2009 Jun;86(3):180-5.
113. Richly H, Rape M, Braun S, Rumpf S, Hoege C, Jentsch S. A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell.* 2005 Jan 14;120(1):73-84.
114. Rivett AJ, Hearn AR. Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, Peptide production, and interactions with viral proteins. *Curr Protein Pept Sci.* 2004 Jun;5(3):153-61.
115. Roger T, Froidevaux C, Martin C, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J Endotoxin Res.* 2003;9(2):119-23.
116. Santoro MG, Rossi A, Amici C. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *EMBO J.* 2003 Jun 2;22(11):2552-60.
117. Santos LL, Lacey D, Yang Y, Leech M, Morand EF. Activation of synovial cell p38 MAP kinase by macrophage migration inhibitory factor. *J Rheumatol.* 2004 Jun;31(6):1038-43.
118. Santos LL, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2009 Jan;399(1-2):1-7.
119. Scheffner M, Whitaker NJ. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol.* 2003 Feb;13(1):59-67.

120. Schenkein D. Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies. *Clin Lymphoma*. 2002 Jun;3(1):49-55.
121. Schmidt MW, McQuary PR, Wee S, Hofmann K, Wolf DA. F-box-directed CRL complex assembly and regulation by the CSN and CAND1. *Mol Cell*. 2009 Sep 11;35(5):586-97.
122. Schnell JD, Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem*. 2003 Sep 19;278(38):35857-60.
123. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 May;5(5):343-54.
124. Schubert C, Buchberger A. UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Aug;65(15):2360-71.
125. Schwechheimer C, Deng XW. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol*. 2001 Oct;11(10):420-6.
126. Schweitzer K, Bozko PM, Dubiel W, Naumann M. CSN controls NF-kappaB by deubiquitinylation of IkappaBalpha. *EMBO J*. 2007 Mar 21;26(6):1532-41.
127. Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, et al. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J*. 1998 Apr;12(6):469-78.
128. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct;3(10):721-32.
129. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992 Dec;12(12):5447-54.
130. Shah SA, Potter MW, McDade TP, Ricciardi R, Perugini RA, Elliott PJ, et al. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem*. 2001 Apr 2-27;82(1):110-22.
131. Song C, Wang Q, Li CC. Characterization of the aggregation-prevention activity of p97/valosin-containing protein. *Biochemistry*. 2007 Dec 25;46(51):14889-98.
132. Suh MH, Ye P, Datta AB, Zhang M, Fu J. An agarose-acrylamide composite native gel system suitable for separating ultra-large protein complexes. *Anal Biochem*. 2005 Aug 1;343(1):166-75.
133. Sun H, Choo-Wing R, Fan J, Leng L, Syed MA, Hare AA, et al. Small molecular modulation of macrophage migration inhibitory factor in the hyperoxia-induced mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Respir Res*. 2013;14:27.
134. Tang WK, Li D, Li CC, Esser L, Dai R, Guo L, et al. A novel ATP-dependent conformation in p97 N-D1 fragment revealed by crystal structures of disease-related mutants. *EMBO J*. 2010 Jul 7;29(13):2217-29.

135. Thoms S. Cdc48 can distinguish between native and non-native proteins in the absence of cofactors. *FEBS Lett.* 2002 Jun 5;520(1-3):107-10.
136. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 2000 Jan 4;19(1):94-102.
137. Tsuge T, Matsui M, Wei N. The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J Mol Biol.* 2001 Jan 5;305(1):1-9.
138. Uchiyama K, Jokitalo E, Kano F, Murata M, Zhang X, Canas B, et al. VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J Cell Biol.* 2002 Dec 9;159(5):855-66.
139. Uchiyama K, Kondo H. p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER. *J Biochem.* 2005 Feb;137(2):115-9.
140. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, et al. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure.* 2002 May;10(5):609-18.
141. Vale RD. AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol.* 2000 Jul 10;150(1):F13-9.
142. Verma R, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR, 3rd, Koonin EV, et al. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science.* 2002 Oct 18;298(5593):611-5.
143. Vij N. AAA ATPase p97/VCP: cellular functions, disease and therapeutic potential. *J Cell Mol Med.* 2008 Dec;12(6A):2511-8.
144. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 6;92(12):5510-4.
145. Wang Q, Song C, Li CC. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J Struct Biol.* 2004 Apr-May;146(1-2):44-57.
146. Wang Q, Song C, Yang X, Li CC. D1 ring is stable and nucleotide-independent, whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-VCP. *J Biol Chem.* 2003 Aug 29;278(35):32784-93.
147. Wang Y, Satoh A, Warren G, Meyer HH. VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments. *J Cell Biol.* 2004 Mar 29;164(7):973-8.
148. Wegele H, Muller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2004;151:1-44.

149. Wei N, Chamovitz DA, Deng XW. Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell*. 1994 Jul 15;78(1):117-24.
150. Wei N, Deng XW. Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet*. 1999 Mar;15(3):98-103.
151. Wei N, Deng XW. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:261-86.
152. Wei N, Serino G, Deng XW. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci*. 2008 Dec;33(12):592-600.
153. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ*. 2008 Apr;15(4):621-7.
154. Winner M, Koong AC, Rendon BE, Zundel W, Mitchell RA. Amplification of tumor hypoxic responses by macrophage migration inhibitory factor-dependent hypoxia-inducible factor stabilization. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):186-93.
155. Winner M, Leng L, Zundel W, Mitchell RA. Macrophage migration inhibitory factor manipulation and evaluation in tumoral hypoxic adaptation. *Methods Enzymol*. 2007;435:355-69.
156. Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature*. 2001 Dec 6;414(6864):652-6.
157. Yeung HO, Kloppsteck P, Niwa H, Isaacson RL, Matthews S, Zhang X, et al. Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. *Biochem Soc Trans*. 2008 Feb;36(Pt 1):62-7.
158. Yuan X, Shaw A, Zhang X, Kondo H, Lally J, Freemont PS, et al. Solution structure and interaction surface of the C-terminal domain from p47: a major p97-cofactor involved in SNARE disassembly. *J Mol Biol*. 2001 Aug 10;311(2):255-63.
159. Zhao G, Zhou X, Wang L, Li G, Schindelin H, Lennarz WJ. Studies on peptide:N-glycanase-p97 interaction suggest that p97 phosphorylation modulates endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 22;104(21):8785-90.
160. Zhong X, Shen Y, Ballar P, Apostolou A, Agami R, Fang S. AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45676-84.
161. Zwickl P, Baumeister W. AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death. *Nat Cell Biol*. 1999 Aug;1(4):E97-8.

9. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Publikationen:

Cayli S, Klug J, **Chapiro J**, Frohlich S, Krasteva G, Orel L, et al. COP9 signalosome interacts ATP-dependently with p97/valosin-containing protein (VCP) and controls the ubiquitination status of proteins bound to p97/VCP. *J Biol Chem.* 2009;284(50):34944-53.

Assis DN, Leng L, Du X, Zhang CK, Grieb G, Merk M, Garcia AB, McCrann C, **Chapiro J**, Meinhardt A, et al. The role of macrophage migration inhibitory factor in autoimmune liver disease. *Hepatology.* 2014;59(2):580-91.

Chapiro J, Tacher V, Geschwind JF. Intraarterial therapies for primary liver cancer: state of the art. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013;13(10):1157-67.

Chapiro J, Geschwind JF. Percutaneous therapies of hepatocellular carcinoma—an update. *Chin Clin Oncol* 2013;2(4):36. doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2013.07.04

Vorträge, Buchkapitel:

Chapiro, J., Wood, L.D., Lin, M., Cornish, T., Tacher, V., Geschwind, J.F. 3D-Evaluation of Tumor Necrosis in HCC Patients after TACE – A Radiologic-Pathologic Correlation, **RSNA 2013 (Vortrag)**

Chapiro, J., Duran, R., Lin, M., Charu, V., Wang, Z., Tacher, V., Lesage, D., Geschwind, JF. Quantitative 3D Volumetric Assessment of Tumor Response after Intra-arterial Therapy of Colorectal Cancer Metastases to the Liver - a new surrogate marker for survival **SIR 2014 (Vortrag).**

Chapiro, J., Duran, R., Reyes, J., Savic, LJ., Chettiar, Sivarajan, T., Bedja, D., Ota, S.; Geschwind, JF. Targeting Tumor Glycolysis in Pancreatic Cancer – Volumetric and Functional Tumor Response Assessment in an Orthotopic Mouse Tumor Model, **SIR 2014 (Vortrag).**

Chapiro, J., Lin, M., Duran, R., Lesage, D., Tacher, V., Wang, Z., Werner, JD., Geschwind, JF., Hong K. Quantitative Semi-Automatic 3D Assessment of Uterine Fibroids after Intra-arterial Embolization – a feasibility study, **SIR 2014 (Vortrag)**

Chapiro, J., Duran R., Geschwind, JF (2013) Buchkapitel 14: Hepatic Embolization: Primary Liver Cancer: Cholangiocarcinoma **Embolotherapy: Principles and Clinical Applications**

Chapiro, J., Duran R., Geschwind, JF (2013) Buchkapitel 14: Hepatic Embolization: Primary Liver Cancer: DEB-TACE in Hepatocellular Carcinoma, **Embolotherapy: Principles and Clinical Applications.**

10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

11. DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern, Freunden und Mentoren, die zu dieser Arbeit und meiner wissenschaftlichen Ausbildung beigetragen haben, herzlichst bedanken. Ein großer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Andreas Meinhardt. In seinem Labor wurde mir die Möglichkeit gegeben, meine wissenschaftliche Neugier in einer hervorragenden Arbeitsatmosphäre frei zu entfalten. Dank seiner Förderung erhielt ich die Chance, einen wesentlichen Teil dieser Arbeit im Labor von Prof. Richard Bucala an der Yale University School of Medicine anzufertigen. Auch Ihm gilt meine Dankbarkeit für die Förderung vor Ort und auch im Verlauf meiner wissenschaftlichen Entwicklung. Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jörg Klug, welcher stets für mich da war und meine Experimente und schließlich die Anfertigung der Dissertation mit Geduld, Rat und Tat unterstützte. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Sevil Cayli, Suada Fröhlich und Eva Wahle für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung meiner Arbeit herzlichst bedanken. Ein persönlicher Dank gilt Dr. Jean-Francois Geschwind, Herrn Sebastian Hollwegs, meiner Freundin und meiner Familie für die Unterstützung, die mir auf diesem Wege zuteil wurde.

Weiterhin möchte ich mich bei der Boehringer Ingelheim Stiftung für medizinische Grundlagenforschung sowie bei der Studienstiftung des deutschen Volkes für die großzügige Förderung im Verlauf dieser Arbeit bedanken.

12. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.