

**Untersuchungen zur Funktion
von Cullin-RING-Ligasen beim proteasomalen Abbau
der durch Hypoxie induzierbaren Faktoren**

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

vorgelegt von Kurt Michael Reichermeier
aus Deggendorf

Gießen 2014

Aus dem

Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Meinhardt

Gutachter: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 16.12.2015

Die Experimente für diese Arbeit wurden begonnen in der

- AG Meinhardt -
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

und im

- Raymond Deshaies Laboratory -
Division of Biology
California Institute of Technology
in Pasadena, USA

fortgeführt.

Als direkte Betreuer dieser Arbeit waren beteiligt:

Prof. Dr. Andreas Meinhardt
Dr. Jörg Klug
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

und

Prof. Raymond Deshaies, PhD
Willem den Besten, PhD
am California Institute of Technology

Für Elisabeth Reichermeier (1929-1982),
meine Großmutter, die ich nicht mehr kennenlernen durfte.

*Ärzte geben Medikamente, von denen sie wenig wissen,
in Menschenleiber, von denen sie noch weniger wissen, zur Behandlung
von Krankheiten, von denen sie überhaupt nichts wissen.*

Voltaire, 1694 - 1778

*Wir haben also nichts gelernt über die wahre Ursache
des Krebses, noch über seine eigentliche Natur.
Wir stehen dort, wo die Griechen standen.*

Francis Carter Wood, 1914

*Es gab wenig Erfolge bei der Behandlung von
metastasiertem Krebs ... In der Regel konnte man
nur zuschauen, wie der Tumor größer wurde
und der Patient immer kleiner.*

John Laszlo, 1996

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	1
1.1.1 Ubiquitin als Signal für spezifischen Proteinabbau	1
1.1.2 Das Proteasom – eine Protein-Entsorgungsmaschinerie	2
1.1.3 Klinische Relevanz des Ubiquitin-Proteasom-Systems	4
1.2 Die Familie der Cullin-RING-Ligasen (CRLs)	5
1.2.1 Der Nedd8-CAND1-Zyklus zur Regulation von CRLs	6
1.2.2 Die Cullin2-VHL-ElonginB/C-E3-Ligase (CRL2 ^{VBC})	8
1.2.3 Die klinische Bedeutung von Cullin-RING-Ligasen	9
1.2.4 HIFs als CRL-Substrate	10
1.2.4.1 Der klassische HIF- <i>Pathway</i>	11
1.2.4.2 Die klinische Bedeutung von HIFs	12
1.3 Die AAA-ATPase p97 im Ubiquitin-Proteasom-System	14
1.3.1 Die klinische Relevanz von p97	15
1.3.2 p97 Adapterproteine	16
1.3.3 p97, UBXD7 und CRLs	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material & Methoden	20
2.1 Materialien und Geräte	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Antikörper	23
2.1.3 Kits	24
2.1.4 Zellkultur Materialien	24
2.1.5 Expressionsvektoren	25
2.1.6 Zelllinien	25
2.1.7 Bakterielle Stämme	26
2.1.8 Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer	26
2.1.9 Geräte und Sonstiges	26
2.1.10 Rekombinante Proteine - Material für Ubiquitylierungs-assay	27
2.2 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1 Transformation von Bakterien – Inoue Methode	29
2.2.1.1 Präparation des Inoue Transformationspuffers (TB-Puffer)	29
2.2.1.2 Präparation von kompetenten Zellen	29
2.2.1.3 Transformation von kompetenten Bakterien	30
2.2.1.4 Medien für Bakterienkulturen	30
2.2.2 Gewinnung von DNA durch Plasmidpräparation	31

2.2.3 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA	31
2.2.4 DNA-Gelelektrophorese	31
2.3 Zellbiologische Methoden	33
2.3.1 Zellkultur	33
2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
2.3.3 Transiente Transfektionen	34
2.3.4 Gewinnung von Zelllysaten	34
2.3.5 Subzelluläre Fraktionierung	36
2.3.6 Transduktion von Zelllinien	37
2.3.6.1 Gewinnung von shRNA-Lentiviren	37
2.3.6.2 Gewinnung von HA-VHL-wt-Retroviren	38
2.3.6.3 Infektion von Zielzellen mit viralem Überstand	38
2.3.6.4 Selektion durch Antibiotika	39
2.4 Biochemische Methoden	40
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	40
2.4.2 Affinitätsaufreinigung von His ₆ -V5-HIF-1 α	40
2.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.4.3.1 SDS-PAGE nach Laemmli (Novex Tris-Glycin Gel)	41
2.4.4 <i>Western Blotting</i>	43
2.4.4.1 <i>Wet-Blot</i> Verfahren	43
2.4.4.2 <i>Western-Blot</i> -Detektion	43
2.5 Messung des Zeitverlaufs der Proteolyse von HIF-1/2 α	46
2.6 HIF-1 α -Peptid <i>in vitro</i> Ubiquitylierungsassay	48
2.6.1 Gewinnung von rekombinanten Proteinen	48
2.6.2 <i>In vitro</i> Ubiquitylierungsassay	48
3. Ergebnisse	51
3.1 Etablierung von Bedingungen zur Analyse des Abbaus von HIF-1/2 α	51
3.2 Identifikation des HIF-1 α Abbauprodukts HDP-80	55
3.3 <i>Knockdowns</i> von Ubx ₇ und p97 führen zu Veränderungen bei HIF-1 α -Abbau und - Ubiquitylierung	58
3.4 Abbau und Ubiquitylierung von HIF-1 α sind zu großen Teilen unabhängig von der Cullin-Neddylierung	63
3.5 Der Abbau von HIF-2 α ist unabhängig von der Cullin-Neddylierung, Ubx ₇ und p97	67
3.6 Ubx ₇ inhibiert die Ubiquitylierung eines HIF-1 α -Peptids <i>in vitro</i>	69
4. Diskussion	71
4.1 Identifikation des HIF-1 α -Abbauprodukts HDP-80	71
4.2 Die Rolle von Ubx ₇ und p97 im HIF-1 α - <i>Turnover</i> bleibt weiterhin unklar	73
4.2.1 Inhibiert Ubx ₇ die Ubiquitylierung und den Abbau von HIF-1 α ?	73
4.2.2 Ubx ₇ und p97 beeinflussen den Ubiquitylierungsstatus von HIF-1 α	76

4.3 Der HIF- <i>Turnover</i> ist großteils unabhängig von der Cullin-Neddylierung	78
4.3.1 Die Ubiquitylierung und der Abbau von HIF-1 α sind großteils unabhängig von der CRL-Neddylierung	78
4.3.2 Der Abbau von HIF-2 α ist unabhängig von Cullin-Neddylierung, Ubx α 7 und p97	80
4.3.3 HIFs sind nicht als Cullin2-Modellsubstrate geeignet	82
4.4 Ausblick	84
4.4.1 Wird HDP-80 spezifisch gespalten, und besitzt es eine eigene Funktion?	84
4.4.2 Inhibiert Ubx α 7 die Funktion von CRLs?	84
4.4.3 Sind deneddylierte CRLs <i>in vivo</i> in der Lage Substrate zu ubiquitylieren?	85
5. Zusammenfassung	86
6. Summary	87
7. Abkürzungsverzeichnis	88
8. Abbildungsverzeichnis	92
9. Literaturverzeichnis	93
10. Anhang	98
10.1 Zusätzliche Informationen zur Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen (Kapitel 2.6.1)	98
11. Publikationsverzeichnis	103
12. Ehrenwörtliche Erklärung	104
13. Danksagung	105
14. Lebenslauf	106

1. Einleitung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das ständige Abfließen biochemischer Reaktionen offenbart die Lebendigkeit einzelner Zellen verschiedener Organismen auf molekularem Niveau. Erst das Vorhandensein von Enzymen ermöglicht es bestimmte chemische Reaktionen erheblich zu beschleunigen und daraus selektiv einen Vorteil zu ziehen. Die Halbwertszeit einiger Reaktionen würde ohne Enzym als Katalysator sogar das Alter der Erde übersteigen. Die Hydrolyse einer Peptidbindung bei 25°C weist zum Beispiel eine Halbwertszeit von etwa 400 Jahren auf (Wolfenden und Snider, 2001). Heute wissen wir, dass der schnelle Abbau von intrazellulären Proteinen und Peptiden, also die Hydrolyse von Peptidbindungen, eine sehr wichtige Rolle bei regulatorischen Schlüsselmechanismen der Zelle spielt.

In den frühen 1980er Jahren entdeckten die späteren Nobelpreisträger Avram Hershko, Aaron Ciechanover und Irvine Rose den Enzymapparat, welcher einen schnellen und regulierten Abbau von intrazellulären Proteinen ermöglicht. In einer ATP-abhängigen Reaktion werden für den Abbau bestimmte Proteine mit Ubiquitin, einem 76 Aminosäuren langem Peptid, modifiziert. Das Ubiquitin wird über dessen C-Terminus durch eine Isopeptidbindung mit einem Lysin-Rest des Proteins kovalent verbunden und dient als Signal für den kontrollierten Abbau durch das 26S Proteasom (Pickart, 2004).

1.1.1 Ubiquitin als Signal für spezifischen Proteinabbau

Nur eine Poly-Ubiquitylierung mit einer Ubiquitin-Kette, bestehend aus mindestens vier über Lysin-48-Reste (K-48) verbundenen Ubiquitin Molekülen, markiert Proteine für die Proteolyse durch das 26S Proteasom (Abb. 1.1.). Eine Verknüpfung über Lysin-63-Reste stellt beispielsweise ein nicht-proteolytisches Signal für DNA-Reparatur oder Signaltransduktion dar (Deshaies und Joazeiro, 2009).

Der Poly-Ubiquitylierungsprozess erfordert den Ablauf verschiedener Konjugationsschritte, katalysiert durch Ubiquitin-aktivierende (E1), Ubiquitin-konjugierende (E2) und Ubiquitin-ligierende (E3) Enzyme. Zuerst aktiviert E1 das Ubiquitin unter ATP-Verbrauch und formt ein C-terminales Ubiquitin-Adenylat, welches dann in Form einer Thioesterbindung an einen Cystein-Rest des E1 übertragen wird. In einem weiteren

Schritt wird Ubiquitin dann ebenfalls über einen Thioester an E2 gebunden. In einer letzten Reaktion wird Ubiquitin schließlich in Abhängigkeit von einer E3-Ubiquitin-Ligase an einen Lysin-Rest des Substrats übertragen. Um eine kontrollierte und spezifische Ubiquitylierung zu gewährleisten, besitzen eukaryotische Zellen mehrere hundert substratspezifische E3-Ligasen, nur etwa fünfzig E2-Enzyme und nur ein E1-Enzym. In Eukaryoten werden die E3-Ligasen in zwei Hauptgruppen eingeteilt: die HECT-Ligasen und RING-Ligasen. Während die Gruppe der HECT-Ligasen sowohl das Substrat als auch das Ubiquitin über einen Thioester direkt bindet, besitzen RING-Ligasen sowohl Rezeptorproteine für Substrate als auch für E2-Enzyme (Pickart, 2004).

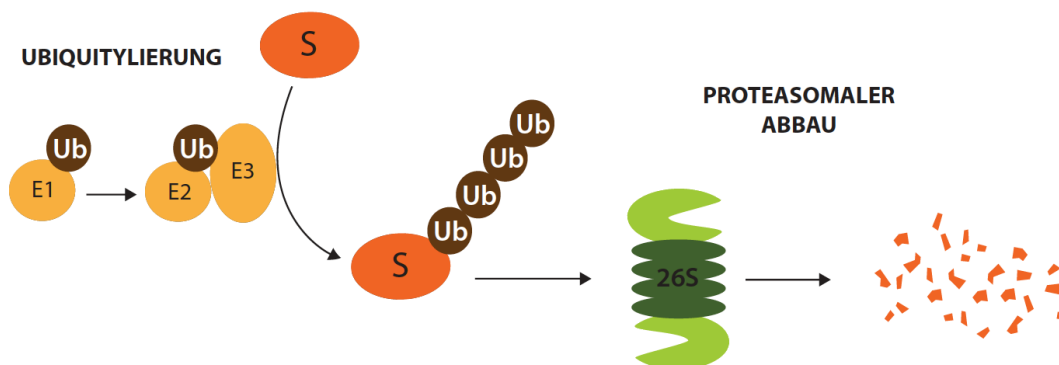


Abbildung 1.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Ein zum Abbau bestimmtes Substrat S wird durch eine Kaskade von Reaktionen ubiquityliert. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) überträgt das Peptid Ubiquitin auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2), welches zusammen mit der Ubiquitin-Ligase (E3) das Substrat ubiquityliert. Für die Erkennung durch das 26S Proteasom und den anschließenden Abbau, müssen mindestens vier Ubiquitin-Moleküle über eine Lysin-48-Verbindung zu einer Kette verbunden werden (Abbildung modifiziert nach R. J. Deshaies & C. A. P. Joazeiro, Annu. Rev. Biochem. 2009).

1.1.2 Das Proteasom – eine Protein-Entsorgungsmaschinerie

Als Mitglied der Gruppe von „*chambered proteases*“ bildet das 26S Proteasom die Hauptentsorgungsmaschinerie für intrazelluläre Proteine. Die bemerkenswerte genetische Konservierung der generellen, kammerartigen Struktur dieser Proteasen von Archaeobakterien bis zum Menschen zeigt die Bedeutung dieses Enzymkomplexes. Das 26S Proteasom setzt sich aus einem fassförmigen 20S-Kernpartikel (20S-KP) und einem 19S-Regulatorischen Partikel (19S-RP) zusammen (Abb. 1.2.). Das 20S-KP besteht aus vier gestapelten Ringen, gebildet aus jeweils sieben Untereinheiten, und

besitzt die eigentliche proteolytische Aktivität. In der aktiven Komposition wird das 20S-KP an einer oder beiden Seiten der proteolytischen Kammer durch ein 19S-RP ergänzt. Diese Interaktion von 20S-KP und 19S-RP ist obligat für die Funktionalität des Proteasom-Komplexes. Das 19S-RP setzt sich aus einer „*Base*“ und einem „*Lid*“ zusammen. Die *Base*-Untereinheit bildet einen weiteren Ring aus sechs Untereinheiten mit ATPase-Funktion zur Entfaltung des Substrats und die *Lid*-Untereinheit beherbergt zum einen den Ubiquitinrezeptor und zum anderen eine Deubiquitylierungsfunktion. Dieser Ubiquitinrezeptor erkennt spezifisch K-48-Poly-Ubiquitinketten und somit poly-ubiquitylierte Substrate. Nach Erkennen und Binden des Substrats wird dieses vom *Lid* des 19S-RP deubiquityliert und von der *Base* entfaltet. Anschließend kann es in die Kammer des 20S-KP aufgenommen und zu Peptiden abgebaut werden (Pickart und Cohen, 2004).

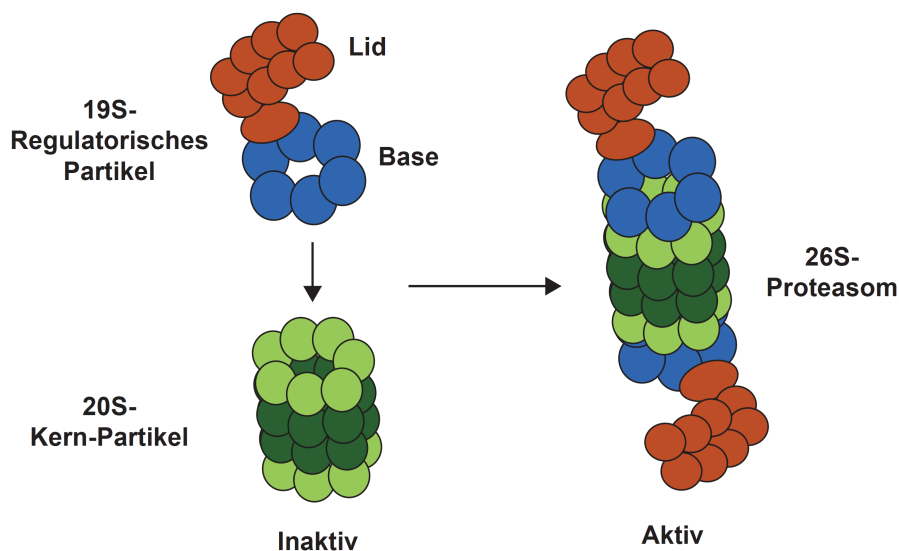


Abbildung 1.2. Zusammensetzung des 26S Proteasom Komplexes in *S. cerevisiae*. Das 20S-Kern-Partikel (20S-KP) bildet eine fassartige Struktur aus vier Ringen und besitzt proteolytische Aktivität. In der aktiven Komposition des Proteasoms wird das 20S-KP auf einer oder beiden Seiten durch das 19S-Regulatorische Partikel (19S-RP) ergänzt. Das 19S-RP besteht aus einer *Base*- und einer *Lid*-Untereinheit. Während die *Base* ATPase-Funktion zur Substratentfaltung besitzt, beherbergt das *Lid* den Ubiquitinrezeptor und Deubiquitylierungsfunktion (Abbildung modifiziert nach C. M. Pickart and R. E. Cohen, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004).

1.1.3 Klinische Relevanz des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Der regulierte Abbau von intrazellulären Proteinen durch das 26S Proteasom hat eine große Bedeutung für die meisten Schlüsselmechanismen eukaryotischer Zellen, wie zum Beispiel die Zellzykluskontrolle, die Regulation der Transkription oder die intrazelluläre Qualitätskontrolle von fehlgefalteten Proteinen. Der klassische Tumorsuppressor p53, mit zentraler Rolle in *DNA Damage Response* (DDR) Signalwegen, wird zum Beispiel über die MDM2-E3-Ligase und das UPS abgebaut und reguliert. In mehr als 50 % aller Krebsarten findet sich eine Dysregulation von p53 durch verschiedene Mutationen (Reinhardt und Schumacher, 2012). Der Hypoxie induzierbare Faktor 1 α (HIF-1 α), ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Hypoxieantwort, wird ebenfalls durch die Cullin2-RING-E3-Ligase und das UPS abgebaut und spielt eine Schlüsselrolle in der Reprogrammierung von Krebszellen, insbesondere beim Glukosemetabolismus und der Gefäßneubildung (Semenza, 2010a). Auch bei Myokarderkrankungen und der Atherosklerose spielt die Funktionalität des UPS eine entscheidende Rolle. Die UPS Aktivität beeinflusst beispielsweise das kardiale *Remodeling* und das *Outcome* bei Kardiomyopathien und Myokardinfarkten (Drews und Taegtmeyer, 2014). Als Regulator von Schlüsselfunktionen wie der Zellproliferation, der Apoptose und des oxidativen Stresses scheint das UPS in bestimmten Stadien der Atherosklerose die Atherogenese zu begünstigen (Wilck und Ludwig, 2014).

Eingebunden in fundamentale, regulatorische Mechanismen bietet das UPS einen Angriffspunkt für vielfältige, pathogene Mutationen oder Dysregulationen und ist daher auch ein interessantes Ziel für neue Pharmaka. Als erster Proteasominhibitor wurde in 2003 Bortezomib von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von Multiplen Myelomen und Mantelzell-Lymphomen zugelassen (Kane *et al.*, 2003). Als Proteasominhibitor der ersten Generation blockiert Bortezomib unspezifisch den Abbau aller Proteasomsubstrate. 2012 folgte die FDA-Zulassung eines Proteasominhibitors der zweiten Generation namens Carfilzomib (Katsnelson, 2012; Herndon *et al.*, 2013).

Mehr als zehn Jahre nach der Zulassung des ersten Proteasominhibitors, werden mittlerweile zahlreiche weitere in klinischen Studien angewandt, wie zum Beispiel Marizomib und MLN9708 (Kisselev *et al.*, 2012; Moreau *et al.*, 2012). Erst vor kurzem wurde mit RA190 ein neuer, spezifischer Proteasominhibitor entdeckt, der speziell in Tumorzellen wirkt (Anchoori *et al.*, 2013; Kisselev, 2013).

Der Erfolg im klinischen Einsatz lässt auch weiterhin auf die Identifikation und Entwicklung moderner und spezifischer Inhibitoren des UPS hoffen.

1.2 Die Familie der Cullin-RING-Ligasen (CRLs)

RING-Ubiquitin-Ligasen sind eine genetisch von Hefen bis zum Menschen konservierte Gruppe von potentiell 616 exprimierbaren Proteinen. Im Kern der namensgebenden RING-Finger-Domänen dieser Enzymkomplexe befinden sich konservierte Cystein- und Histidin-Reste, welche zwei Zinkatome binden und somit, anders als etwa bei Zinkfingerdomänen, eine kompakte und starre Plattform für Protein-Protein-Interaktionen bilden (Deshaies und Joazeiro, 2009).

Als Teil des UPS sind RING-Ubiquitin-Ligasen verantwortlich für die spezifische Ubiquitylierung von Substratproteinen und vermitteln somit den darauffolgenden proteasomalen Abbau jener

Proteine. RING-Ligasen können sowohl tumorsuppressiv als auch onkogen wirken, da beispielsweise eine Reihe von Regulatorproteinen des Zellzyklus, der Zellproliferation oder der Apoptose ihre Substrate bilden. Eine SCF-RING-Ligase (Abb. 1.3.) ubiquityliert zum Beispiel den *G1/S Cyclin-dependent-kinase* Inhibitor p27 was bei Überexpression von SCF zu einer fehlerhaften *G1/S-Checkpoint*-Kontrolle führt (Lipkowitz und Weissman, 2011).

Bei der Untergruppe der Cullin-RING-Ligasen (CRLs) bildet typischerweise ein Cullinprotein die Plattform des Enzymkomplexes und bindet sowohl ein RING-Protein als auch verschiedene Adapterproteine für spezifische Substratrezeptoren. Um eine Vielfalt an Substratspezifität zu gewährleisten, können verschiedene Kombinationen aus Cullinproteinen mit mehreren RING-Proteinen und substratbindenden Untereinheiten funktionelle Enzymkomplexe bilden (Deshaies und Joazeiro, 2009).

Um eine spezifische Erkennung durch die Substratrezeptoren der RING-Ligasen zu vermitteln, werden Substratproteine posttranslational durch Phosphorylierung, Glykosylierung, SUMOylierung oder Hydroxylierung modifiziert (Lipkowitz und Weissman, 2011).

Die Funktionalität von Cullin-RING-Ligasen besitzt folgende wichtige Charakteristika:

- 1) Die meisten RING-Proteine besitzen intrinsische E3-Aktivität (Ubiquitin-Transferaktivität).
- 2) RING-Domänen binden und aktivieren E2-Enzyme.
- 3) CRLs transferieren Ubiquitin direkt vom E2 zum Substrat.
- 4) E2 und Substrat interagieren

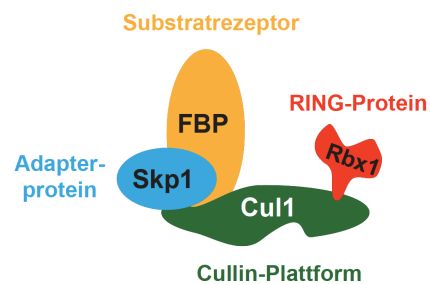


Abbildung 1.3. Aufbau eines CRL-Komplexes am Beispiel einer SCF-RING-Ligase. Das Protein Cullin1 dient als Plattform für den CRL-Komplex und bindet am C-terminalen Ende das RING-Protein. Am N-terminalen Ende wird über Adapterproteine ein Substratrezeptor gebunden (adaptiert nach Deshaies, R.J. et al. (2010) *Subcell Biochem* 54, 41-56.).

mit CRLs an unterschiedlichen Bindungsstellen. 5) Ubiquitinketten können entweder am Substrat gebildet oder *en bloc* vom E2 transferiert werden (Deshaies und Joazeiro, 2009).

1.2.1 Der Nedd8-CAND1-Zyklus zur Regulation von CRLs

Die molekularen Mechanismen, welchen die CRL-Substratrekrutierung und -bindung zu Grunde liegen, wurden bereits detailliert untersucht, während der Prozess der Substratubiquitylierung durch CRLs viele Fragen offen lässt. Um die Ubiquitylierung zu initiieren, muss der Lysin-Rest des Substrats in Reichweite des am E2 gebundenen Ubiquitins gebracht werden. Erste strukturelle und funktionelle Studien dazu befassten sich mit einem SCF-CRL-Komplex (zusammengesetzt aus Cullin1, dem RING-Protein Rbx1 und dem über das Adapterprotein Skp1 gebundenen F-Box-Substratrezeptor) als Prototyp-CRL und ermöglichten eine dreidimensionale Darstellung des CRL-Komplexes. Am C-terminalen Ende der Cullin-Plattform befindet sich das E2, gebunden am RING-Protein, wobei das Substrat, gebunden an den Substratrezeptor, am N-terminalen Ende lokalisiert ist. Paradoxerweise zeigte sich eine relativ große Lücke von rund 50 Å zwischen dem CRL-gebundenen Substrat und dem aktiven Zentrum des am RING-Protein gebunden E2. Erst die Beobachtung der Modifizierung von CRLs durch das Ubiquitin-ähnliche Protein Nedd8 - Neddylierung genannt - und weitere strukturelle Untersuchungen konnten dieses Paradoxon erklären. Ähnlich wie bei der Ubiquitylierung selbst, ist für die Neddylierung der CRLs an einem spezifischen Lysin-Rest eine Kaskade mit folgenden Enzymen notwendig: 1) Nedd8-aktivierendes-Enzym (NAE), 2) Nedd8-konjugierendes Enzym (Ubc12) und 3) RING-Protein (Rbx1/Rbx2) sowie die Nedd8-E3-Ligase Dcn1 (Deshaies *et al.*, 2010). Die Neddylierung von CRLs stimuliert deren Ubiquitylierungs-Aktivität durch eine deutliche strukturelle Änderung des CRL-Komplexes. Durch die Neddylierung wird das sonst breit an der Cullinoberfläche angelagerte RING-Protein gelöst, bleibt aber durch die RING-Domäne mit Cullin verbunden. Dadurch wird die E2, gebunden am RING-Protein, förmlich in die Nähe des Substrats „katapultiert“. Somit wird die Lücke zwischen Substrat und aktivem Zentrum des E2 geschlossen, und die Ubiquitylierung kann initiiert werden. Zusammengefasst führten diese Beobachtungen zur Hypothese, dass CRLs durch Neddylierung in ihren aktiven Zustand versetzt werden (Duda *et al.*, 2008).

Weitere Studien zeigten, dass die CRL-Neddylierung als reversibler Prozess Teil eines obligatorischen Zyklus von ständiger Neddylierung und Deneddylierung ist (Abb. 1.4.). Das Enzym, welches die CRLs deneddyliert ist das COP9-Signalosom (CSN), ein aus

neun Untereinheiten bestehender Komplex (Lyapina *et al.*, 2001). Die Untereinheit CSN5 beherbergt eine JAMM-Domäne mit Nedd8-Isopeptidasefunktion, wodurch Nedd8 von CRLs abgespalten werden kann (Cope *et al.*, 2002).

Ein weiterer Bestandteil dieses Zyklus ist das Protein CAND1, welches CRLs im deneddylierten und somit inaktiven Status bindet und zunächst die Bindung von Adapterproteinen verhindert (Zheng *et al.*, 2002). Erst die erneute Neddylierung zusammen mit Rekrutierung von neuen Adapterproteinen, verdrängt CAND1 und versetzt die CRLs zurück in den aktiven Status (Liu *et al.*, 2002; Bornstein *et al.*, 2006). Im Einklang mit seiner Funktion *in vitro*, verhält sich das CSN auch *in vivo* als Inhibitor von CRLs. Trotzdem wurde in genetischen Studien gezeigt, dass das CSN für eine korrekte Ubiquitylierung notwendig ist. Diesen sich anscheinend widersprechenden Ergebnissen liegt vermutlich ein Auto-Ubiquitylierungsmechanismus zu Grunde, welcher bei Verlust der CRL-Inhibierung sowohl Substratrezeptoren als auch Cullinproteine ubiquityliert, was zu deren proteasomalem Abbau führt. Dies wiederum führt zu geringeren Proteinkonzentrationen von funktionellen CRL-Komplexen und zur Stabilisierung ihrer Substrate. Auch CAND1 zeigt sich *in vitro* als Inhibitor von CRLs, wobei sich ein CAND1 Verlust *in vivo* in reduzierter Ubiquitylierungsaktivität äußert. Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass sowohl die Neddylierung als auch die Deneddylierung, also der ständige Wechsel von Zusammensetzung und Zerlegung eines CRL-Komplexes, für die Funktion der CRLs obligatorisch sind (Deshaies *et al.*, 2010).

Neueste Ergebnisse konnten kürzlich das Paradoxon um die widersprüchlichen biochemischen und genetischen Daten zur Funktion von CAND1 bei der Regulation von CRLs erklären. CAND1 fungiert demzufolge als Proteinaustauschfaktor für die Substratrezeptorproteine der CRLs indem es die Dissoziation des SCF-Komplexes um das 10^6 -fache verstärkt und zusätzlich die Zusammensetzung zu einem neuen Komplex mit einem anderen Substratrezeptor entscheidend begünstigt (Pierce *et al.*, 2013).

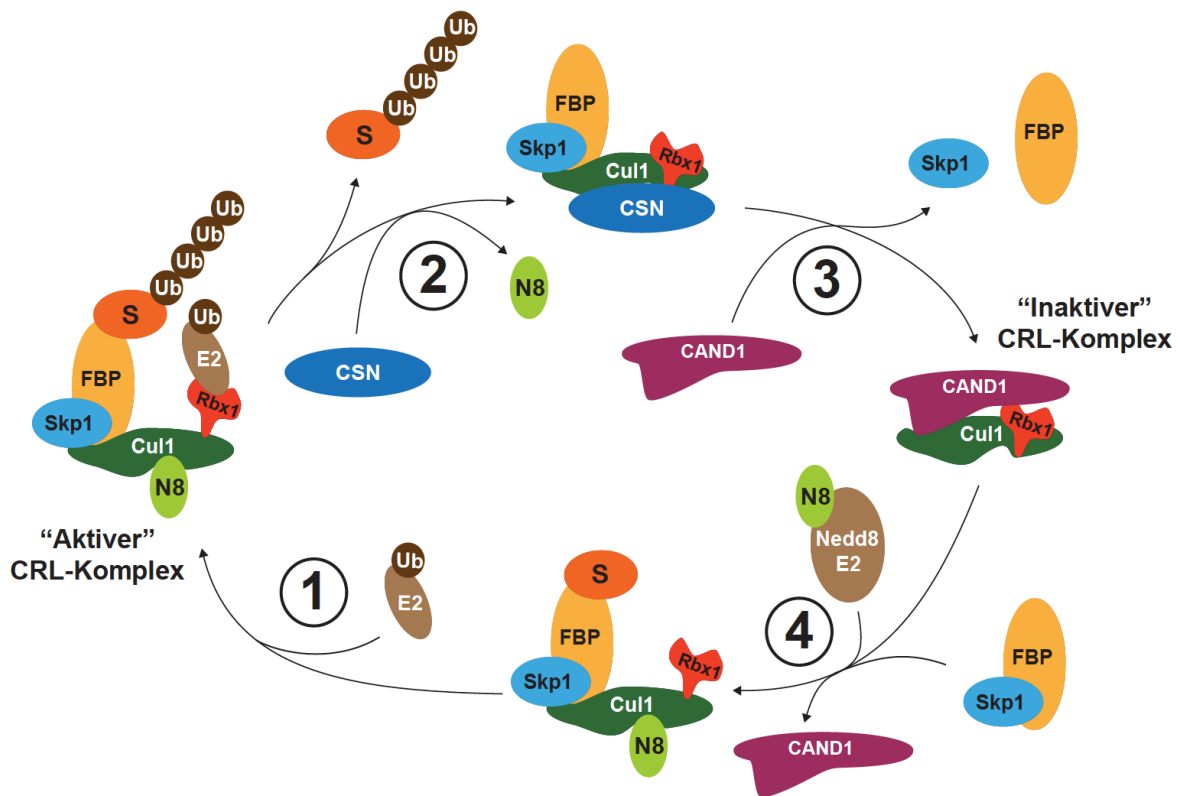


Abbildung 1.4. Der Nedd8-CAND1-Zyklus am Beispiel eines SCF-CRL-Komplexes. (1) Der SCF-Komplex liegt neddyliert (aktiv) vor und ubiquityliert das Substrat S via E2. (2) Nach Freiwerden des ubiquitylierten Substrates wird der SCF-Komplex durch das CSN deneddyliert. (3) CAND1 bindet an den SCF-Komplex und verdrängt das Adapterprotein Skp1 und das als Substratrezeptor dienende F-Box Protein FBP. (4) Die erneute Neddylierung des SCF-Komplexes und die gleichzeitige Rekrutierung von Adapterprotein und F-Box Protein verdrängen CAND1 und versetzen den SCF-Komplex in seine aktive Konformation zurück (adaptiert nach Deshaies, R.J. et al. (2010) *Subcell Biochem* 54, 41-56.).

1.2.2 Die Cullin2-VHL-ElonginB/C-E3-Ligase (CRL2^{VBC})

Der Cullin2-VHL-ElonginB/C-Komplex (CRL2^{VBC}) bildet eine Cullin-RING-Ligase und wird zusammen mit Cullin5 enthaltenden Komplexen der CRL-Unterfamilie der Elongin B und C bindenden CRLs zugeordnet. Der CRL2^{VBC}-Komplex setzt sich zusammen aus dem Plattformprotein Cullin2, dem RING-Protein Rbx1 und den Adapterproteinen Elongin B und C zur Rekrutierung des Substratrezeptors VHL (von Hippel-Lindau Protein) (Abb. 1.5.). Im Gegensatz zu den strukturell eng verwandten und bereits erwähnten SCF-RING-Ligasen, ist über Elongin B/C-CRLs bis heute noch sehr wenig bekannt (Okumura *et al.*, 2012).

Bereits früh konnte gezeigt werden, dass VHL zusammen mit Elongin B/C und Cullin2 einen Komplex bildet und die Konzentrationen von durch Hypoxie induzierbaren mRNAs negativ beeinflusst (Lonergan *et al.*, 1998). Bald darauf wurden die durch Hypoxie induzierbaren Faktoren (HIFs) als Zielproteine des CRL2^{VBC}-Komplexes erkannt (Maxwell *et al.*, 1999), welche durch Hydroxylierung modifiziert und somit für die Erkennung durch den Substratrezeptor VHL markiert werden (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001). Die HIFs stellen bis heute die am besten studierten Substrate für den CRL2^{VBC}-Komplex dar und zeigen sich für einen Großteil der tumorsuppressiven Rolle von VHL verantwortlich. Als weitere VHL-Substrate wurden bisher der epidermale

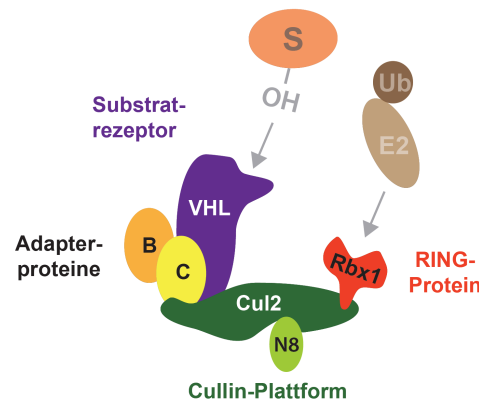


Abbildung 1.5. Aufbau der Cullin2-VHL-ElonginB/C-E3-Ligase (CRL2^{VBC}). Die CRL2^{VBC} ähnelt in ihrer Zusammensetzung und Funktion dem SCF-Komplex (Abb. 1.3). Über das RING-Protein Rbx1 am C-terminalen Ende der Cullin2-Plattform wird das E2 rekrutiert. Am N-terminalen Ende wird mit Unterstützung des Adapterprotein-Komplexes, bestehend aus Elongin B und C, der Substratrezeptor VHL gebunden. VHL bindet hochspezifisch hydroxylierte Substrate (adaptiert nach Okumura *et al.* (2012), Front Oncol 2, 10.)

Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), die atypische Proteinkinase C (PKC), Sprouty2, der β -adrenerge Rezeptor II und das *Myb-binding* Protein p160 identifiziert, welche im Falle einer Dysregulation von VHL ebenfalls zu Tumorwachstum beitragen könnten (Zhang und Yang, 2012).

1.2.3 Die klinische Bedeutung von Cullin-RING-Ligasen

Cullin-RING-Ligasen bilden ca. 40 % aller E3-Ubiquitin Ligasen des UPS, und der Abbau von ca. 20 % aller intrazellulären Proteine ist abhängig von CRLs (Soucy *et al.*, 2009). Unter den tausenden CRL-Substraten befinden sich eine Reihe von Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressoren und Proto-onkogenen. Die Beteiligung von CRLs an der Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten zeigt ihre wichtige regulatorische Funktion. Cullin1 als Teil des SCF-Komplexes ist zum Beispiel in 40 % aller Lungenkarzinome überexprimiert, und Cullin5 wurde als Tumorsuppressor identifiziert, welcher bei Überexpression das Wachstum von Brustkrebszellen hemmt. Die meisten CRL-bezogenen Studien beschreiben Cullin4A als überexprimiert in einer Vielzahl von Malignitäten, wie zum Beispiel Brustkrebs, dem hepatozellulären Karzinom oder dem Mesotheliom (Jia und Sun,

2011). Mutationen des Cullin2-Substratrezeptors VHL führen zum familiären VHL-Syndrom, welches sich typischerweise in hochvaskularisierten, malignen sowie benignen Tumoren äußert. Die häufigsten Tumore sind Nierenzellkarzinome, Hämangioblastome und Phäochromozytome. Erhöhte Konzentrationen von HIFs durch Dysregulation ihres Abbaus zeigen sich verantwortlich für einen Großteil der Pathophysiologie des VHL-Syndroms (Bader und Hsu, 2012).

Durch die große Bedeutung für die Vielzahl von zellulären Funktionen und die Verbindung mit vielen malignen Erkrankungen wurden die Enzymkomplexe des UPS schnell als mögliches Angriffsziel für neue Pharmaka erkannt. Wie schon unter 1.1.3 beschrieben, sind mit Bortezomib (USA/EU) und Carfilzomib (nur USA) bereits Inhibitoren des Proteasoms für den klinischen Gebrauch zugelassen. Ein neues Medikament (MLN4924) welches nur den Abbau von CRL-Substraten beeinflusst, wurde in 2009 beschrieben. MLN4924 ist ein NAE-Inhibitor (Nedd8-aktivierendes Enzym), welcher CRLs in den deneddyltierten und somit inaktiven Status versetzt, was zur Akkumulation der CRL-Substrate führt (Soucy *et al.*, 2009). Weitere Präparate die das UPS über Deubiquitylierungsenzyme, Ubiquitin E1 Enzyme oder E2 Enzyme beeinflussen, befinden sich momentan in Entwicklung (Skaar *et al.*, 2014).

1.2.4 HIFs als CRL-Substrate

Die durch Hypoxie induzierbaren Faktoren (HIFs) wurden bereits 1991 als Faktoren identifiziert, welche die Transkription von Erythropoetin (EPO) unter Hypoxie induzieren und somit der eukaryotischen Zelle als Hypoxyiesensor für die Hypoxieantwort dienen (Semenza *et al.*, 1991). Die HIFs gehören zu der Gruppe von *Helix-Loop-Helix-PAS-Domain* Transkriptionsfaktoren. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Sauerstoffhomöostase vieler Organismen und kontrollieren mehrere hundert Zielgene in unterschiedlichen Zelltypen. Das gesamte HIF-1 Transkriptom enthält wahrscheinlich mehrere tausend Zielgene, viele mit entscheidender Bedeutung für die Entwicklung und Physiologie der Zelle (Semenza, 2007). Zu der Vielzahl von HIF-Zielgenen zählen unter anderem der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Angiopoetin 2 (Ang2) als Faktoren der Angiogenese, das EPO als Regulator der Erythropoese, das *breast cancer anti-estrogen resistance protein 1* (CAS) und die Carboanhydrase 12 (CA12) als Faktoren der pH-Homöostase und Enzyme des Glukosemetabolismus (Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2009).

1.2.4.1 Der klassische HIF-Pathway

Der HIF-1-Transkriptionsfaktor ist ein Heterodimer und setzt sich aus einer O₂-regulierten HIF-1 α -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten HIF-1 β -Untereinheit zusammen. HIF-1 β liegt in der Zelle also ständig im Überfluss vor, wobei HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich synthetisiert und sofort wieder abgebaut wird. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α stabilisiert, bindet HIF-1 β und die transkriptionellen Coaktivatoren p300 und [*cAMP Response Element Binding Protein (CREB)*] *Binding Protein* (CBP) und induziert die Transkription von bestimmten Zielgenen (Semenza, 2007) (Abb. 1.6.).

HIF-1 α wird unter Normoxie an zwei Prolinresten (P⁴⁰² und P⁵⁶⁴) durch die Prolylhydroxylase PHD2 in Abhängigkeit von α -Ketoglutarat, O₂ und Fe²⁺ hydroxyliert (Bruick und McKnight, 2001; Yu *et al.*, 2001). Diese Modifikation an der *oxygen-dependent-degradation-domain* (ODD-Domäne) dient als Degron und vermittelt die Bindung an VHL. VHL wiederum bildet den Substratrezeptor für die CRL2^{VBC}-E3-Ligase, welche HIF-1 α ubiquityliert und dem proteasomalen Abbau zuführt (siehe 1.2.2). Außerdem wird HIF-1 α durch den *Factor Inhibiting HIF-1* (FIH-1) an einem Asparaginrest (Asn⁸⁰³) hydroxyliert, wodurch die Bindung an p300 und CBP blockiert wird (Peet und Linke, 2006). Unter Sauerstoffmangel sind die Hydroxylierungsraten von PHD2 sowie FIH-1 stark reduziert, da weniger Sauerstoff als Substrat zur Verfügung steht. Dadurch wird HIF-1 α stabilisiert und kann nun an die transkriptionellen Coaktivatoren sowie HIF-1 β binden. HIF-2 α ist ein zu HIF-1 α homologes Protein, wobei 48% der Aminosäuren identisch sind. HIF-2 α wird wie HIF-1 α sauerstoffabhängig reguliert und bindet als Heterodimer mit HIF-1 β an die gleiche DNA-Zielsequenz (Tian *et al.*, 1997). Die Zielgene von HIF-1 α und HIF-2 α überlappen zwar, sind aber dennoch unterschiedlich. Je nach Zelltypus kann zum einen die Expression von HIF-1 α und HIF-2 α variieren und zum anderen die Expression der Zielgene (Hu *et al.*, 2006).

Neben dem klassischen und am besten verstandenen O₂- und CRL^{VBC}-abhängigen HIF-Pathway wurden kürzlich weitere, unter anderem O₂-unabhängige, Abbauwege für HIF-1 α beschrieben. Über die physiologische Rolle dieser alternativen Abbauwege und deren Bedeutung ist im Vergleich zum klassischen HIF-Pathway noch wenig bekannt (Semenza, 2007).

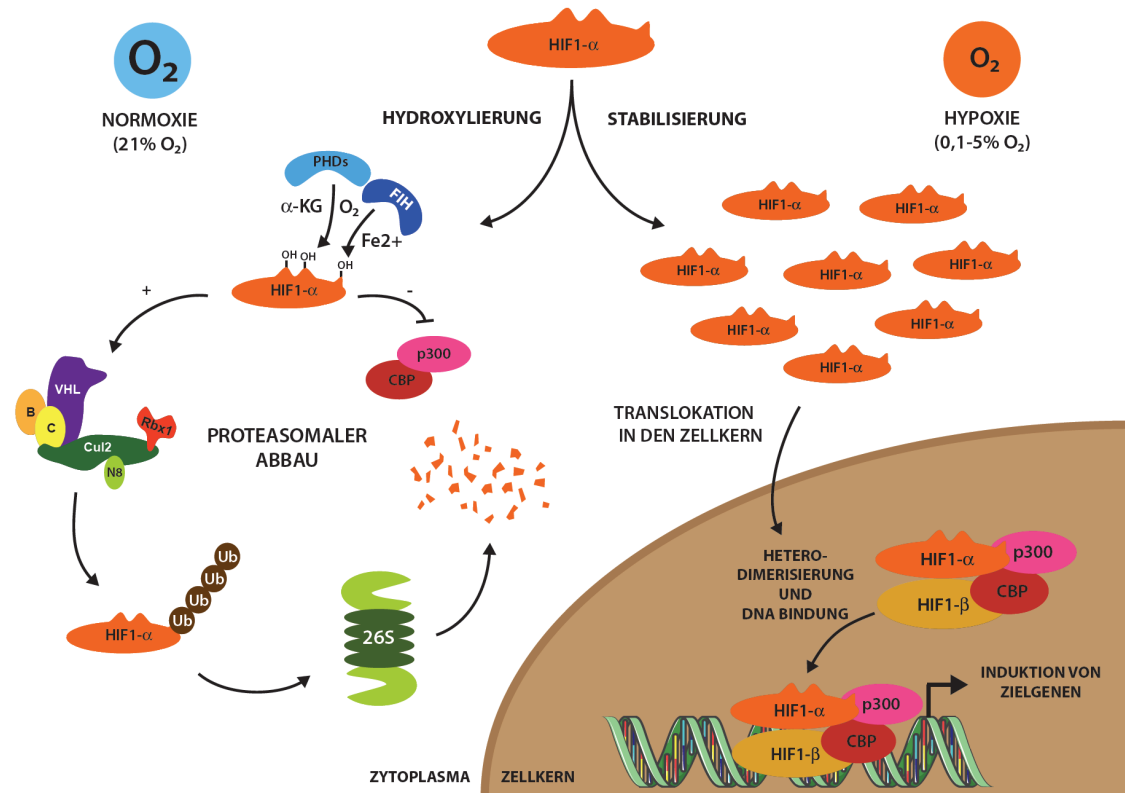


Abbildung 1.6. Der klassische HIF-Pathway am Beispiel von HIF-1α. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF-1α durch Prolyl-Hydroxylasen (PHDs) und den *Factor Inhibiting HIF-1* (FIH-1) hydroxyliert. Dies blockiert zum einen die Interaktion mit den transkriptionellen Coaktivatoren p300 und CBP und vermittelt zum anderen die Bindung an den CRL2^{VBC}-Komplex. CRL2^{VBC} polyubiquityliert HIF-1α und vermittelt dessen proteasomalen Abbau. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1α stabilisiert und transloziert in den Zellkern. HIF-1α heterodimerisiert mit HIF-1β, bindet p300 und CBP und induziert die Transkription von Zielgenen (Abbildung modifiziert nach Semenza, 2007).

1.2.4.2 Die klinische Bedeutung von HIFs

Die grundlegende Rolle von HIFs für physiologische Mechanismen legt nahe, dass diese Transkriptionsfaktoren auch eine große klinische Bedeutung besitzen. HIFs sind in viele verschiedene zelluläre Prozesse involviert und können für bestimmte Krankheiten entweder eine protektive Wirkung besitzen oder zur Pathogenese beitragen. Als Faktor der Hypoxieantwort sind HIFs bei Krankheiten mit ischämischen Zuständen von besonderer Bedeutung. Bei der koronaren Herzkrankheit (KHK) ist HIF-1α ein wichtiger Regulator der Bildung von Kollateralgefäßen und des

Präkonditionierungsphänomens (Cai *et al.*, 2008; Eckle *et al.*, 2008). Patienten mit fortgeschrittener peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) könnten in Zukunft von einer Kombinationstherapie aus Stammzellinjektion (Injektion von *bone marrow-derived angiogenic cells*) und Gentherapie mit einem rekombinanten Adenovirus, der für eine konstitutiv exprimierte Form von HIF-1 α kodiert, profitieren. Protektive Effekte für HIF-1 α wurden unter anderem für Wundheilung, Organtransplantation oder chronische Kolitis beschrieben (Semenza, 2012).

Im Gegensatz zu einer protektiven Wirkung kann HIF-Aktivität auch entscheidend zur Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder beitragen. Durch sehr schnelle Zellproliferation besitzen viele Tumore hypoxische Regionen, und deren Wachstum und Sauerstoffversorgung ist daher weitgehend abhängig von Gefäßneubildung. Es konnte gezeigt werden, dass HIFs in vielen Bereichen der Biologie von Krebszellen eine Schlüsselrolle besitzen und hohe Konzentrationen von HIF-1 α mit erhöhtem Tumorwachstum und schlechter Prognose einhergehen (Semenza, 2010b). Als weitere Krankheitsbilder bei denen HIFs zur Pathogenese beitragen, gelten der traumatische Schock und die pulmonale arterielle Hypertonie (Feinman *et al.*, 2010; Shimoda und Semenza, 2011).

Aufgrund dieser Schlüsselrolle bei verschiedenen Krankheiten bieten HIFs vielversprechende Ziele für zukünftige Medikamente. So befinden sich zum Beispiel bereits Inhibitoren der PHDs in Entwicklung, welche zu einer Erhöhung von HIF-Konzentrationen führen und bei Krankheiten mit ischämischen Zuständen eingesetzt werden könnten. Andererseits könnten speziell Krebspatienten bald von spezifischen HIF-Inhibitoren in Kombinationstherapien profitieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Vielzahl von heute eingesetzten Medikamenten, wie etwa Cyclosporin, Bortezomib oder Ibuprofen, die HIF-Aktivität hemmen (Semenza, 2012).

1.3 Die AAA-ATPase p97 im Ubiquitin-Proteasom-System

Das Protein p97, auch *valosin-containing protein* (VCP) genannt, ist ein Ubiquitin-spezifisches Chaperon und gehört der Familie der AAA-ATPasen (*ATPasen associated with diverse cellular activities*) an. Der homohexamere Enzymkomplex beherbergt eine Reihe wichtiger Funktionen für den Ubiquitin-abhängigem Proteinabbau und in grundlegenden intrazellulären Signalwegen. In den meisten Studien wird p97 als Chaperon oder Segregase in Ubiquitin-abhängigen Prozessen beschrieben, wobei p97 ubiquitylierte Proteine bindet und diese dann aus Proteinkomplexen oder Membranen extrahiert, um sie dem proteasomalen Abbau zuzuführen. Weitere Funktionen wurden kürzlich für Autophagie, endosomale Sortierung, endoplasmatisches Retikulum assoziierten Proteinabbau (ERAD) und Proteinabbau an der äußeren Mitochondrienmembran beschrieben (Meyer *et al.*, 2012).

Das funktionelle Enzym p97 setzt sich aus sechs p97 Proteinen zusammen und bildet ein ringförmiges Hexamer. Jede Untereinheit beherbergt zwei ATPase-Domänen D1 und D2 und eine globuläre N-terminale Domäne (Abb. 1.7.). Über die N-terminale Domäne können Substrate spezifisch gebunden werden, wobei essenzielle Adapterproteine sowohl mit dem N- als auch mit dem C-Terminus interagieren (DeLaBarre und Brunger, 2005; Pye *et al.*, 2006). Nach einem allgemein akzeptierten Modell agiert p97 im UPS als Segregase, Chaperon und Prozessierungsenzym (Abb. 1.8.). Nach dem ein

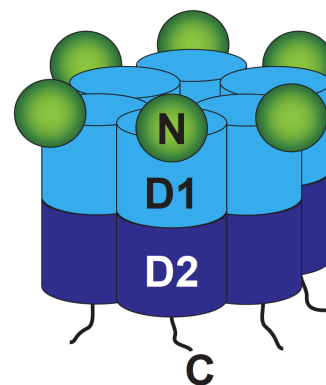


Abbildung 1.7. Struktur des p97 Hexamers. Jede der sechs Untereinheiten besitzt zwei ATPase-Domänen (D1 und D2) und eine N-terminale Interaktionsdomäne (N) (modifiziert nach Meyer *et al.*, 2012).

Substratprotein durch die Kaskade der Ubiquitylierungsenzyme ubiquityliert wurde, kann p97 typischerweise über spezielle Cofaktoren das Substrat binden, wobei p97 allein ebenfalls schwache Ubiquitin-Bindungsaktivität besitzt. Durch Hydrolyse von ATP generiert p97 Energie, um das Substrat aus Proteinkomplexen oder Membranen zu extrahieren (Segregasefunktion) oder strukturell zu verändern (Chaperonfunktion). Weitere Enzyme wie Ubiquitinligasen (E4-Enzyme) oder Deubiquitylierungsenzyme (DUBs) können mit p97 interagieren, um den Ubiquitylierungsstatus des Substrats zu verändern (Prozessierungsfunktion). Das Substratprotein kann somit entweder

deubiquityliert und recycelt oder aber strukturell entfaltet werden, um es dem 26S Proteasom zuzuführen (Meyer *et al.*, 2012).

In 2009 wurde zudem von Cayli *et al.* beschrieben, dass p97 mit dem CSN in Abhängigkeit von ATP einen Komplex bilden kann. Durch diese Interaktion könnte p97 zum einen die Funktion von CRLs beeinflussen, zum anderen könnte der p97-CSN-Komplex mit struktureller Ähnlichkeit zum 19S-RP ein weiteres regulatorisches Partikel des 26S Proteasoms bilden (Cayli *et al.*, 2009).

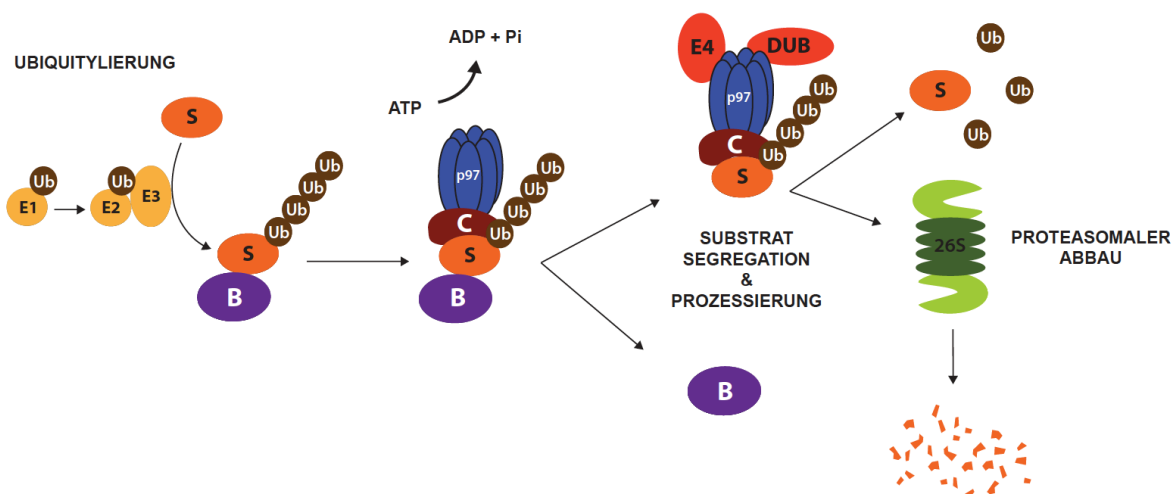


Abbildung 1.8. Allgemein akzeptiertes Modell für die Funktion von p97 im UPS. Ein Substratprotein (S) wird durch Ubiquitylierungsenzyme (E1, E2, E3) ubiquityliert, und p97 bindet über Ubiquitin-bindende Cofaktoren (C). Durch ATP-Hydrolyse generiert p97 Energie, um das Substrat von einem Bindungspartner (B) zu segregieren. Weitere Enzyme wie E4-Ubiquitinligasen (E4) und Deubiquitylierungsenzyme (DUBs) assoziieren mit p97, um das Substrat entweder zu recyceln oder dem Proteasom (26S) zum Abbau zu präsentieren (modifiziert nach Meyer *et al.*, 2012).

1.3.1 Die klinische Relevanz von p97

Als häufiges Protein mit einer Vielzahl von Funktionen, viele davon mit großer Bedeutung für die Zellhomöostase, beeinflusst p97 direkt oder indirekt die Pathogenese einiger Krankheiten. Eingebunden in unterschiedliche Proteinabbauwege, kann eine Dysregulation von p97 zum einen zum Abbau von UPS-Substraten führen, oder auf der anderen Seite zur vermehrten Bildung von toxischen Proteinaggregaten.

Die ATPase p97 ist zum Beispiel mit der Pathogenese der amyotrophen Lateralsklerose assoziiert, da es mit der E3-Ligase Dorfin interagiert (Ishigaki *et al.*,

2004). Durch Bindung von Polyglutamin-Proteinaggregaten spielt p97 ebenfalls eine Rolle bei Chorea Huntington und spinocerebellärer Ataxie Typ III (Hirabayashi *et al.*, 2001; Higashiyama *et al.*, 2002). Eine genetische Mutation von p97 führt zu einer speziellen Form der Einschlusskörpermyopathie, genannt *inclusion body myopathy with frontotemporal dementia* (IBMTD) (Schröder *et al.*, 2005). Durch Assoziation mit ubiquitylierten Einschlusskörperchen (UBCs) besteht auch eine Verbindung zwischen p97 und dem Parkinsonsyndrom (Ishigaki *et al.*, 2004). Neben seiner Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen ist p97 auch bei chronisch inflammatorischen Krankheiten involviert. Durch Beeinflussung inflammatorischer Prozesse trägt p97 zum Beispiel zur Pathogenese der zystischen Fibrose, des α 1-Antitrypsin Mangelsyndroms oder der idiopathischen Lungenfibrose bei (Vij, 2008).

Darüberhinaus wurde eine Überexpression von p97 für verschiedene Krebsarten beschrieben, wobei dies mit vermehrtem Zellwachstum und schlechter Prognose einhergeht. Vermutlich schützt p97 Krebszellen vor Stress durch toxische Proteinaggregate und trägt zu deren Überleben bei. Außerdem wurden veränderte Proteinkonzentrationen von speziellen p97-Adapterproteinen wie FAF1 und ASPL bei verschiedenen malignen Erkrankungen nachgewiesen (Haines, 2010).

Durch die Assoziation mit derart vielfältigen Krankheitsbildern wie neurodegenerativen und chronisch inflammatorischen Erkrankungen, speziell aber auch als positiver Faktor für das Überleben von Krebszellen, gilt p97 als interessantes Angriffsziel für die Entwicklung neuer Pharmaka (Vij, 2008; Haines, 2010). Einige Inhibitoren für p97 werden bereits in präklinischen Studien getestet (Skaar *et al.*, 2014).

1.3.2 p97 Adapterproteine

Als Protein mit derart vielfältigen Funktionen scheint es offensichtlich, dass für p97 weitere regulatorische Faktoren notwendig sind, um zwischen verschiedenen Aktivitäten unterscheiden und diese steuern zu können. Generell können p97-Adapterproteine in zwei Gruppen eingeteilt werden: 1) Substrat-rekrutierende Cofaktoren und 2) Substrat-prozessierende Cofaktoren. Während erstere als Bindeglied zwischen p97 und Substraten wirken und eine Unterscheidung zwischen den diversen p97-Funktionen ermöglichen, ist mit letzteren eine enzymatische Aktivität verbunden wie zum Beispiel Ubiquitylierungs- oder Deubiquitylierungsaktivität (Jentsch und Rumpf, 2007).

Die größte Familie von p97-Adapterproteinen bilden die *UBX-Domain* Proteine, welche die namensgebende *ubiquitin regulatory X domain* (UBX-Domäne) als p97-Bindungsmotiv enthalten. Die UBX-Domäne weist zwar strukturelle Ähnlichkeit mit

Ubiquitin auf, enthält aber eine spezielle oberflächliche Region, welche entscheidend für die Interaktion mit dem N-Terminus von p97 ist, und mit höherer Affinität an p97 als an Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine bindet. Alle Proteine mit einer UBX-Domäne interagieren mit p97, wobei über deren detaillierte Funktionen noch sehr wenig bekannt ist (Schuberth und Buchberger, 2008).

Ubx7 stellt einen dieser Substrat-rekrutierenden Cofaktoren dar und gehört zur FAF1-Subfamilie, deren Mitglieder eine N-terminale *ubiquitin-associated domain* (UBA-Domäne), eine zentrale UAS-Domäne und eine C-terminale UBX-Domäne besitzen. Während die UBA-Domäne Ubiquitinbindung und die UBX-Domäne die Interaktion mit p97 vermittelt, interagiert die UAS-Domäne mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren (Kim *et al.*, 2013). Der Adapter Ubx7 bildet ein spezielles Mitglied dieser FAF1-ähnlichen Proteine und besitzt als einziger der Cofaktoren ein *ubiquitin interaction motif* (auch UIM-Domäne), wobei Ubiquitin-ähnliche Domänen und Transmembrandomänen fehlen (Schuberth und Buchberger, 2008). Interessanterweise scheint Ubx7, wie auch FAF1, nur mit p97 zu interagieren, wenn p97 in einem Komplex mit den weiteren Cofaktoren Npl4 und Ufd1 vorliegt. Das Npl4-Ufd1 Heterodimer ist ein Hauptcofaktor für p97, wobei die Funktion des p97^{Npl4-Ufd1}-Komplexes speziell im Proteinabbau liegt (Hanzelmann *et al.*, 2011).

Ubx7



Abbildung 1.9. Struktur und Domänen des p97 Adapterproteins Ubx7. Als Mitglied der Familie der FAF1-ähnlichen p97 Cofaktoren besitzt Ubx7 eine N-terminale *ubiquitin-associated domain* (UBA-Domäne, Ubiquitinbindung), eine zentrale UAS-Domäne (Interaktion mit langkettigen, ungesättigten Fettsäuren) und eine C-terminale *ubiquitin regulatory X domain* (UBX-Domäne, Bindung an p97). Das zentrale *ubiquitin interaction motif* (UIM-Domäne) ist das Alleinstellungsmerkmal von Ubx7 in der FAF1-Familie (modifiziert nach Schuberth und Buchberger, 2008).

1.3.3 p97, UBXD7 und CRLs

In Interaktionsscreens mit Massenspektrometrieexperimenten wurde in 2008 zum einen die Interaktion von *UBX-Domain* Proteinen mit p97 bestätigt und zum anderen eine Interaktion von verschiedenen UBX-Proteinen mit diversen E3-Ligasen

beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass speziell die Cullin2-CRL und deren Substrat HIF-1 α mit Ubx7 und p97 interagieren. Während ein *Knockdown* von p97 unter Blockade des Proteasoms zu einer vermehrten Akkumulierung von HIF-1 α führte, schien ein Verlust von Ubx7 zu einer verminderten Akkumulierung zu führen. *Knockdown* von p97, nicht aber *Knockdown* von Ubx7, führte des weiteren zur erhöhten Expression des HIF-1 α -Zielgens Carboanhydrase IX (CA IX) (Alexandru *et al.*, 2008).

In 2011 wurde in Hefen gezeigt, dass p97 und Ubx5 (Hefehomolog zu Ubx7) von essentieller Bedeutung für den *Turnover* der RNA-Polymerase II sind. Nach diesem Modell interagiert p97 und Ubx5 mit der Chromatin-gebundenen RNA-Polymerase II Untereinheit Rpb1, welche durch die Cullin3-E3-Ligase zuvor ubiquityliert wurde. Die Segregase p97 ist notwendig, um Rpb1 von der DNA zu lösen wodurch es vom Proteasom abgebaut werden kann (Verma *et al.*, 2011).

In 2012 wurde die Interaktion von Ubx7 und CRLs detaillierter beschrieben, wobei gezeigt werden konnte, dass Ubx7 speziell durch die UIM-Domäne an die aktive Form der CRLs, also neddylierte CRLs, bindet. Somit hat die Neddylierung der CRLs nicht nur eine aktivierende Funktion, sondern stellt auch ein Bindeglied zwischen CRLs und dem p97 Signalweg dar. Funktionell konnte gezeigt werden, dass die UIM-Domäne von Ubx5 für den *Turnover* des Cullin3 Substrats Rpb1 essentiell ist. Außerdem zeigte Ubx7 eine starke Interaktion mit neddyliertem Cullin2 und Cullin4 (Besten *et al.*, 2012). Diese Beobachtungen wurden in einer zweiten unabhängigen Studie bestätigt, wobei eine Überexpression von Ubx7 unter Blockade des Proteasoms abhängig von der UIM-Domäne zu einer Stabilisierung von HIF-1 α führte (Bandau *et al.*, 2012).

Zu diesem Zeitpunkt ist über die genaue Funktion der Interaktion von Ubx7 und CRLs noch sehr wenig bekannt. Obwohl eine Abhängigkeit des *Turnovers* der CRL Substrate Rpb1 und HIF-1 α von Ubx7 bereits gezeigt werden konnte, fehlt dennoch ein detaillierteres mechanistisches Verständnis dieser Zusammenhänge. Während für Rpb1 der Einfluss von Ubx5 in einem *Turnover*-Assay gezeigt werden konnte, existieren für HIF-1 α nur Daten aus Akkumulationsassays unter Inhibierung des Proteasoms.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die kürzlich beobachteten Zusammenhänge zwischen Cullin-RING-Ligasen (CRLs) und dem p97 Signalweg in Abhängigkeit vom Adapterprotein Ubx7 sind aufgrund der biologischen und auch klinischen Relevanz dieser Proteine von großem Interesse. Die Beobachtung, dass Ubx7 nur an neddylierte CRLs bindet, ließ auf eine komplett neue Bedeutung der Neddylierung neben der Aktivierung von E3-Ligasen schließen. Da diese Interaktion unabhängig von p97 und in Abhängigkeit von der UIM-Domäne von Ubx7 stattfindet, könnte dies auch auf eine neue Funktion von *UIM-Domain* Proteinen und einer von p97 unabhängigen Funktion des bislang nur als p97-Adapterprotein bekannten Ubx7 hinweisen. Erste Untersuchungen lassen einen direkten Einfluss von Ubx7 auf den CRL Substrat *Turnover* vermuten, wobei über den genauen Mechanismus noch nichts bekannt ist. Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ubx7 durch die Bindung an neddylierte CRLs deren Ubiquitylierungsfunktion inhibieren könnte. Wenn sich diese Beobachtungen bestätigen ließen, könnte dies die Existenz eines neuen Regulationsmechanismus für CRLs bedeuten. Einige Funktionen von p97 im UPS sind bereits bekannt, wobei die neddylierungsabhängige Interaktion von Ubx7 mit Cullin-RING-Ligasen auf eine neuartige Funktion von p97 direkt an den Cullin-Ligasen hinweisen könnte. Durch die klinische Bedeutung von CRLs bei zahlreichen malignen Erkrankungen könnte ein tieferes Verständnis der Regulation dieser Schlüsselenzyme des proteasomalen Proteinabbaus neue Angriffspunkte für zukünftige Therapien liefern.

Ziel dieser Arbeit war daher die Rolle von p97, Ubx7 und der Cullin-Neddylierung bei der Ubiquitylierung und dem proteasomalen Abbau der Cullin2 Substrate HIF-1 α und HIF-2 α genauer zu studieren. Hierfür sollte ein *Turnover*-Assay für HIF1/2 α in humanen Tumorzellen sowie ein *in vitro* Ubiquitylierungsassay für ein HIF-1 α -Peptid etabliert werden.

2. Material & Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalog-Nummer
4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure)	Sigma	C9008
Chinolin-8-Ethiohydrochlorid (B10)	Sigma Aldrich	3597785-1G
Albumin, Standard (BSA 2,0 mg/ml)	Thermo Scientific	23209
Bacto Trypton	Fisher Scientific	B1420-2
β-Mercaptoethanol	Sigma	M6250
Bromphenolblau	Sigma	B8026
Calciumchlorid, CaCl ₂	Sigma	21115
Chloramphenicol	Sigma	C0378-5G
Chloroquin	Sigma	C6628
Chlorwasserstoffsäure, HCl	Mallinckrodt Chemicals	7647-01-0
Cobalt(II)-chloridhexahydrat, CoCl ₂	Sigma	C8661-100G
Cycloheximid	Calbiochem	239764
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma	D8417-10MG
DMEM (25mM HEPES) (w/o L-Arg,L-Lys, Natriumpyruvat)	AthenaES	0500-15
DMEM (25mM HEPES) (w/o Natriumpyruvat)	AthenaES	0500-21
DMEM + GlutaMAX-I (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, High Glucose 1x</i>)	Invitrogen (Gibco)	10564
Doxycyclin	Clontech	631311
ECL - SuperSignal West Dura	Thermo Scientific	1856145
ECL - SuperSignal West Dura Peroxidpuffer	Thermo Scientific	1856146
EDTA	ICN Biochemicals	800683

Eisessig	Fisher Scientific	A38C-212
Fetales Kälberserum - <i>New Zealand</i>	Gibco	10091
Fetales Kälberserum (<i>Premium Select</i>)	Atlanta biologicals	S11550
FuGENE 6	Roche	11 814 443 001
Glycerin	Mallinckrodt Chemicals	56-81-5
Harnstoff (Urea)	MPBiomed	MP821858
Hefeextrakt	Fisher Scientific	BP1422-2
HEPES	Sigma	H3375-500G
Hygromycin B	Invitrogen	10687-010
IGEPAL CA-630	Sigma	I3021
Imidazol	Sigma	I0125
IPTG, Dioxan frei (Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid)	rpi Research Products International Corp	367-93-1
Kaliumazetat, KAc	Mallinckrodt Chemicals	127-08-2
Kaliumchlorid, KCl	Sigma	P9541
Kaliumhydroxid, KOH	Mallinckrodt	MK6976500
LB-Medium, Kapseln	RPI	L24045
L-Glutamin 200mM 100x	Invitrogen (Gibco)	25030-081
Luminol	Sigma	A8511
Magnesiumazetat, $C_4H_6MgO_4$	FisherBiotech	BP215-500
Magnesiumchlorid, $MgCl_2$	Sigma	M9272
Magnesiumsulfat, $MgSO_4$	Sigma	M65-500
Mangan(II)-chlorid, $MnCl_2$	Sigma	M3634
Methanol	Fischer Scientific	A412P-4
MG132	Calbiochem	474790
Milchpulver (<i>Non fat dry milk</i>)	The Kroger Co.	keine
MLN4924	Active Biochem	A-1139
Natriumchlorid, NaCl	Fisher Scientific	S271-10
Natriumdesoxycholat	Sigma	D5670

Natriumhydroxid, NaOH	Mallinckrodt Chemicals	1310732
Ni-NTA Agarose (His-IP)	Qiagen	1018240
Ni-NTA-Agarose	Qiagen	1018244
<i>Nonidet P 40 Substitute</i>	Fluka BioChemika	74385
Nukleasefreies Wasser	Ambion	AM9937
OPTI-MEM I (<i>Reduced Serum Medium 1x</i>)	Invitrogen (Gibco)	31985-062
Orange G	Sigma	O3756-25G
Pen Strep (Penicillin/Streptomycin)	Invitrogen (Gibco)	15140-122 (100ml)
PIPES	Sigma	P6757
<i>Precision Plus Protein Dual Color Standard</i> (Molekulargewichtsmarker)	Bio Rad	161-0374
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma	P8340-5G
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche	04 693 116 001
Protein A Sepharose 4B Konjugat	Invitrogen	10-1041
<i>ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit</i>	Calbiochem	539790
Puromycin	Sigma	P8833-25MG
PVDF Membran – Immobilon-P	Millipore	IPVH00010
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12262
<i>Quick Start Bradford 1x Färbereagenz</i>	BioRad	500-0205
SDS	Fisher Scientific	BP166-100
SOC	Life Technologies	46-0821
TRIS	MP Biomedicals	CatNo 819638 LotNo 9698K
Triton-X-100	Sigma	X100-500ML
Trypsin-EDTA 0,05% (Trypsin-EDTA 1x)	Invitrogen (Gibco)	25300-054
Tween	Sigma	P1739
Wasserstoffperoxid-Lösung 30%	Mallinckrodt Chemicals	5240-05
Z-VAD-FMK (Caspase Inhibitor)	Promega	G7232

2.1.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nummer	Konzentration
Anti-Maus IgG (Ziege) Alexa Fluor 594	Invitrogen	A11032	1:5000
α -Tubulin	Sigma	T6199	1:5000 – 1:10000
Anti-Maus IgG (H+L)- HRP Konjugat (Ziege)	Bio Rad	170-6516	1:2000 – 1:5000
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP Konjugat (Ziege)	Bio Rad	170-6515	1:2000 – 1:5000
β -Aktin, Maus- monoklonal (ms mono)	Sigma	A5441	1:5000 – 1:10000
Cul1, ms mono	Invitrogen	322400	1:500
Cul1, Kaninchen- polyklonal (rbb poly)	Invitrogen	718700	1:1000 – 1:2000
Cul2, rbb poly	Invitrogen	511800	1:1000 – 1:2000
Cyclin E, rbb poly	Santa Cruz	sc198	1:500
Elongin C (SIII p 15), ms mono	BD	610760	1:1000
FLAG, HRP Konjugat, ms mono	Sigma	A8592-1MG	1:2000 – 1:5000
GFP, HRP Konjugat	Invitrogen	A10260	1:1000 – 1:5000
GFP, ms mono	Clontech	632381	1:1000
HA, HRP Konjugat	Roche	12 013 819 001	1:2000
HA, HRP Konjugat	Sigma	H6533	1:1000
HIF-1 α , ms mono	BD Biosciences	610959	1:500
HIF-1 α , rbb poly	Novus	NB 100-449	1:500
HIF-2 α , rbb poly	Novus	NB100-122	1:500
His-probe (H-15)	Santa Cruz	sc-803	1:1000
Histon H3, rbb poly	Abcam	ab1791-100	1:1000
Nrf2, rbb poly	Santa Cruz	sc-13032	1:1000
p27	Abcam	ab7961	1:1000

p300, ms mono	BD	554215	1:1000
p53 (FL-393), rbb poly	Santa Cruz	sc-6243	1:1000
UBXD7, rbb poly	Millipore	AB10037	1:1000
VCP, rbb poly	Santa Cruz	sc-20799	1:1000
VCP, ms mono	Pierce	MA3-004	1:2000
VHL, ms mono	BD	556347	1:1000

2.1.3 Kits

Kit	Hersteller	Katalog-Nummer
<i>ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit</i>	Calbiochem	539790
QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit	QIAGEN	12963

2.1.4 Zellkultur Materialien

Material	Hersteller	Katalog-Nummer
Kulturflasche, 175 cm ²	Corning	431080
Kulturflasche, 75 cm ²	Corning	430641
Multiwell 6 Well	BD Falcon	353046
Serologische Pipette, 1 ml	BD Falcon	357520
Serologische Pipette, 10 ml	Costar	4101
Serologische Pipette, 25 ml	BD Falcon	356535
Serologische Pipette, 5 ml	BD Falcon	357543
Serologische Pipette, 50 ml	BD Falcon	357550
Zellkulturschale, 10 cm	BD Falcon	353003
Zellkulturschale, 15 cm	Corning	430599
Zellkulturschale, 3,5cm	BD Falcon	353001

2.1.5 Expressionsvektoren

Plasmid	Quelle
CAG4-RTR2 (HIV-1 tat rev)	Willem den Besten, Deshaies Lab, Caltech
CAGG-HIVgpco (HIV gag pol)	Willem den Besten, Deshaies Lab, Caltech
HA-HIF-1 α -wt	Willem den Besten, Deshaies Lab, Caltech
HA-VHL-wt-pBABE-puro	Gekauft von addgene, PI William Kaelin
HDM-G (env)	Willem den Besten, Deshaies Lab, Caltech
His ₆ -V5-HIF-1 α -wt	AG Acker (JLU Gießen)
MD-old-gag-pol-Plasmid-DNA (MLV gag pol)	Willem den Besten, Deshaies Lab, Caltech
pTRIPZ- <i>non-silencing</i> -shRNA	Willem den Besten, Deshaies Lab, Caltech
pTRIPZ-p97-shRNA	Willem den Besten, Deshaies Lab, Caltech
pTRIPZ-Ubx7-shRNA	Willem den Besten, Deshaies Lab, Caltech

2.1.6 Zelllinien

Zelllinie	Quelle
293T (<i>human embryonic kidney cells</i>)	Deshaies Lab / Meinhardt Lab
293T + <i>non-silencing</i> shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
293T + p97-shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
293T + Ubx7 shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
786-0 (+wt VHL) + <i>non-silencing</i> shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
786-0 (+wt VHL) + p97-shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
786-0 (+wt VHL) + Ubx7 shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
786-0 (<i>human renal cell carcinoma cells</i>)	Kaelin Lab
786-0 + <i>non-silencing</i> shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
786-0 + p97-shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
786-0 + Ubx7 shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
786-0 + wt VHL	selbst hergestellt im Deshaies Lab
HeLa (<i>humane Henrietta Lacks Zellen</i>)	Deshaies Lab / Meinhardt Lab

HeLa + <i>non-silencing</i> shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
HeLa + p97-shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
HeLa + Ubxd7 shRNA	selbst hergestellt im Deshaies Lab
RCC4 (<i>human renal cell carcinoma cells 4</i>)	Kaelin Lab
RCC4 + wt VHL	selbst hergestellt im Deshaies Lab

2.1.7 Bakterielle Stämme

Bakterieller Stamm (<i>E. coli</i>)	Quelle
BL21	Invitrogen
DH5 α	Deshaies Lab
Rosetta	Novagen

2.1.8 Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer

Material	Hersteller	Katalog-Nummer
Bam HI-HF	New England BioLabs	R3136S
Eco RI-HF	New England BioLabs	R3101S
NEBuffer 4	New England BioLabs	B7004S

2.1.9 Geräte und Sonstiges

Gerät	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf
<i>Digital Sonifier</i>	Branson
Fisher Vortex Genie 2	Fisher Scientific
Inkubator innova4000	New Brunswick Scientific
Inkubator innova44	New Brunswick Scientific
Kodak BioMax MR Film	Kodak, 894 1114

Kodak X-OMAT 2000A Prozessor	Kodak
Magnetischer Mixer	Corning
Mikroliterpipetten	Eppendorf
Mikroskop	Olympus CK2
<i>Phosphor-Imager (860 Storm)</i>	GE Amersham Molecular Devices
<i>Phosphor-Screen</i>	GE Healthcare
Pipet-Aid XP	Drummond Scientific Company
<i>TE 22 Mini Tank Transfer Unit (Wet-Blot)</i>	GE Healthcare
Thermomixer R	Eppendorf
Waage LIBROR	Shimadzu
Waage PB3002	Mettler
Zellkulturbank " <i>SterilGard III Advance</i> "	The Baker Company
Zellkulturinkubator "Isotemp"	Fisher Scientific
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

2.1.10 Rekombinante Proteine - Material für Ubiquitylierungs-assay

Protein/Material	Details	Quelle
[γ - ³² P] - ATP (C ₁₀ H ₁₄ N ₅ Na ₂ O ₁₃ P ₃)	Spezifische Aktivität: 10Ci(370GBq)/mmol Konzentration: 2mCi/ml	PerkinElmer, BLU002250UC
<i>cAMP-dependent Protein Kinase Catalytic Subunit</i> (PKA)		New England BioLabs, #P6000S
Cdc-34		Deshaies Lab
Cullin2-Rbx1		Deshaies Lab

HIF-1 α -Peptid	Aminosäure-Sequenz: Ac-KLRREPDALTLLA <i>-(hydroxylatedP)-</i> AAGDTIISLDFGSNGRRASY- <i>amide</i>	New England Peptide
Nedd8		Deshaies Lab
Nedd8-E1		Deshaies Lab
Protein Kinase Reaktion Buffer (10x)		New England BioLabs, #B6000S
Ubc12		Deshaies Lab
Ubiquitin		Deshaies Lab
Ubiquitin-E1		Deshaies Lab
Ubx7		Deshaies Lab
VHL-ElonginB-ElonginC		Deshaies Lab

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von Bakterien – Inoue Methode

Zur Transformation von kompetenten DH5 α *E. coli* Bakterien mit Plasmid-DNA wurde die Inoue Methode verwendet (Inoue *et al.*, 1990).

2.2.1.1 Präparation des Inoue Transformationspuffers (TB-Puffer)

PIPES, CaCl₂•2H₂O und KCl wurden eingewogen und in 950 ml H₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit 5 M KOH auf 6,7 titriert. Anschließend wurde MnCl₂ eingewogen und hinzugefügt. Nach Auffüllen des Volumens auf 1 l wurde der Puffer durch Filtration mit einem 0,22 μ M Filter sterilisiert und bei 4°C gelagert.

Chemikalie	Einwaage per Liter	Endkonzentration
PIPES	3,0 g	10 mM
CaCl ₂ •2H ₂ O	2,2 g	15 mM
KCl	18,6 g	250 mM
MnCl ₂	10,9 g	55 mM
H ₂ O	ad 1 l	

2.2.1.2 Präparation von kompetenten Zellen

E. coli DH5 α Bakterien wurden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden per Kultur 2-3 Kolonien abgenommen und in 200 ml SOB Medium in einen 2 l Kolben gegeben. Die Kulturen wurden bei 18°C bis RT für 19-50 h auf einem Schüttler (150-250 rpm) inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 wurden die Kulturen für 10 min in ein Eiswasserbad gestellt. Hierauf wurden die Zellen durch Zentrifugieren bei 3000 x G für 15 min geerntet und in eiskaltem TB-Puffer (1/3 des Kulturvolumens) resuspendiert. Nach weiterer zehnminütiger Inkubation im Eiswasserbad wurden die Zellen durch erneutes Zentrifugieren gesammelt und erneut in eiskaltem TB-Puffer (1/12,5 des Kulturvolumens) resuspendiert. Danach wurde DMSO zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) langsam im Eiswasserbad hinzugefügt. Hierauf wurden die Zellen zu 50-200 μ l aliquotiert und sofort in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Transformation von kompetenten Bakterien

Es wurden 0,1-1 µg Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten DH5α *E. coli* Bakterien hinzu pipettiert, vermischt und für 30 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Bakterien bei 42°C im Wasserbad für 90 sek inkubiert und daraufhin in einem Eiswasserbad für 2 min abgekühlt. Es wurde dann 1 ml SOC Medium hinzugegeben und bei 37°C in einem Schüttler für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakterienlösung auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen, resistenten Kolonien wurden zur Plasmidpräparation verwendet.

2.2.1.4 Medien für Bakterienkulturen

Die aufgelisteten Medien wurden nach der Herstellung durch Autoklavierung sterilisiert.

SOB (1 l)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
Bacto Trypton	20 g	2 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	2 ml (5 M)	10 mM
KCl	1,25 ml (2 M)	2,5 mM
H ₂ O	ad 1 l	
Mg ²⁺ -Lösung (steril, nach Autoklavierung)	10 ml (1M MgSO ₄ + 1M MgCl ₂)	20 mM Mg ²⁺

SOC (1 l)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
SOC Pulver	31 g	-
H ₂ O	ad 1 l	-

LB (1 l)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
LB-Medium, Lennox Kapsel	1 Kapsel per Liter	-

Agarplatten

Zum LB-Medium wurden 1,5 % (w/v) Bacto Agar hinzugegeben und nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin beigemischt.

2.2.2 Gewinnung von DNA durch Plasmidpräparation

Zur Gewinnung größerer Plasmidmengen für transiente Transfektionen wurden *E. coli* Bakterien vom Stamm DH5α verwendet. 250 ml LB-Medium mit einer Ampicillin-Konzentration von 100 µg/ml wurden mit einer Bakterienkolonie beimpft und anschließend über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Plasmide unter Verwendung des *Qiagen QIAfilter Maxi Plasmid DNA Purification Kits* gemäß den Herstellerangaben isoliert. Eluierte Plasmide wurden in nukleasefreies Wasser aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde mit einem Nanodrop Photometer ermittelt. Die qualitative Beurteilung der präparierten Plasmid-DNA erfolgte mittels enzymatischem Verdau der DNA und anschließender Agarose-gelelektrophorese. Die Plasmidlösungen wurden anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.3 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA

Der Verdau von Plasmid-DNA wurde mit Enzymen von New England BioLabs nach deren Protokoll durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 3 µl 10x NEBuffer 4 (Reaktions-Puffer), 1 µl Restriktionsenzym und 1 µl Plasmid-DNA (0,5-1 µg DNA) in 25 µl H₂O vermischt. Der Ansatz wurde für 1 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden per DNA-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.4 DNA-Gelelektrophorese

Zur DNA-Gelelektrophorese wurde ein 1,5 %iges Agarosegel (1,5 % w/v) mit 1x TAE-Puffer hergestellt. Zu 100 ml Agaroselösung wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml Stammlösung) hinzugegeben. Die DNA wurde in 1x Probenpuffer gelöst, und die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Das Gel wurde anschließend auf einem UV-Transilluminator betrachtet und mit einem *Gel-Jet-Imager* dokumentiert. Als Molekulargewichtsstandard diente ein 1 kb DNA-Marker.

TAE-Puffer (50x)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
TRIS Base	1936 g	2 M
EDTA	800 ml (0,5 M)	50 mM
H ₂ O	ad 8 l	

DNA-Probenpuffer (10x)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
Glycerin	20 ml	50 % (v/v)
H ₂ O	20 ml	50 % (v/v)
Orange G	0,2 g	0,5 % (w/v)

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

Die für die Experimente verwendeten Zelllinien wurden in Standard-Zellkulturmedium bei 37°C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90-95 % wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit warmer physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Zur Mobilisierung der Zellmenge einer 75 cm² Kulturflasche wurde 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben (3 ml Trypsin-EDTA per 175 cm² Kulturflasche/150 mm Kulturschale) und bei 37°C bis zum sichtbaren Ablösen der Zellen inkubiert. Durch kurzes Anschlagen der Flasche auf die Handfläche wurde der Ablöseprozess komplettiert und das Trypsin durch Zugabe von frischem Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen in frisches Medium aufgenommen und je nach Bedarf 1:5, 1:10 oder 1:15 auf neue Kulturbedeälter ausgesät.

Standard-Zellkulturmedium

Medium/Mediumzusatz	Menge (Stammlsg.)	Endkonzentration
DMEM-Medium (4,5 g/l Glukose, ohne L-Glutamin)	1 l	
Fötales Kälberserum	100 ml	10 % (v/v)
L-Glutamin	20 ml (200 mM)	4 mM
Penicillin-Streptomycin	10 ml (10.000 Units/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	100 Units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

Das als Standard verwendete Serum enthielt Spuren des Antibiotikums Doxycyclin. Deshalb wurde für Zelllinien mit Puromycin-resistenten, Doxycyclin-induzierbaren shRNAs spezielles fötales Kälberserum aus Neuseeland verwendet. Um diese Zelllinien zu selektionieren wurde dem Medium 1 µg/ml Puromycin hinzugefügt.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung von Zelllinien wurde die Zellmasse einer etwa 90 % konfluenten 75 cm² Kulturflasche oder 1/3 der Zellmasse einer 175 cm² Flasche in Einfriermedium bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden zunächst trypsinisiert und in

Medium aufgenommen. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden diese in 500 µl Medium resuspendiert. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit dem 2x Einfriermedium verdünnt, sofort in ein Kryo-Röhrchen überführt (Endvolumen pro Probe 1 ml) und in einem Einfrierbehälter bei -80°C eingelagert. Nach 24 h wurden die Proben zur langfristigen Aufbewahrung in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Um eine Zellsuspension aufzutauen, wurde diese bei RT oder 37°C aufgetaut und sofort in Kulturmedium ausgesät. Das Medium wurde innerhalb von 5-12 h gegen frisches Medium ausgetauscht, um restliches DMSO zu entfernen und den Zellen optimale Wachstumsbedingungen zu bieten.

2x Einfriermedium

Komponente	Endkonzentration
Standardmedium	60 % (v/v)
DMSO	20 % (v/v)
Fötales Kälberserum	20 % (v/v)

2.3.3 Transiente Transfektionen

Zur Überexpression eines gewünschten Proteins in einer Zelllinie wurde das Transfektionsreagenz FuGENE6 nach den Herstellerangaben verwendet. Zur Transfektion von 293T Zellen wurden 3×10^6 Zellen/Platte 24 h vor Transfektion in 10 ml Medium ausgesät. Pro Ansatz wurden 15-50 µl FuGENE6 Reagenz in 500 µl OPTI-MEM I Medium (ohne Antibiotika- und Serumzusatz) gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 5-10 µg Plasmid-DNA hinzu gegeben und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben, und die Zellen wurden für weitere 48 h bei 37°C inkubiert.

Zur Transfektion in einer 6-Well-Platte wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen per Well ausgesät. Für einen Ansatz pro Well wurden 6 µl FuGENE6 Reagenz in 100 µl OPTI-MEM I Medium gelöst und anschließend 2 µg Plasmid-DNA hinzugegeben.

2.3.4 Gewinnung von Zelllysaten

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend entweder durch Trypsin-EDTA von der Platte gelöst, durch Zentrifugieren pelletiert und mit Lysepuffer versetzt oder mit einem Zellschaber direkt in Lysepuffer

gesammelt. Dem Zellysepuffer wurde kurz vor der Lyse im Verhältnis 1:100 ein Protease-Inhibitor-Cocktail zugegeben. Die Proben wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 20-40 min auf Eis gelagert und zwischendurch kräftig gemischt. Zur Klärung des Lysates wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 17000 x G zentrifugiert. Je nach gewünschter Gesamtproteinkonzentration im Lysat wurden beispielsweise zur Lyse der Zellmasse einer 10 cm Kulturschale zwischen 0,25 ml und 1 ml Lysepuffer verwendet.

RIPA-Lysepuffer (100 ml)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
NaCl	8 ml (5 M)	400 mM
Tris-HCl pH 8	5 ml (1 M)	50 mM
IGEPAL CA-630	1 ml	1 % (v/v)
SDS	1 ml (10 %)	0,1 % (v/v)
Natriumdesoxycholat	5 ml (10 %)	0,5 % (v/v)
H ₂ O	ad 100 ml	

Puffer A (100 ml)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
HEPES/KOH pH 7,5	10 ml (0,5 M)	50 mM
Mg(OAc) ₂	5 ml (0,1 M)	5 mM
KOAc	10 ml (0,7 M)	70 mM
Triton-X-100	200 µl	0,2 % (v/v)
Glycerol	10 ml	10 % (v/v)
EDTA	40 µl (0,5 M)	0,2 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

IGEPAL CA-630 Lysepuffer (100 ml)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
NaCl	3 ml (5 M)	150 mM
IGEPAL CA-630	1 ml	1 % (v/v)
Tris-HCl pH 8	5 ml (1 M)	50 mM
H ₂ O	ad 100 ml	

Um die Proteolyse von HIF im Lysat zu inhibieren, wurden dem Lysepuffer bei Bedarf 600 μ M CoCl₂, 5 μ M MLN4924 und 60 μ M MG132 zugegeben.

2.3.5 Subzelluläre Fraktionierung

Um aus einem Zelllysat verschiedene subzelluläre Fraktionen zu gewinnen wurde ein *ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit* (Calbiochem) nach den Herstellerangaben verwendet. Per Well einer 6-Well-Platte wurden $0,5 \times 10^6$ HeLa Zellen 24 h vor der Lyse ausgesät.

Nach Absaugen des Mediums, wurden pro Well 2 ml Waschpuffer hinzupipettiert und die Platte für 5 min bei 4°C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Der Waschpuffer wurde abgesaugt, und die Zellen wurden mit einem Zellschaber in 666 μ l *Extraction Buffer I* (+ 3,3 μ l Protease-Inhibitor-Cocktail) abgelöst und für 10 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 500 x G für 10 min abgetrennt, und der Überstand wurde als zytosolische Fraktion abpipettiert. Das Zellpellet wurde mit 666 μ l *Extraction Buffer II* (+ 3,3 μ l Protease-Inhibitor-Cocktail) versetzt und für 30 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 5000 x G für 10 min in einem Pellet abgetrennt, und der Überstand wurde als Membran-gebundene Fraktion abpipettiert. Das Pellet wurde daraufhin in 333 μ l *Extraction Buffer III* (+ 3,3 μ l Protease-Inhibitor-Cocktail, ohne Benzonase Nuklease) resuspendiert und für 10 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Zellreste wurden erneut durch Zentrifugieren bei 7000 x G für 10 min in einem Pellet gesammelt, und der Überstand wurde als lösliche nukleäre Fraktion abpipettiert. Das Pellet wurde dann erneut mit 333 μ l *Extraction Buffer III* (+ 3,3 Protease-Inhibitor-Cocktail, mit 1 μ l Benzonase Endonuklease) versetzt und für 10 min bei 4°C unter Rotation inkubiert. Zellreste wurden wieder durch Zentrifugation bei 7000 x G für 10 min in einem Pellet abgetrennt, und der Überstand wurde als Chromatin-gebundene nukleäre Fraktion abpipettiert. Durch zweifache Inkubation mit *Extraction Buffer III*, einmal mit und einmal ohne Nuklease, wurde die erste Fraktion (ohne Nuklease) für lösliche nukleäre

Proteine und die zweite Fraktion (mit Nuklease) für Chromatin-gebundene nukleäre Proteine angereichert.

Die fraktionierten Lysate wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 100°C erhitzt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zu untersuchende Proteine wurden durch *Western Blotting* detektiert.

2.3.6 Transduktion von Zelllinien

Um gewünschte Gene stabil ins Genom humaner Zielzellen zu integrieren, wurden die Zellen mit viralen Vektoren transduziert.

Zur Herstellung von Zelllinien, die unter Doxycyclin Behandlung bestimmte shRNAs exprimieren, wurden Zellen mit einem Lentivirus als *Carrier* für einen pTRIPZ-shRNA-Vektor infiziert. Zur Herstellung von Zelllinien, welche stabil HA-VHL-wt exprimieren, wurden Zellen mit einem Retrovirus als *Carrier* für den HA-VHL-wt-pBABE-puro-Vektor infiziert. Durch dieses System werden die viralen Vektoren stabil ins Genom der Zelle integriert.

2.3.6.1 Gewinnung von shRNA-Lentiviren

Zur Gewinnung von Lentiviren als *Carrier* für shRNA-Vektoren wurden 293T Zellen transient mit einem lentiviralen pTRIPZ-shRNA-Vektor und drei Helfer-Plasmiden transfiziert. Die Helfer-Plasmide kodieren für Proteine die zur Bildung des Lentivirus notwendig sind. Das CAGG-HIVgpc-Plasmid kodiert für Gag- und Pol-Proteine des HIV-Stammes NL4-3 welche zur Bildung des Kapsids und zur Synthese sowie Integration der viralen DNA in der Wirtszelle notwendig sind. Das CAG4-RTR2-Plasmid kodiert für die sogenannten „*accessory genes*“ des HIV-1, HIV-rev und HIV-tat, welche für die Regulation und die Prozessierung der viralen RNA benötigt werden. Der HDM-G-Vektor kodiert für die Env-Proteine die die Hüllproteine des Lentivirus bilden. Diese Proteine werden von den transfizierten 293T Zellen exprimiert und nehmen die RNA des pTRIPZ-shRNA-Vektors auf, um den kompletten Virus zu bilden. Der Virus wird ins Kulturmedium abgegeben und kann anschließend abpipettiert werden. Im hierbei verwendeten Kulturmedium wurde spezielles fötales Kälberserum aus Neuseeland verwendet, da das als Standard verwendete Serum Spuren von Doxycyclin enthält.

Pro Ansatz wurden 24 h vor Transfektion 3×10^6 293T Zellen in 10 ml Medium auf einer 10 cm Platte ausgesät. Für einen Plasmid-DNA-Mix wurden 3,5 µg pTRIPZ-shRNA-Plasmid-DNA mit 0,5 µg CAGG-HIVgpc-Plasmid-DNA, 0,5 µg CAG4-RTR2-Plasmid-DNA und 0,5 µg HDM-G-Plasmid-DNA vermischt. Die Zellen wurden dann mit

dem Plasmid-DNA-Mix und 15 µl FuGENE6 in 500 µl Opti-MEM Medium transfiziert und bei 37°C inkubiert. Am Ende des darauffolgenden Tages wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml frischem Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden diese 5 ml Medium abpipettiert und in einem Gefäß auf Eis gelagert. Es wurden 3 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und nach 5 h ebenfalls abpipettiert. Dieser Schritt wurde mit weiteren 3 ml frischen Mediums nach 5 h wiederholt. Daraufhin wurden wieder 5 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Am Tag danach wurden noch einmal jene 5 ml und nach weiteren 5 h 3 ml Medium-Überstand abpipettiert und auf Eis gelagert. Der gesammelte virale Medium-Überstand (ca. 19 ml pro 10 cm Platte) mit infektiösen und pTRIPZ-shRNA-Vektor enthaltenden Lentiviren wurde zur Infektion weiterer Zellen verwendet.

2.3.6.2 Gewinnung von HA-VHL-wt-Retroviren

Die HA-VHL-wt-Retroviren wurden nach dem selben Prinzip gewonnen, wie bereits unter 2.3.6.1 für die Gewinnung von shRNA-Lentiviren beschrieben. Hierbei wurden 293T Zellen mit dem retroviralen HA-VHL-wt-pBABE-puro-Vektor und zwei Helferplasmiden transient transfiziert. Für einen Plasmid-DNA-Mix wurden 3,0 µg HA-VHL-wt-pBABE-puro-Plasmid-DNA mit 1,5 µg MD-old-gag-pol-Plasmid-DNA, und 0,5 µg HDM-G-Plasmid-DNA vermischt. Das MD-old-gag-pol-Plasmid kodiert für Gag- und Pol-Proteine des Murinen Leukämievirus, welche zur Bildung des Kapsids und zur Synthese sowie Integration der viralen DNA in der Wirtszelle notwendig sind. Die Transfektion und die weiteren Schritte wurden exakt wie unter 2.3.6.1 beschrieben durchgeführt.

2.3.6.3 Infektion von Zielzellen mit viralem Überstand

Bevor bestimmte Zelllinien mit dem viralen Überstand infiziert wurden, wurde der Überstand durch einen 0,45 µl Filter geklärt. Die zu infizierenden Zellen wurden 24 h vor Infektion in geringer Dichte (2×10^5 Zellen) auf einer 10 cm Platte in 10 ml Medium ausgesät. Hierfür wurde wiederum Doxycyclin freies Kultur-Medium verwendet.

Die Infektionsrate konnte entweder durch Verdünnen des viralen Überstands oder durch Verkürzung/Verlängerung des Infektionszeitraums beeinflusst werden. Pro Infektionstag wurden die Zellen zunächst mit 5 ml viralem Überstand und zweimal nach je 3 h mit zusätzlichen 3 ml viralem Überstand infiziert. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und die Infektion am nächsten Tag fortgesetzt. Nach dem

letzten Infektionstag wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und für einen weiteren Tag inkubiert bevor mit der Selektion begonnen wurde.

2.3.6.4 Selektion durch Antibiotika

Die verwendeten pTRIPZ-shRNA-Vektoren und der HA-pBABE-puro-Vektor kodieren für eine Puromycinresistenz. Zur Selektion der Zellen, die den viralen Vektor erfolgreich ins Genom integriert haben, wurde dem Kultur-Medium 1-2 µg/ml Puromycin hinzu gegeben. Der Effekt von Puromycin wurde stets an nicht infizierten Kontrollzellen überprüft.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen von Zelllysaten wurden mit der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Zur Bestimmung einer Standardkurve wurde die Extinktion verschiedener bekannter Proteinkonzentrationen (0 µg; 0,125 µg, 0,25 µg, 0,5 µg, 1 µg pro 1 ml) durch ein Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Aus den Messwerten wurde eine Ausgleichsgerade erstellt, mit deren Gleichung alle weiteren Messwerte berechnet wurden. Standardmäßig wurden 5 µl der zu messenden Proteinlösung mit 1 ml *Quick Start Bradford 1x* Färbereagenz (BioRad) vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Bei hochkonzentrierten Lysaten wurden diese vor der Messung zunächst im Verhältnis 1:20 oder 1:30 verdünnt.

2.4.2 Affinitätsaufreinigung von His₆-V5-HIF-1α

Um HIF-1α unter denaturierenden Bedingungen über einen His₆-Tag aufzureinigen, wurden 293T Zellen mit einem His₆-V5-HIF-1α-wt-Plasmid transfiziert und His₆-V5-HIF-1α-wt anschließend mit Ni-NTA-Agarose *Beads* aufgereinigt.

4 x 10⁶ 293T Zellen wurden 24 h vor Transfektion auf einer 10 cm Platte in 10 ml Medium ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 10 µg His₆-V5-HIF-1α-wt-Plasmid-DNA und 50 µl FuGENE6 transfiziert und 48 h bei 37°C inkubiert. Vor der Lyse wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA abgelöst und durch Zentrifugieren bei 5000 x G gewonnen.

Jedes Zellpellet wurde in 750 µl 8 M Harnstoff-Lysepuffer lysiert und mit Ultraschall behandelt, um die Viskosität zu reduzieren. Für Input-Kontrollen wurden 75 µl des Gesamtzelllysats mit SDS Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 100°C erhitzt. Zur Affinitätsaufreinigung wurden 650 µl Lysat mit 50 µl Ni-NTA-*Beads* bei RT für 4 h unter Rotation inkubiert. Danach wurden die *Beads* durch Zentrifugation gesammelt und fünfmal in 8 M Harnstoff-Waschpuffer gewaschen. Um die aufgereinigten Proteine zu eluieren, wurden die *Beads* in 75 µl 2x SDS-Probenpuffer für 5 min auf 100°C erhitzt. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Aufgereinigtes His₆-V5-HIF-1α-wt wurde durch *Western Blotting* mit einem anti-V5-Antikörper detektiert.

8 M Harnstoff-Lysepuffer (50 ml)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
Harnstoff	24 g	8 M
NaH ₂ PO ₄ /Tris-HCl	10 ml (0,5 M NaH ₂ PO ₄ / 50 mM Tris-HCl)	0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl
Imidazol	0,5 ml (1 M)	10 mM
Glycerol	5 ml	10 % (v/v)
Triton-X-100	50 µl	0,1 % (v/v)
NaCl	5 ml (5 M)	0,5 M
β-Mercaptoethanol (erst kurz vor Lyse zugeben)	34 µl (14,3 M)	10 mM
H ₂ O	ad 50 ml	

8 M Harnstoff-Waschpuffer (50 ml) (8 M Harnstoff-Lysepuffer mit 20 mM Imidazol)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
Harnstoff	24 g	8 M
NaH ₂ PO ₄ /Tris-HCl	10 ml (0,5 M NaH ₂ PO ₄ / 50 mM Tris-HCl)	0,1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl
Imidazol	1 ml (1 M)	20 mM
Glycerol	5 ml	10 % (v/v)
Triton-X-100	50 µl	0,1 % (v/v)
NaCl	5 ml (5 M)	0,5 M
β-Mercaptoethanol (erst kurz vor Lyse zugeben)	34 µl (14,3 M)	10 mM
H ₂ O	ad 50 ml	

2.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**2.4.3.1 SDS-PAGE nach Laemmli (Novex Tris-Glycin Gel)**

Die Auftrennung von Proteinen wurde nach dem Prinzip der erstmals von Laemmli beschriebenen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt

(Laemmli, 1970). Es wurden 4-12 %ige oder 4-20 %ige Novex Tris-Glycin Gele nach Herstellerangaben (Invitrogen) verwendet.

Die Gele wurden zunächst in eine Invitrogen Novex *Mini-Cell* eingespannt und die Kammer mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, und pro *Well* wurden 10-15 µl Probe aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstant 125 V durchgeführt, wobei als Molekulargewichtsmarker der *Precision Plus Protein Standard* (BioRad) mit einem Auftrennungsbereich von 10-250 kDa diente.

5x SDS-Probenpuffer (10 ml)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
Tris-HCl pH 6,8	1,34 ml (2,5 M)	335 mM
EDTA	1 ml (0,5 M)	50 mM
Glycerol	5 ml	50 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	2,5 ml	25 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 g	1 % (w/v)
H ₂ O	ad 10 ml	

10x Elektrophoresepuffer (8 l)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
Tris Base	242,2 g	25 mM
Glycin	1153,1 g	1,92 M
H ₂ O	ad 8 l	

1x SDS-Elektrophoresepuffer (8 l)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
10x Elektrophoresepuffer	800 ml (10x)	1x
SDS	40 ml (20 %)	0,1 % (w/v)
H ₂ O	ad 8 l	

2.4.4 Western Blotting

2.4.4.1 Wet-Blot Verfahren

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch einen *Wet-Blot* auf eine PVDF-Membran übertragen. Es wurde das TE 22 *Wet-Blot* System von GE Healthcare verwendet.

Der Blot wurde in einer *Wet-Blot*-Kassette folgendermaßen zusammengefügt:

Anode (+)

- *Drei Lagen Whatman-Filterpapier*
- *PVDF-Membran*
- *SDS-PAGE Gel*
- *Drei Lagen Whatman-Filterpapier*

Kathode (-)

Der *Wet-Blot*-Transfer wurde bei konstanten 100 V in 1x Transferpuffer für 1 h 30 min bei 4°C durchgeführt.

1x Transferpuffer (8 l)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
10x Elektrophoresepuffer	800 ml	1x
Methanol	800 ml	10 % (v/v)
H ₂ O	bis 8 l	

2.4.4.2 Western-Blot-Detektion

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran zur Absättigung der freien Bindungsstellen mindestens 1 h mit 10 %iger *Blocking*-Lösung bei RT oder 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT mit in Antikörper-Lösung gelöstem Erstantikörper inkubiert. Danach wurde die Membran mindestens fünfmal für jeweils 5 min mit TBS-Tween bei RT gewaschen und anschließend 1 h mit in Antikörper-Lösung gelöstem Sekundärantikörper inkubiert. Schließlich wurde die Membran wieder fünfmal für jeweils 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Zur Visualisierung der Immunkomplexe wurde die

Membran für 2 min in ECL-Lösung inkubiert. Dazu wurden 5 ml der ECL-Lösung mit 2 µl H₂O₂-Lösung (30 %) gemischt und die Membran darin für 2 min auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend zwischen zwei Kunststofffolien in einer Röntgenkassette fixiert und das Signal auf einem Film (Kodak BioMax MR) detektiert.

10x TBS (*Tris-Buffered-Saline*, pH 7,5)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
NaCl	701,2 g	1,5 M
Tris Base	484,56 g	0,5 M
H ₂ O	ad 8 l	

10x TBS-Tween

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
10x TBS	990 ml	10x
Tween	10 ml	0,1 % (v/v)

***Blocking*-Lösung (100 ml)**

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
1x TBS-Tween	100 ml	1x
Milchpulver	10 g	10 % (w/v)

Antikörper-Lösung (100 ml)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
1x TBS-Tween	90 ml	1x
<i>Blocking</i> -Lösung	10 ml (10 % Milchpulver)	1 % Milchpulver (w/v)

ECL-Lösung (400 ml)

Chemikalie	Einwaage (Stammlsg.)	Endkonzentration
Tris-HCl pH 8,5	40 ml (1 M)	100 mM
Luminol	2 ml (250 mM)	1,25 mM
4-Hydroxymzimtsäure (p-Cumarsäure)	880 µl (90 mM)	137,5 nM
H ₂ O	ad 400 ml	

2.5 Messung des Zeitverlaufs der Proteolyse von HIF-1/2 α

Um den Zeitverlauf der Proteolyse von HIF-1/2 α in eukaryotischen Zellen zu verfolgen (*Turnover-Assay*), wurde durch CoCl₂-Behandlung ein *Pool* von HIF-1/2 α stabilisiert. Nach Auswaschen des CoCl₂ wurden die Zellen für bestimmte Zeit mit Cycloheximid enthaltendem Zellkulturmedium inkubiert (*Chase*). Cycloheximid verhindert als Translationsinhibitor die Neu-Synthese von Proteinen.

Per *Well* einer 6-*Well*-Platte wurden $0,5 \times 10^6$ HeLa Zellen 24 h vor Beginn des Experiments ausgesät ($0,25 \times 10^6$ Zellen per *Well* für 786-0 Zellen). Die Zellen wurden mit 200 μ M CoCl₂ für 3 h behandelt, welches anschließend durch zweifaches Waschen mit PBS entfernt wurde. Daraufhin wurden die Zellen mit Cycloheximid enthaltendem Zellkulturmedium (45 μ g/ml) inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten lysiert. Die Zellen eines *Wells* wurden direkt in 250 μ l vorgewärmtem 2x SDS-Probenpuffer lysiert, für 15 min auf 100°C erhitzt und mit Ultraschall behandelt (15 sec Gesamtzeit, 0,5 sec on/off, 20 % *Power*).

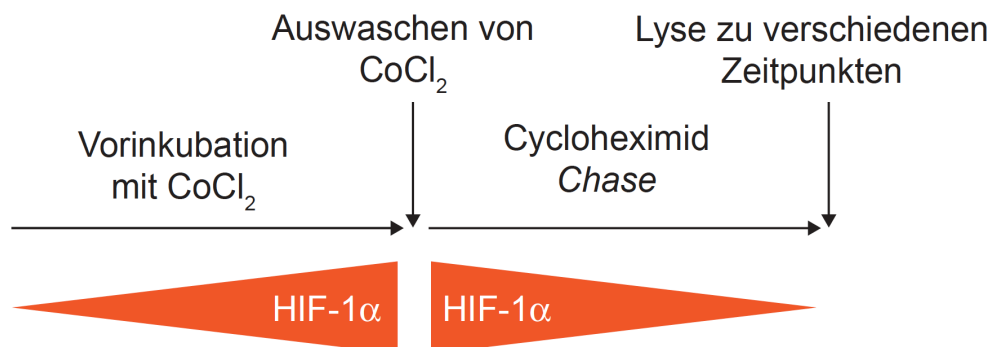


Abbildung 2.1. Messung des Zeitverlaufs der Proteolyse von HIF-1/2 α . Durch dreistündige Vorinkubation mit CoCl₂ wird ein *Pool* von HIF-1/2 α stabilisiert. Nach Auswaschen des CoCl₂ mit PBS, werden die Zellen mit Cycloheximid enthaltendem Medium inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss zu verschiedenen Zeitpunkten direkt in 2x SDS-Probenpuffer lysiert, um die HIF-Proteinkonzentrationen während des Abbauprozesses zu untersuchen.

Bei Messungen zum Proteolyse-Zeitverlauf wurde HIF-1/2 α in weiteren Experimenten durch Vorinkubation mit Inhibitoren dreier verschiedener Schlüsselenzyme des HIF-Signalwegs stabilisiert: 1) Stabilisierung durch den PHD-Inhibitor CoCl₂: da der Prozess der Hydroxylierung durch Prolylhydroxylasen neben Sauerstoff auch von der Verfügbarkeit von Eisen (Fe²⁺) abhängt, kann eine Behandlung der Zellen mit dem Eisenchelator CoCl₂ eine hypoxische Situation imitieren. Durch die Behandlung mit CoCl₂ werden nicht-hydroxylierte und nicht-ubiquitylierte HIF-1 α -Spezies zunächst stabilisiert, welche nach Auswaschen des Chelators zuerst hydroxyliert und dann durch Bindung an Cul2^{VBC} ubiquityliert werden. Die Stabilisierung von HIF-1 α findet somit aufwärts der Cullin2-RING-Ligase statt. 2) Stabilisierung mit dem NAE-Inhibitor MLN4924: durch Inhibierung des Nedd8-Aktivierenden-Enzyms NAE wird der Cul2^{VBC}-Komplex in den deneddylierten und inaktiven Zustand versetzt. Hierbei werden durch Inhibierung der Cullin2-Ligase hydroxylierte und nicht-ubiquitylierte HIF-1 α -Spezies stabilisiert. MLN4924 ist ein irreversibler Inhibitor des NAE, weshalb Cullin2 auch nach Auswaschen des Inhibitors im inaktiven, deneddylierten Zustand verbleibt. 3) Stabilisierung mit dem Proteasominhibitor MG132: MG132 führt zu einer Akkumulation von HIF-1 α in seiner ubiquitylierten Form. Nach Auswaschen von MG132 können die bereits ubiquitylierten HIF-1 α -Spezies vom wieder aktiven Proteasom abgebaut werden. Der Zeitverlauf des Abbaus von stabilisierten HIF-1 α wurde anschließend, wie unter 2.5. beschrieben, untersucht. Um den Prozess der Ubiquitylierung von HIF-1 α zu studieren, wurde während der Zeitverlaufsmessung zusätzlich mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt. Hierbei werden die durch Vorinkubation mit CoCl₂ oder MLN4924 stabilisierten HIF-1 α -Spezies im Zeitverlauf ubiquityliert und akkumulieren in dieser Form durch die Inhibition des proteasomalen Abbaus.

2.6 HIF-1 α -Peptid *in vitro* Ubiquitylierungsassay

Um den Einfluss von Ubx^{d7} auf die Ubiquitylierung von HIF-1 α *in vitro* zu studieren, wurde ein Ubiquitylierungsassay für ein HIF-1 α -Peptid etabliert. Hierfür wurden alle für eine Ubiquitylierungs-Reaktion nötigen Komponenten als rekombinante Proteine aufgereinigt und wie von Saha & Deshaies beschrieben für eine *in vitro* Reaktion verwendet (Saha und Deshaies, 2008).

2.6.1 Gewinnung von rekombinanten Proteinen

Die Komponenten des Cul2^{VBC}-Komplexes (Cul2-Rbx1 und VHL-ElonginB-ElonginC) wurden wie die Komponenten der Ubiquitylierungs-Maschinerie (Ub-E1, Cdc34 und Ubiquitin) sowie der Neddylierungs-Maschinerie (Nedd8-E1, Ubc12 und Nedd8) wie bereits beschrieben im Deshaies Labor aufgereinigt (Saha und Deshaies, 2008; Besten *et al.*, 2012). Zur detaillierten Beschreibung der Proteinexpression sowie Aufreinigung findet sich im Anhang unter 10.1 ein Auszug aus Besten *et al.* (2012).

2.6.2 *In vitro* Ubiquitylierungsassay

Zunächst wurde das HIF-1 α -Peptid (Aminosäuresequenz siehe unter 2.1.10) durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase mit ³²P phosphoryliert.

Ansatz für Phosphorylierungsreaktion

Komponente	Einwaage(Stockkonz.)	Endkonzentration
Proteinkinase Reaktionspuffer	5 μ l (10x)	1x
HIF-1 α -Peptid	1 μ l (1 mM)	20 μ M
Katalytische Einheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase	2 μ l (2500 U/ μ l)	100 U/ μ l
[γ - ³² P] - ATP	1 μ l	
H ₂ O	40 μ l	

Der Ansatz wurde für 1 h bei RT inkubiert.

Vor der eigentlichen Ubiquitylierungsreaktion wurden vier verschiedene Cul2^{VHL-ElonginB/C}-Ansätze zu je 12 μ l hergestellt und für 30 min bei RT inkubiert:

1) Cul2^{VBC}-HIF-1 α ohne Ubx7

Komponente	Konzentration
Cullin2	300 mM
VHL-ElonginB-ElonginC	300 mM
HIF-1 α -Peptid	1,6 mM

2) Cul2^{VBC}-HIF-1 α mit Ubx7

Komponente	Konzentration
Cullin2	300 mM
VHL-ElonginB-ElonginC	300 mM
HIF-1 α -Peptid	1,6 mM
Ubx7	2 μ M

3) Nedd8-Cul2^{VBC}-HIF-1 α ohne Ubx7

Komponente	Konzentration
Cullin2	300 mM
VHL-ElonginB-ElonginC	300 mM
HIF-1 α -Peptid	1,6 mM
Nedd8-E1	0,6 μ M
Ubc12	4 μ M
Nedd8	20 μ M

4) Nedd8-Cul2-^{VBC}-HIF-1 α mit Ubxd7

Komponente	Konzentration
Cullin2	300 mM
VHL-ElonginB-ElonginC	300 mM
HIF-1 α -Peptid	1,6 mM
Nedd8-E1	0,6 μ M
Ubc12	4 μ M
Nedd8	20 μ M
Ubxd7	2 μ M

Anschließend wurden je 10 μ l der Ansätze 1-4 mit 10 μ l des Ubiquitylierungsmixes (2 μ M Ubiquitin-E1, 200 nM Cdc24, 120 μ M Ubiquitin) bei RT inkubiert. Die Endkonzentrationen der Komponenten pro Ubiquitylierungsreaktion waren 150 mM Cullin2, 150 μ M VHL-ElonginB-ElonginC, 800 nM HIF-1 α -Peptid, 1 μ M Ubiquitin-E1, 100 nM Cdc34, 60 μ M Ubiquitin, +/- 0,3 μ M Nedd8-E1, +/- 2 μ M Ubc12, +/- 10 μ M Nedd8, +/- 1 μ M Ubxd7. Nach 5, 10 und 20 min wurde den Ansätzen jeweils 5 μ l entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l 2x SDS-Probenpuffer beendet. Die Proben wurden anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet, und es wurde eine Autoradiographie mit einem Phosphor-Screen durchgeführt. Der Phosphor-Screen wurde mit Hilfe eines *Phosphor-Imagers* gescannt und die Signale mit ImageQuant Software ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung von Bedingungen zur Analyse des Abbaus von HIF-1/2 α

Unter normoxischen Bedingungen wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 α mit einer geschätzten Halbwertszeit von 5 min durch das UPS abgebaut (Moroz *et al.*, 2009). Unter Sauerstoffmangel wird HIF-1 α jedoch stabilisiert wenn die zum Abbau führende Hydroxylierung nicht mehr erfolgen kann. Um eine hypoxische Situation zu imitieren und somit HIF-1 α oder auch HIF-2 α zu stabilisieren, können die Zellen mit verschiedenen Chemikalien behandelt werden. Die verschiedenen Möglichkeiten HIFs durch CoCl₂, MLN4924 oder MG132 akkumulieren zu lassen, sind im Detail unter Material & Methoden 2.5 beschrieben.

Die Behandlung von HeLa-Zellen mit 200 μ M CoCl₂ resultiert bereits nach 60 min in wesentlich erhöhten HIF-1 α -Proteinkonzentrationen in RIPA-Lysaten (Abb. 3.1A Spur 5). Eine längere Behandlung oder höhere Konzentrationen von CoCl₂ führen zu einer weiteren Stabilisierung von HIF-1 α (Spuren 6 und 7).

Um den proteasomalen Abbau eines durch CoCl₂ stabilisierten HIF-1 α -Pools verfolgen zu können, wurde ein Cycloheximid-Zeitverlaufsassay etabliert. Nach einer Vorinkubation mit 200 μ M CoCl₂ wurde der Chelator mit PBS ausgewaschen und die Zellen anschließend mit Cycloheximid enthaltendem Medium inkubiert. Cycloheximid blockiert die Neusynthese von HIF-1 α und ermöglicht somit die Beobachtung des Abbaus des vorher chemisch stabilisierten Pools von HIF-1 α . Durch Analyse von Zelllysaten zu verschiedenen Zeitpunkten kann dann die Abnahme der HIF-1 α -Proteinkonzentrationen verfolgt werden (Abb. 3.1B).

Erste Experimente zeigten einen schnellen Abbau von HIF-1 α , wobei nach 30 min nur noch sehr geringe Mengen (Abb. 3.1C, Spur 5) und nach 60 min kein HIF-1 α mehr zu detektieren war (Spur 6). Bei diesem Experiment wurden die Proben in RIPA-Lysepuffer lysiert, was eine Verarbeitungszeit von etwa 40-60 min pro Probe zur Folge hatte. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine unerwartete Variabilität der HIF-1 α -Proteinkonzentrationen. So wurde nach 10 min paradoxerweise mehr HIF-1 α -Protein detektiert als nach 5 min (Spuren 3 und 4).

Um aufzuklären, ob diese Variabilität real ist oder etwa durch die relativ lange Verarbeitungszeit der Proben zustande kommt, wurden verschiedene Lyse-

bedingungen getestet. Zum einen wurden für 3 h mit CoCl_2 oder MG132 (Proteasominhibitor; stabilisiert ubiquityliertes HIF-1 α durch Inhibierung des 26S Proteasoms) behandelte HeLa-Zellen entweder für 20 min in RIPA-Lysepuffer mit CoCl_2 , MLN4924 (NAE-Inhibitor; stabilisiert HIF-1 α durch Inaktivierung der Cullin2-RING-Ligase) und MG132 oder für 40 min in RIPA-Lysepuffer ohne die HIF-1 α -stabilisierenden Reagenzien lysiert. Als weitere Lysemethode wurde die direkte Lyse der Zellen in 2x SDS-Probenpuffer getestet (Abb. 3.1D). Es zeigte sich, dass die kürzere Lysezeit von 20 min und die Zugabe der HIF-1 α -stabilisierenden Reagenzien zum Lysepuffer zur Detektion von mehr HIF-1 α -Protein führt (Spuren 1 und 2). Dies ließ darauf schließen, dass HIF-1 α auch während des RIPA-Lyseprozesses proteasomal abgebaut wird, was zu einer Variabilität der HIF-1 α -Konzentrationen in Zeitverlaufsexperimenten führen könnte. Die direkte Lyse in 2x SDS-Probenpuffer erwies sich als effektivste Methode um CoCl_2 -stabilisiertes HIF-1 α zu extrahieren und zu detektieren (Spur 5), während durch MG132-stabilisiertes, ubiquityliertes HIF-1 α nur in ähnlichen Mengen wie bei bei RIPA-Lyse extrahiert werden konnte (Spur 6).

Um optimale Lysezeitpunkte festzulegen, wurden für 2 h mit CoCl_2 behandelte HeLa-Zellen nach einer Cycloheximid-Behandlung von 5-120 min unter optimierten Lysebedingungen (direkte Lyse in 2x SDS-Probenpuffer) lysiert (Abb. 3.1E). Um dabei die Funktionalität von Cycloheximid zu überprüfen wurde eine Probe nach Auswaschen des CoCl_2 für 30 min in Medium ohne Cycloheximid inkubiert. Dabei zeigten sich höhere HIF-1 α -Konzentrationen als in der mit Cycloheximid inkubierten Probe, was die Inhibierung der Proteinsynthese durch Cycloheximid bestätigt (Spuren 3 und 7). Unter diesen Bedingungen zeigte sich keine Variabilität beim Abbau von HIF-1 α und die Proteinkonzentrationen verringerten sich wie erwartet von Zeitpunkt zu Zeitpunkt. Als Standardbedingungen für weitere Assays wurde eine Vorinkubation mit CoCl_2 für 3 h festgelegt, wobei gegenüber der zweistündigen Behandlung mehr HIF-1 α akkumuliert. Als optimale Lysezeitpunkte für die weiteren Experimente wurden 30, 60, 90 und 120 min festgelegt.

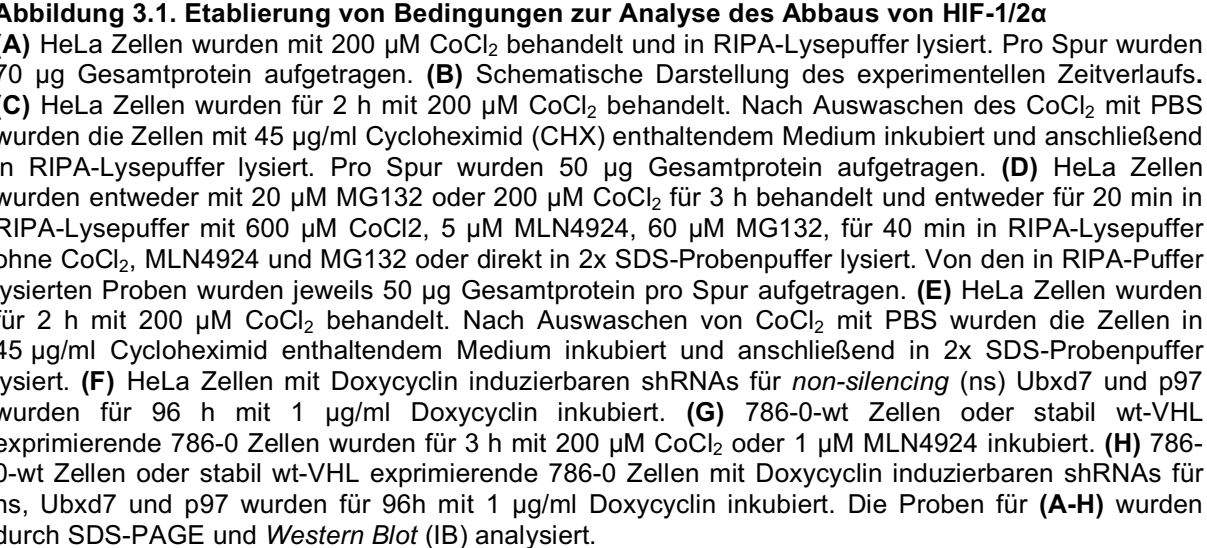
Um den Einfluss von p97 und dessen Adapterprotein Ubx7 auf den proteasomalen Abbau und die Ubiquitylierung von HIF-1/2 α zu untersuchen, wurden spezielle shRNA-Zelllinien durch Transduktion mit Lentiviren hergestellt (siehe Material & Methoden). Die Funktionalität der ns-shRNA-, Ubx7-shRNA- und p97-shRNA-HeLa-Zelllinien wurde nach 96-stündiger Inkubation mit Doxycyclin per *Western Blot* überprüft (Abb. 3.1F). Die hergestellten Zelllinien zeigen einen erfolgreichen *Knockdown* der Zielproteine p97 und Ubx7 (Spuren 2 und 3).

Um den Abbau von HIF-2 α speziell in Abhängigkeit des Cul2-Substratrezeptors VHL zu studieren wurden 786-O-Zellen verwendet. Diese Zelllinie exprimiert weder HIF-1 α

noch den HIF-Substratrezeptor VHL, wogegen HIF-2 α exprimiert und durch das Fehlen von VHL ständig stabilisiert wird. Es wurden zunächst VHL-wt-exprimierende 786-0-Zellen durch Transduktion mit Retroviren hergestellt. Zur Überprüfung der Funktionalität dieser Zelllinie wurden die Zellen für 3 h mit CoCl₂ oder MLN4924 behandelt und direkt lysiert. Während die HIF-2 α -Konzentration in den VHL-Null Zellen ohne Behandlung mit HIF-2 α -stabilisierenden Reagenzien erhöht war (Abb. 3.1G, Spuren 1 und 3), zeigte sich in VHL-wt Zellen eine deutliche Verringerung der Proteinkonzentration (Spuren 5 und 7). Dies bestätigt den Abbau von HIF-2 α in Abhängigkeit von VHL. Die VHL-wt exprimierenden Zellen reagierten auf die Behandlung mit CoCl₂ oder MLN4924 erwartungsgemäß mit der Stabilisierung von HIF-2 α (Spuren 6 und 8). Die Detektion von Cullin2 bestätigt die Wirkung von MLN4924, da Cullin2 unter MLN-Behandlung nur in seiner deneddylierten Form vorliegt (Spuren 4 und 8).

Um auch in den 786-0-Zellen (+/-VHL-wt) den Abbau von HIF-2 α in Abhängigkeit von p97 und Ubx7 zu studieren wurden entsprechende shRNA-Zelllinien durch lentivirale Transduktion hergestellt. Der erfolgreiche *Knockdown* der Zielproteine wurde per *Western Blot* bestätigt (Abb. 3.1H, Spuren 2, 3 und 5, 6).

Die Überprüfung der *Knockdowns* von Ubx7 und p97 in den jeweiligen Zelllinien (Abb. 3.1F, G, H) ist repräsentativ für alle weiteren *Knockdown*-Experimente dieser Arbeit. Für jedes der weiteren *Knockdown*-Experimente (Abb. 3.3A-D, Abb. 3.4A+B, Abb. 3.5A+B) wurde zwar die Effizienz des *Knockdowns* im *Western Blot* überprüft, aber zu Gunsten der Übersichtlichkeit der einzelnen Abbildungen nicht explizit dargestellt.



3.2 Identifikation des HIF-1 α Abbauprodukts HDP-80

Bei der Analyse von in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten fiel auf, dass unter MG132 Behandlung stets ein Protein mit einem geschätzten Molekulargewicht von 80 kDa stabilisiert und von verschiedenen HIF-1 α -Antikörpern spezifisch detektiert wurde.

Zur Darstellung dieses Phänomens wurden HeLa Zellen für 3 h entweder mit 20 μ M MG132 oder mit 200 μ M CoCl₂ behandelt, anschließend lysiert und per SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert (Abb. 3.2A). In den mit MG132 behandelten Proben (Spuren 2 und 4) konnte sowohl ein monoklonaler Maus-Antikörper (mc-ms Ab), der gegen die Aminosäurereste (aa) 610-727 gerichtet ist, als auch ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (pc-rbb Ab), gerichtet gegen die Aminosäurereste 775-826, das 80 kDa große Protein detektieren. Da dieses Protein unter Inhibierung des Proteasoms vermehrt akkumuliert, könnte es ein Abbauprodukt von HIF-1 α darstellen und wird deshalb weiterhin als HDP-80 (**HIF-1 α -Degradation-Product of 80 kDa**) bezeichnet.

Um die Frage zu klären, ob HDP-80 im Kern oder im Zytoplasma akkumuliert, sollte das vorherige Experiment wiederholt und aus den Lysaten eine Kern- und eine Zytoplasmafraktion gewonnen werden (Abb. 3.2B). Dazu wurden HeLa Zellen für 3 h mit 20 μ M MG132 oder mit 200 μ M CoCl₂ behandelt und die Lysate mit Hilfe des *Subcellular Proteome Extraction Kit* (Beschreibung Material & Methoden 2.3.5) fraktioniert. Die Detektion von Histon H3 diente hierbei als Marker für die Kernfraktion (Spuren 2 und 4). Unter CoCl₂-Behandlung akkumulierte nicht-ubiquityliertes HIF-1 α im Kern und im Zytosol (Spuren 1 und 2), während unter Inhibierung des Proteasoms ubiquityliertes HIF-1 α (Ub-HIF-1 α) und HDP-80 hauptsächlich im Zytosol lokalisiert waren (Spur 3) und nur ein sehr geringer Anteil nicht-ubiquityliertes HIF-1 α im Kern (Spur 4).

Die Annahme, dass es sich um ein C-terminales HIF-1 α -Abbauprodukt handeln könnte, welches unter Inhibition des 26S Proteasoms stabilisiert wird, sollte durch Transfektionsexperimente bestätigt werden. Aufgrund des Molekulargewichts von HDP-80 und der Beobachtung, dass die verwendeten HIF-1 α -Antikörper im vorhergehenden Experiment (Abb. 3.2A) ein am C-Terminus des HIF-1 α -Proteins gelegenes Epitop binden, wurde eine eventuelle Spaltstelle am N-Terminus vermutet. Zuerst wurden HIF-1 α -wt-V5-His (C-terminaler V5-Tag) und HA-HIF-1 α -wt (N-terminaler HA-Tag) in 293T-Zellen überexprimiert und die Zellen anschließend mit MG132 und CoCl₂ für 3 h behandelt (Abb. 3.2C). Unter MG132 Behandlung konnte HDP-80 über den C-terminalen V5-Tag (Spur 2), nicht aber über den N-terminalen HA-

Tag (Spur 5) detektiert werden. Zusätzlich wurde HIF-1 α -wt-V5-His in 293T-Zellen überexprimiert und nach denaturierender Lyse in 8 M Harnstoff ein His-*Pulldown* durchgeführt (Abb. 3.2D). Vor der Lyse wurden die Zellen für 3 h entweder mit CoCl₂ oder MG132 behandelt. HIF-1 α konnte über den His-*Tag* aufgereinigt werden wobei sich sowohl unter CoCl₂ als auch unter MG132 verschiedene HIF-1 α -Abbauprodukte ansammelten. Die CoCl₂-Behandlung führte hauptsächlich zum *Pulldown* von nicht-ubiquityliertem HIF-1 α (ca. 110 kDa), HDP-80 und drei weiteren Abbauprodukten (HDPs) der ungefähren Größen 65, 55 und 22 kDa (Spur 5, *). Unter Blockade des Proteasoms mit MG132 wurde weniger nicht-ubiquityliertes HIF-1 α und dafür ubiquityliertes HIF-1 α aufgereinigt, sowie eine große Menge HDP-80 (Spur 6) und in kleineren Mengen auch die HDPs 65,55 und 22 sowie ein zusätzliches HDP-30 (Spur 6, *). Durch die Detektion des His-*Tags* wurden zusätzlich zwei Proteine auf Höhe von ca. 40 und 25 kDa erfasst (Spuren 1-6, #). Diese Proteine werden durch die Behandlungen mit MG132 und CoCl₂ nicht beeinflusst und im *Pulldown* gleichmäßig angereichert, weshalb sie vermutlich unspezifische Signale darstellen.

Mit Hilfe der Datenbank UniProt (Bairoch *et al.*, 2005) wurde nach (Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2009) die *Domain*-Struktur von HIF-1 α dargestellt (Abb. 3.2E). Am N-terminalen Ende finden sich eine basische *Helix-Loop-Helix*-Domäne (bHLH) zur Bindung an DNA und zwei PAS-Domänen (PAS1/2) zur Dimerisierung mit HIF-1 β . Zentral liegt die *oxygen-dependent-degradation-domain* (ODDD) mit den Prolinresten zur Hydroxylierung (P⁴⁰² und P⁵⁶⁴) und die N-terminale Transaktivierungsdomäne (N-TAD). C-terminal findet sich das Nukleäre Lokalisationssignal (NLS) und die C-Terminale Transaktivierungsdomäne (C-TAD) mit einem Asparaginrest (N⁸⁰³) zur Hydroxylierung. Zusätzlich wurde mit dem Online-Programm ProtParam von ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2003) und der aus der Datenbank UniProt entnommenen Aminosäuresequenz von HIF-1 α , die Spaltstelle im HIF-1 α -Protein theoretisch ermittelt, die das C-terminale Abbauprodukt HDP-80 ergeben würde (Berechnungsgrundlage: 1 Aminosäurerest von HIF-1 α entspricht ca. 112 Dalton). HIF-1 α müsste demzufolge ungefähr im Bereich des Aminosäurerests 111, im Bereich der PAS1-Domäne am N-terminalen Ende, gespalten werden (Abb. 3.2E, schwarzer Pfeil). Die HDPs, die im His-HIF-1 α -*Pulldown* aufgereinigt wurden, sind tabellarisch mit ihren theoretisch ermittelten Aminosäureresten und Molekulargewichten dargestellt.

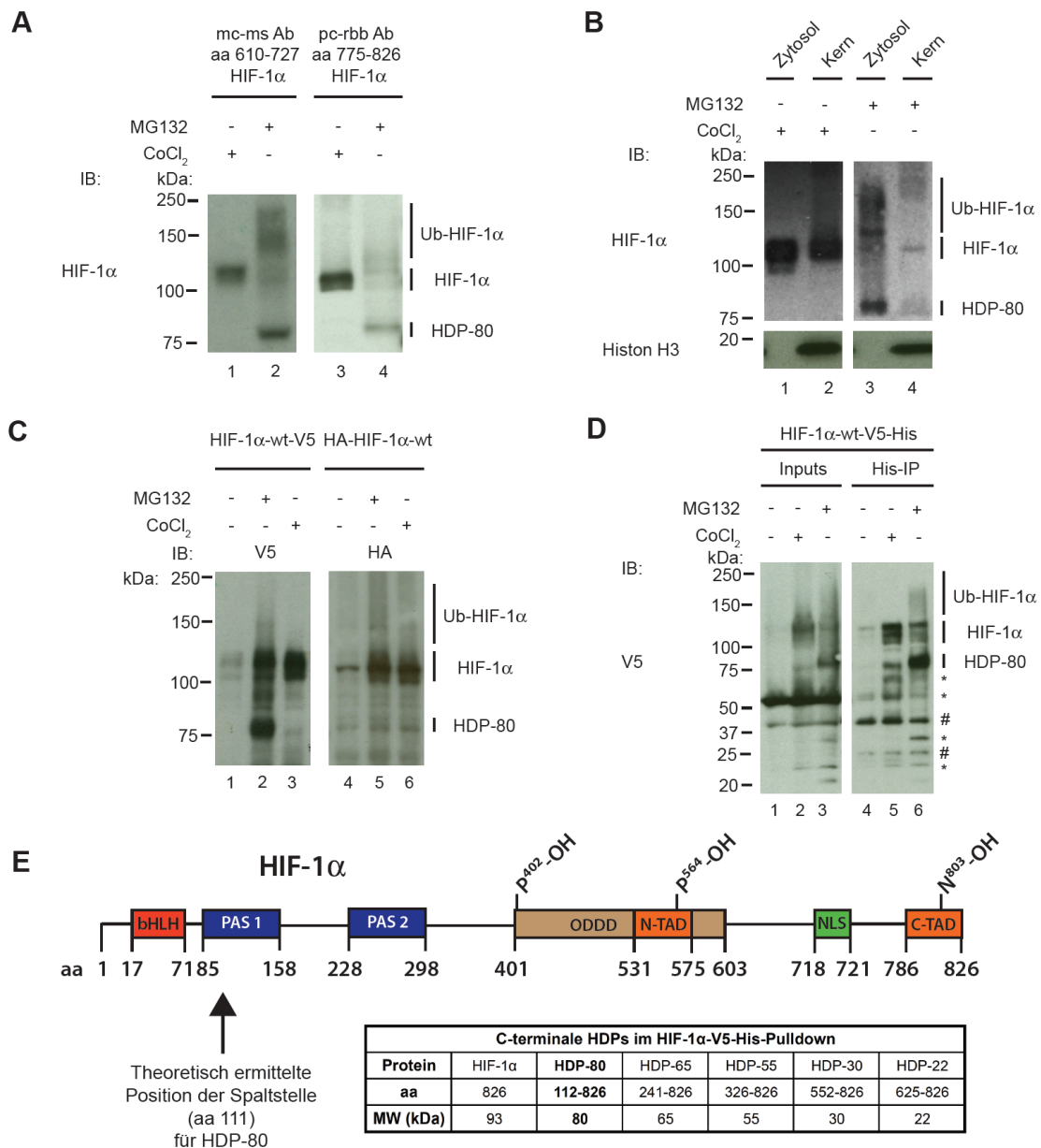


Abbildung 3.2. Identifikation des HIF-1 α Abbauprodukts HDP-80.

(A-D) HeLa Zellen (A+B) oder 293T Zellen (C+D) wurden für 3 h mit 20 μ M (A+B) oder 40 μ M (C+D) MG132 und 200 μ M CoCl₂ behandelt. (A) Die Zellen wurden anschließend in RIPA-Puffer lysiert und pro Spur wurden 50 μ g Gesamtprotein (Spur 1+2) oder 40 μ g (Spur 3+4) aufgetragen. Die Proben für (A-D) wurden durch SDS-PAGE und *Western Blot* (IB) untersucht. Der Immunoblot für (A) wurde mit zwei verschiedenen HIF-1 α -Antikörpern durchgeführt, die gegen unterschiedliche Epitope am C-terminalen Ende des Proteins gerichtet sind. (B) Mit Hilfe des *Subcellular Proteome Extraction Kit* wurde eine Kern- und eine Zytosolfraktion gewonnen. (C) 293T Zellen wurden mit HIF-1 α -wt-V5-His (C-terminaler-Tag) oder mit HA-HIF-1 α -wt (N-terminaler-Tag) transfiziert und in 2x SDS-Probenpuffer direkt lysiert. (D) 293T Zellen wurden mit V5-His-HIF-1 α -wt transfiziert und in 8 M Harnstoff-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde HIF-1 α -wt-V5-His über den His-Tag immunopräzipitiert. (*) weitere HDPs: HDP-65/55/30/22. (#) unspezifische Banden. (E) Darstellung der Domänenstruktur von HIF-1 α , nach (Brahimi-Horn und Pouyssegur, 2009) sowie tabellarische Darstellung der HDPs im V5-His-HIF-1 α -Pulldown (siehe D). (↑) Spaltstelle für HDP-80.

3.3 *Knockdowns* von Ubxd7 und p97 führen zu Veränderungen bei HIF-1 α -Abbau und -Ubiquitylierung

Nach der Etablierung des HIF-1 α -Zeitverlaufsassays sollte die Rolle von Ubxd7 und p97 beim Abbau und der Ubiquitylierung von HIF-1 α in den dazu hergestellten shRNA-HeLa Zellen untersucht werden. Die Zellen wurden vor dem Experiment für 96 h mit Doxycyclin enthaltendem Medium inkubiert, um die shRNA-Expression und somit die *Knockdowns* zu induzieren. HIF-1 α wurde durch Vorinkubation mit Inhibitoren dreier verschiedener Schlüsselenzyme des HIF-*Pathways* stabilisiert: 1) Stabilisierung durch PHD-Inhibitor CoCl₂. 2) Stabilisierung mit NAE-Inhibitor MLN4924. 3) Stabilisierung mit Proteasominhibitor MG132. Der Abbau des stabilisierten HIF-1 α wurde anschließend in Gegenwart von Cycloheximid sowie mit oder ohne MG132 untersucht (siehe auch Material & Methoden 2.5).

Zunächst wurden die HeLa-Zellen mit 200 μ M CoCl₂ für 3 h vorinkubiert. Zum Zeitpunkt 0 min akkumulierten hauptsächlich HIF-1 α -Spezies mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa (Abb. 3.3A, Spuren 2, 8 und 14). HIF-1 α wurde in Gegenwart von Cycloheximid bei *Knockdown* von Ubxd7 und p97 in geringem Maße schneller abgebaut (CHX, Spuren 3-6, 9-12 und 15-18 im Vergleich). HIF-1 α war bei Mangel an Ubxd7 und p97 nach 60 min bereits vollständig abgebaut (Spuren 10 und 16), während in der Kontrolle noch HIF-1 α vorhanden war (Spur 4). Trotz mehrmaligen Wiederholungen und Optimierungen war es nicht möglich diesen Effekt eindrucksvoller darzustellen, wobei der geringfügig schnellere Abbau unter Ubxd7- und p97-*Knockdown* reproduzierbar war. Nach Zugabe von MG132 zusätzlich zu Cycloheximid wurden die durch CoCl₂ stabilisierten HIF-1 α -Spezies einer Größe von ca. 110 kDa in ubiquitylierte Spezies der Größe 150-250 kDa konvertiert. Unter *Knockdown* von Ubxd7 und p97 zeigte dieser Konvertierungsprozess der HIF-1 α -Ubiquitylierung Veränderungen (CHX + MG132, Spuren 3-6, 9-12 und 15-18 im Vergleich). Besonders bei Fehlen von p97 akkumulierten höhermolekulare HIF-1 α -Spezies (>250 kDa), was bei Mangel an Ubxd7 nur in geringerem Maße zu sehen war. Die Geschwindigkeit der Ubiquitylierung, also die Konvertierung von nicht modifiziertem HIF-1 α zu höhermolekularem, ubiquityliertem HIF-1 α , war in den *Knockdowns* von Ubxd7 und p97 nicht verändert.

Die Beobachtungen aus diesem ersten Experiment zeigen nur geringe Veränderungen der Ubiquitylierung und des Abbaus von HIF-1 α unter Ubxd7 und p97 *Knockdown* und führen zu grundlegenden Fragen und Kritikpunkten: (1) Bei der künstlichen Stabilisierung von HIF-1 α durch beispielsweise CoCl₂ kann davon ausgegangen

werden, dass verschiedene *Pools* von HIF-1 α mit verschiedener intrazellulärer Lokalisation akkumulieren. Hierbei wäre es denkbar, dass Ubxd7 und p97 nur auf einen dieser *Pools* einflussnehmen und deshalb in den bisherigen Experimenten kein größerer Unterschied im HIF-1 α -Abbau zwischen Kontroll- und *Knockdown*-Zellen zu sehen war. (2) Eine signifikante Veränderung im HIF-1 α -*Turnover* unter den *Knockdowns* von Ubxd7 und p97 wäre nur zu erwarten, wenn dieser auch zum großen Teil vom neddylierten CRL^{VBC}-Komplex abhängt. Das bisherige Experiment (Abb. 3.3A) gibt jedoch keinen Hinweis darauf, ob HIF-1 α hauptsächlich in Abhängig von neddyliertem CRL^{VBC} ubiquityliert und abgebaut wird. (3) Im Verlauf des Experiments nahm die Proteinkonzentration von Ub-HIF-1 α trotz Inhibierung des Proteasoms in geringem Maße ab, besonders unter *Knockdown* von p97 (Abb. 3.3A, Spuren 15/16 verglichen mit 17/18). Dies könnte entweder durch einen weiteren Proteasom-unabhängigen Abbauweg geschehen, oder Deubiquitylierungsenzyme könnten den Ubiquitylierungsstatus von HIF-1 α verändern. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass MG132 das Proteasom nur ineffizient blockiert.

Zur Untersuchung des *Turnovers* verschiedener HIF-1 α -*Pools* sollte ein vereinfachtes Cycloheximid-Experiment nach Vorinkubation mit 200 μ M CoCl₂ für 3 h durchgeführt und die Proben nach zellulärer Lokalisation fraktioniert werden (Beschreibung unter Material & Methoden 2.3.5). Es wurden eine Zytoplasmafraktion, eine lösliche Kernfraktion und eine Chromatin-gebundene Kernfraktion gesammelt (Abb. 3.3B). Als Marker für die Kernfraktion wurde Histon H3 und als Marker für die Zytoplasmafraktion α -Tubulin verwendet. In der Zytoplasmafraktion war der Abbau von HIF-1 α im Vergleich zu den Kernfraktionen wesentlich schneller. Nach 45 min war im Zytoplasma das gesamte HIF-1 α abgebaut (Spuren 3, 6 und 9), während in der löslichen Kernfraktion noch wesentliche Anteile von HIF-1 α stabil waren. Erwartungsgemäß zeigte sich in der löslichen Kernfraktion wie schon im vorherigen Experiment (Abb. 3.3A) unter Ubxd7- und p97-*Knockdown* ein schnellerer Abbau des stabilisierten HIF-1 α als in der Kontrolle (Spuren 3+4, 6+7 und 9+10 im Vergleich). Die Chromatin-gebundene Kernfraktion zeigte Variationen in der Gesamtproteinladung und ist somit nur schwer zu analysieren.

Um zu untersuchen, ob der Abbau von HIF-1 α zu großem Teil von Cul2^{VBC} und somit von der Cullin-Neddylierung abhängt, wurde das Zeitverlaufsexperiment mit dreistündiger Vorinkubation mit 1 μ M MLN4924 wiederholt (Abb. 3.3C). Hierbei sollten alle Cullin-RING-Ligasen irreversibel im deneddylierten und somit - wie bisher anzunehmen - im inaktiven Zustand vorliegen. Cullin2 befindet sich in diesem Experiment in den Kontroll-Spuren (Spuren 1, 7 und 13) sowohl im neddylierten als auch im deneddylierten Zustand, während nach Behandlung mit MLN4924 nur noch

die deneddylierte Form zu detektieren ist (Spuren 2-6, 8-12 und 14-18). Überraschenderweise wurde HIF-1 α trotz deneddylierter Cullin2 mit ähnlicher Geschwindigkeit abgebaut wie im vorherigen Experiment (Abb. 3.3A). Im Gegensatz dazu zeigte sich hier unter *Knockdown* von Ubxd7 und p97 keine Akzeleration im Abbau von HIF-1 α . Nach Zugabe von MG132 zusätzlich zu Cycloheximid konnte auch hier eine Ubiquitylierung von HIF-1 α beobachtet werden. Der Ubiquitylierungsstatus von HIF-1 α wich in Kontrolle, Ubxd7-*Knockdown* und p97-*Knockdown* leicht voneinander ab. Bei *Knockdown* von Ubxd7 (Spuren 9-12) akkumulierte geringfügig weniger und bei *Knockdown* von p97 (Spuren 14-18) geringfügig mehr Ub-HIF-1 α im Vergleich zur Kontrolle. Außerdem wurde unter Mangel an p97 mehr HIF-1 α in höhermolekulare Ub-Spezies (>250 kDa) konvertiert (Spuren 14-18) und unter Mangel an Ubxd7 weniger (Spuren 9-12).

Abschließend sollte einerseits die Effizienz der Proteasominhibition geklärt werden, und andererseits sollte überprüft werden, ob p97 durch eventuell interagierende Deubiquitylierungsenzyme den Ubiquitylierungsstatus von HIF-1 α verändert oder die Ubiquitylierung durch Cul2^{VBC} selbst beeinflusst. Das Experiment wurde hierfür bei dreistündiger Vorinkubation mit 20 μ M MG132 wiederholt (Abb. 3.3D). Nach Cycloheximidbehandlung zeigt sich zwischen Kontrolle und Ubxd7-*Knockdown* kein Unterschied (Spuren 1-6 und 7-12). Bei *Knockdown* von p97 zeigten sich auch hier vermehrt höhermolekulare HIF-1 α -Spezies (>250 kDa), und der proteasomale Abbau war ebenfalls verlangsamt (Spuren 13-18). Bei p97-*Knockdown* war Ub-HIF-1 α nach 60 min größtenteils noch stabil (Spur 16), während in Kontrolle und Ubxd7-*Knockdown* (Spuren 4 und 10) das meiste HIF-1 α bereits abgebaut war. Unter Zugabe von MG132 zusätzlich zu Cycloheximid blieb der Großteil des stabilisierten Ub-HIF-1 α auch während der *Chase* stabil. Während das ubiquitylierte HIF-1 α in der Kontrolle und bei Ubxd7-*Knockdown* mit Molekulargewichten zwischen 150 und 250 kDa akkumulierte, wurde HIF-1 α bei Mangel an p97 zum einen in größeren Mengen und zum anderen bei Molekulargewichten von 110 bis >300 kDa stabilisiert. Die hochmolekularen Ub-HIF-1 α -Spezies (> 250 kDa) wurden bei Fehlen von p97 nach 120 min in Spezies < 250 kDa konvertiert (Spuren 14-18).

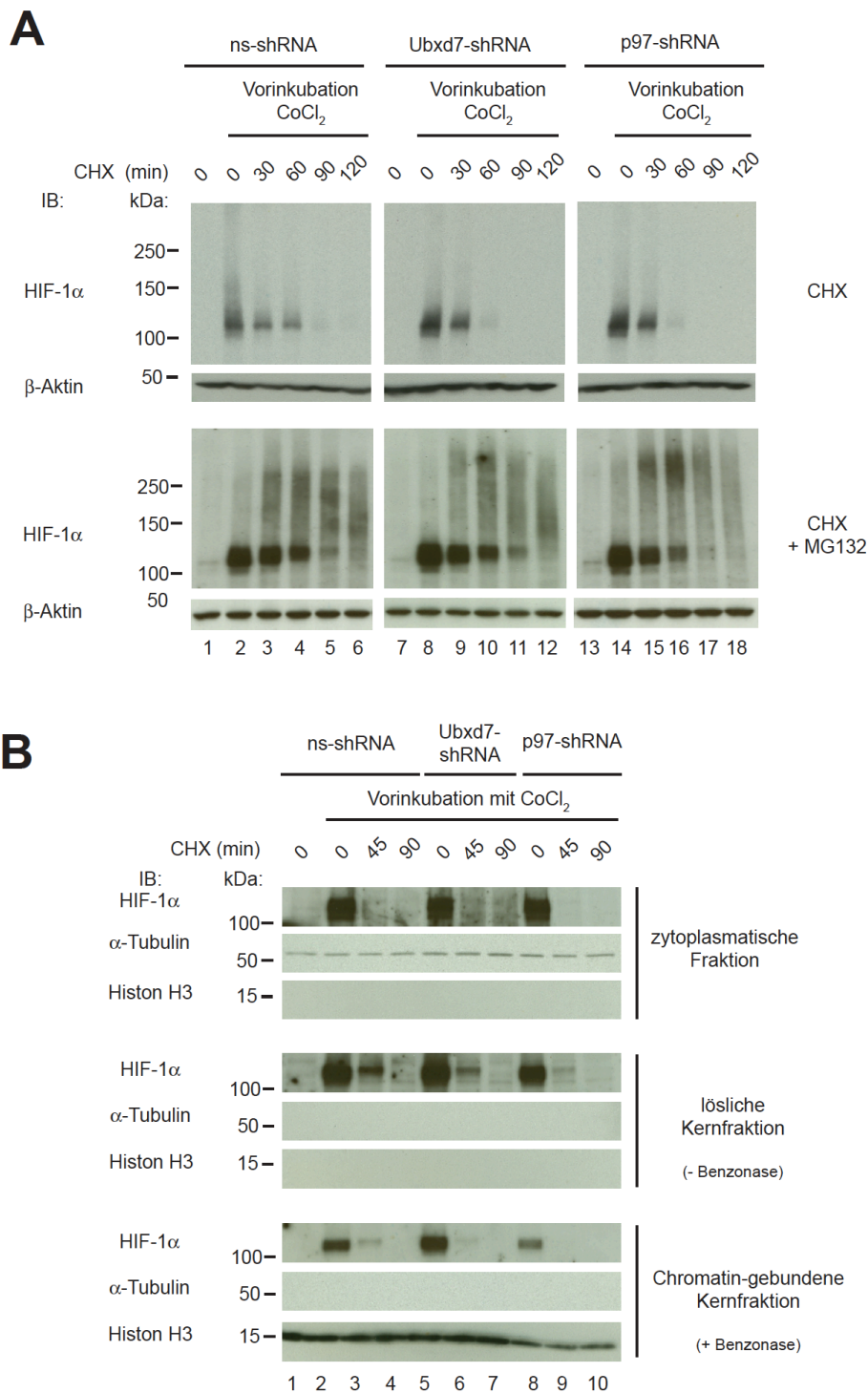
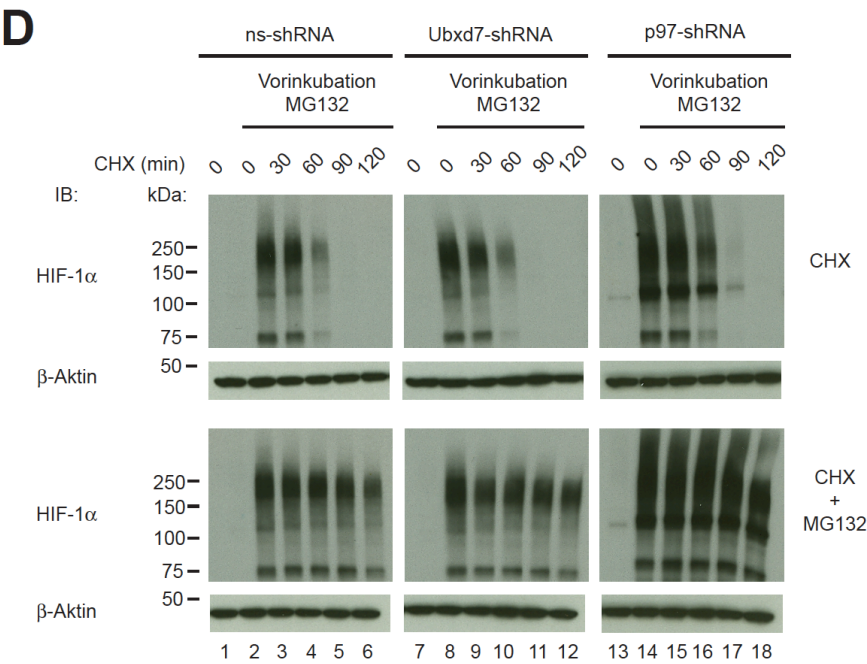
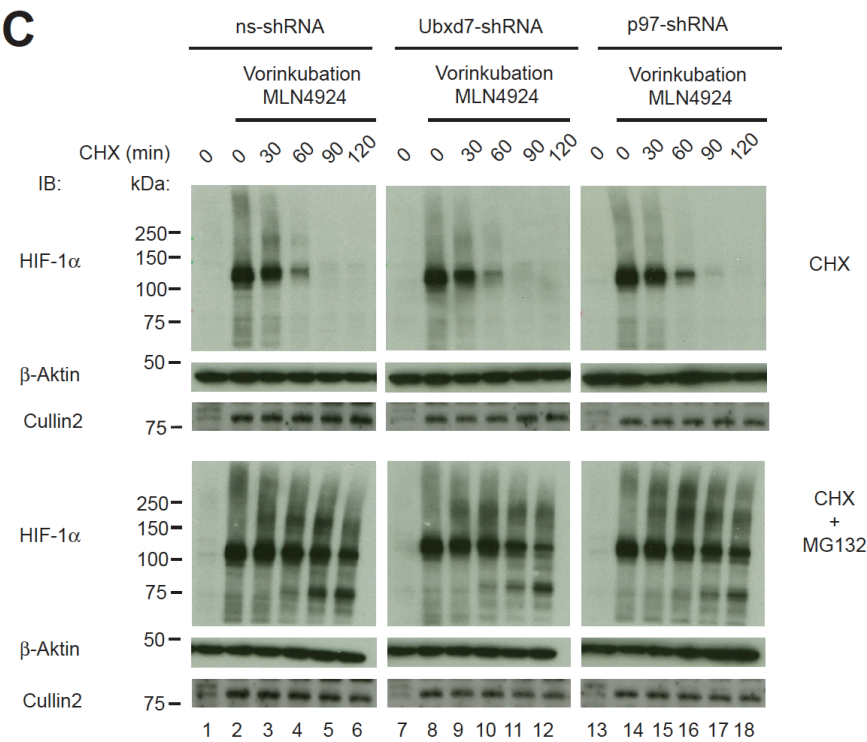


Abbildung 3.3 A-D. Knockdowns von Ubx7 und p97 führen zu Veränderungen bei HIF-1α-Abbau und -Ubiquitylierung.

HeLa Zellen mit Doxycyclin induzierbaren shRNAs für *non-silencing* (ns), Ubx7 und p97 wurden für 96 h mit 1 µg/ml Doxycyclin inkubiert (**A-D**). Die Zellen wurden dann mit 200 µM CoCl₂ (**A**), mit 1 µM MLN4924 (**C**, siehe nächste Seite) oder 20 µM MG132 (**D**, siehe nächste Seite) für 3 h behandelt. Nach Auswaschen der Inhibitoren mit PBS wurden die Zellen mit 45 µg/ml Cycloheximid (CHX) enthaltendem Medium mit oder ohne 20 µM MG132 inkubiert. Die Zellen für (**A**, **C** und **D**) wurden in 2x SDS-Probenpuffer lysiert. (**B**) Die Zellen wurden mit 200 µM CoCl₂ für 3 h behandelt und anschließend mit 45 µg/ml Cycloheximid enthaltendem Medium inkubiert. Zur Lyse wurde ein *Subcellular Proteome Extraction Kit* verwendet und eine zytoplasmatische, eine lösliche Kernfraktion und Chromatin-gebundene Kernfraktion isoliert. Die Proben für (**A-D**) wurden durch SDS-PAGE und Western Blot (IB) analysiert.



3.4 Abbau und Ubiquitylierung von HIF-1 α sind zu großen Teilen unabhängig von der Cullin-Neddylierung

Die Ergebnisse aus den bisherigen Experimenten wiesen darauf hin, dass ein beträchtlicher Teil von HIF-1 α unabhängig von der Neddylierung der Cullin-Ligasen ubiquityliert und abgebaut werden kann (Abb. 3.3C). Da Ubx7 wesentlich stärker mit neddylierten Cullin-Ligasen interagiert, wäre ein Substrat, dessen Abbau und Ubiquitylierung nicht oder nur in geringem Maße von der Neddylierung abhängt, nicht ideal, um die Rolle der Ubx7-Cullin-Interaktion zu studieren. Deshalb sollte die Abhängigkeit der Ubiquitylierung und des Abbaus von HIF-1 α vom Cullin-Neddylierungsstatus in einigen Experimenten detaillierter überprüft werden.

Zunächst sollte untersucht werden, ob HIF-1 α auch nach Blockade der Hydroxylierung (CoCl₂) und der Neddylierung (MLN4924) noch ubiquityliert werden kann. Dafür wurden *non-silencing*-, Ubx7- und p97-shRNA-HeLa-Zellen mit MG132, mit MG132 und zusätzlich CoCl₂ oder mit MG132 und zusätzlich MLN4924 für 4 h behandelt, um HIF-1 α zu stabilisieren (Abb. 3.4A). Die shRNA-Zellen wurden vor dem Experiment für 96 h mit Doxycyclin enthaltendem Medium inkubiert, um die shRNA-Expression und somit die *Knockdowns* zu induzieren. Erwartungsgemäß zeigte die Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG132 eine Akkumulation von ubiquitylierten HIF-1 α -Spezies (Spur 4). Wie schon von Alexandru in 2008 beschrieben (Alexandru *et al.*, 2008), führte der *Knockdown* von Ubx7 zu geringfügig weniger Ub-HIF-1 α -Akkumulation (Spur 5) und der *Knockdown* von p97 zu mehr und höhermolekularem Ub-HIF-1 α (Spur 6). Der *Knockdown* von p97 führte außerdem erwartungsgemäß auch ohne Proteasom-Inhibition zu einer Stabilisierung von ubiquitylierten Proteinen (Immunoblot Ubiquitin, Spur 3). Die zusätzliche Blockade des Proteasoms verstärkte diesen Effekt (Spur 6). Der *Knockdown* von Ubx7 hatte keinen Effekt auf die Stabilisation von Ub-Proteinen (Spur 2). Unter zusätzlicher Behandlung mit CoCl₂ wurde ein Teil nicht ubiquityliertes HIF-1 α stabilisiert, während der größere Anteil in ubiquitylierter Form akkumulierte (Spur 7). Auf die Stabilisierung von Ub-Proteinen hatte die Behandlung mit CoCl₂ keinen Einfluss. Der zusätzlich stabilisierende Effekt des p97-*Knockdowns* und der dazu gegensätzliche Effekt des Ubx7-*Knockdowns* waren auch hier zu beobachten (Spuren 8 und 9). Nach zusätzlicher Behandlung mit MLN4924 wurde im Vergleich zur Behandlung mit CoCl₂ mehr nicht ubiquityliertes HIF-1 α stabilisiert (Spuren 10-12). Trotzdem akkumulierte auch unter Inhibierung der Neddylierung, also unter Inaktivierung von Cullin-Ligasen, ubiquityliertes HIF-1 α , wenngleich auch weniger. Interessanterweise waren die Effekte des Ubx7- und p97-*Knockdowns* hierbei

aufgehoben. Auch der stabilisierende Effekt des p97-*Knockdowns* auf Ub-Proteine war deutlich reduziert.

Um nun die Abhängigkeit des HIF-1 α -Abbaus von der Cullin-Neddylierung genauer zu untersuchen und mit dem Abbau des Cullin1/3 Substrats Nrf2 zu vergleichen, wurde das Experiment von Abbildung 3.3C in ähnlicher Weise wiederholt. Die shRNA-HeLa-Zellen wurden wieder für 96 h mit Doxycyclin enthaltendem Medium inkubiert, um die shRNA-Expression und somit die *Knockdowns* von Ubx7 und p97 zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen mit MLN4924 für 2 h behandelt, um HIF-1 α zu stabilisieren. Der Abbau von HIF-1 α wurde anschließend nach Zugabe von Cycloheximid zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet (Abb. 3.4B). Nach 90 min war HIF-1 α fast vollständig abgebaut und zwischen den *Knockdowns* (p97 und Ubx7) und der Kontrolle fanden sich keine Unterschiede in der Geschwindigkeit des Abbaus. Nrf2, als weiteres Cullin-Substrat, wurde durch MLN4924 ebenfalls stabilisiert, konnte aber während der 90-minütigen Cycloheximidbehandlung nur verlangsamt abgebaut werden. Die *Knockdowns* hatten auch hier keinen Effekt. Die Cullin2-Ligase lag nach Behandlung mit MLN4924 erwartungsgemäß nur im deneddylierten Zustand vor (Spuren 2-5 im Vergleich zu Spur 1).

Nach diesen Experimenten stand fest, dass HIF-1 α auch abgebaut werden kann, wenn sich die Cullin-Ligasen im deneddylierten Zustand befinden. Um einschätzen zu können, ob zumindest ein gewisser Anteil von HIF-1 α in Abhängigkeit von neddylierten Cullin-Proteinen abgebaut wird, wurde HIF-1 α zunächst in HeLa-Zellen mit CoCl₂ stabilisiert und der Abbau dann in Gegenwart von Cycloheximid mit oder ohne MLN4924 verfolgt (Abb. 3.4C). Es zeigte sich, dass eine kleine Fraktion des stabilisierten HIF-1 α unter Zugabe von MLN4924 langsamer abgebaut wird. Während HIF-1 α in Abwesenheit von MLN4924 schon nach 60 min vollständig abgebaut war (Spur 4), war HIF-1 α in Anwesenheit von MLN4924 noch nach 120 min in geringer Menge nachweisbar (Spur 6). Die Cullin2-Ligase lag wie zu erwarten unter MLN4924-Behandlung im deneddylierten Zustand vor (Spuren 3-6).

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die Neddylierung von CRLs *in vitro* wie *in vivo* aktivierende Funktion hat. Demnach führt die Modifikation mit Nedd8 zu einer Konformationsänderung des Cullin-Komplexes und bringt das Substrat näher an die E2-Ligase, um den Ubiquitylierungsprozess zu ermöglichen (siehe auch 1.2.1). Die Beobachtung, dass HIF-1 α auch unabhängig von der Neddylierung ubiquityliert und abgebaut wird, warf die Frage auf, ob dies auch für andere Cullin-Substrate gilt. Dies sollte mit einem ähnlichen Assay getestet werden, wobei HeLa Zellen zunächst für 5 h mit MG132 behandelt wurden, um Proteasom- und Cullin-Substrate zu stabilisieren. Anschließend wurde der Abbau dieser Substrate in Anwesenheit von Cycloheximid

mit oder ohne MLN4924 untersucht. Als weitere Cullin-Substrate wurden Nrf2 und p27 untersucht, wobei das Nicht-Cullin- aber Proteasom-Substrat p57 als Kontrolle diente. Das Cullin1/3 Substrat Nrf2 wurde unter Zugabe von MLN4924 ebenfalls abgebaut, wenn auch wesentlich langsamer. Ohne MLN4924 war Nrf2 nach 180 min fast komplett abgebaut (Spur 5), wobei mit MLN4924 sowohl nach 180 als auch nach 240 min noch größere Mengen vorhanden waren (Spuren 5 und 6). Das Cullin1/4 Substrat p27 konnte dagegen unter Behandlung mit MLN4924 nicht abgebaut werden. Während die Konzentration von p27 ohne MLN4924 nach 240 min deutlich abfiel (Spur 6), blieb p27 in Anwesenheit von MLN4924 stabil. Der Abbau von p53 wurde dagegen von MLN4924 nicht beeinflusst. In Anwesenheit von MLN4924 war Cullin1 immer deneddyliert (Spuren 3-6).

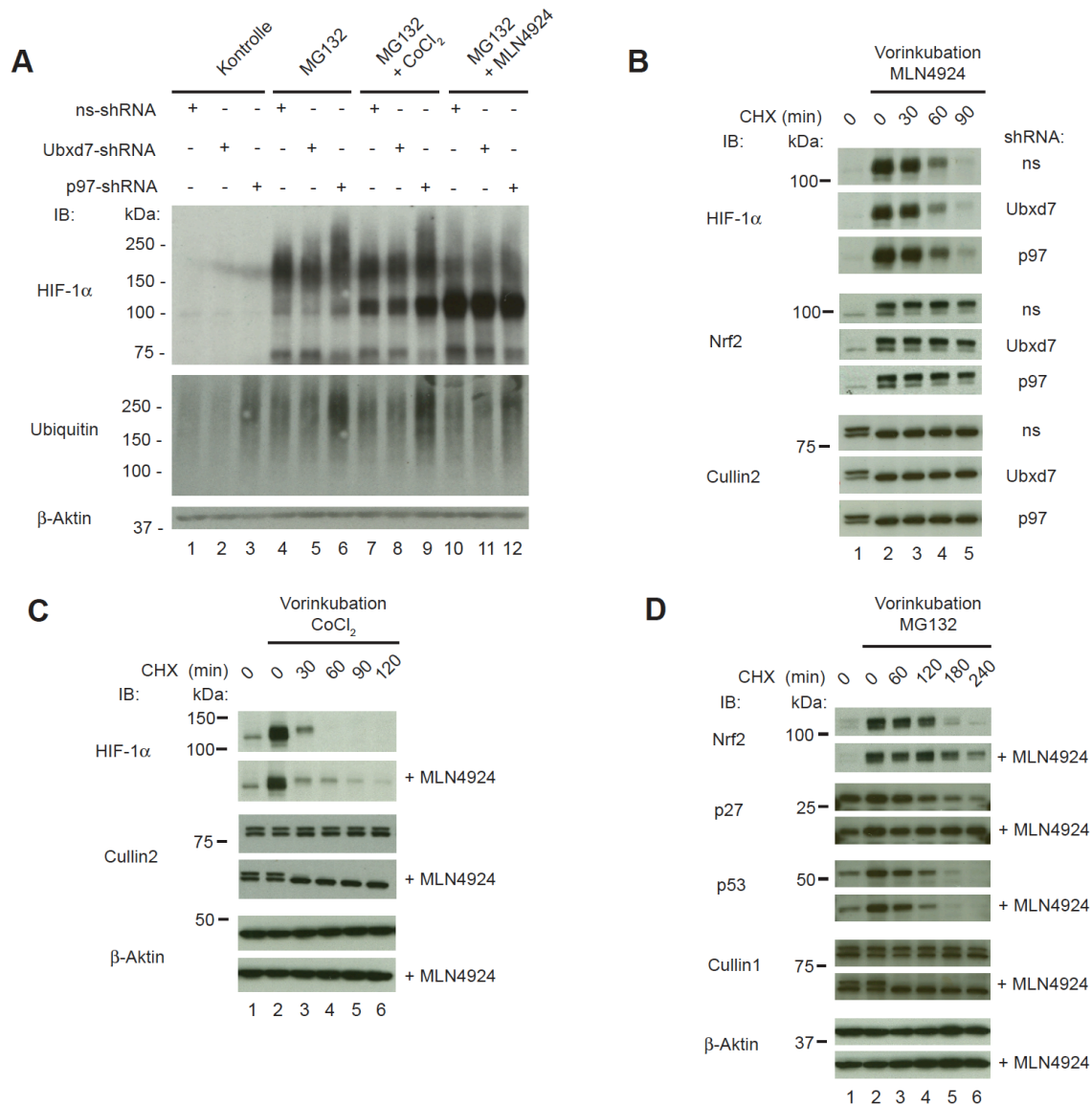


Abbildung 3.4. Abbau und Ubiquitylierung von HIF-1α sind zu großen Teilen unabhängig von der Cullin-Neddylierung.

(A+B) HeLa Zellen mit Doxycyclin induzierbaren shRNAs für *non-silencing* (ns), Ubx7 und p97 wurden für 96 h mit 1 µg/ml Doxycyclin inkubiert. (A) Die Zellen wurden mit 40 µM MG132, 40 µM MG132 und 200 µM CoCl₂ oder 40 µM MG132 und 1 µM MLN4924 für 4 h behandelt. (B) HeLa Zellen wurden mit 1 µM MLN4924 für 2 h behandelt und nach Auswaschen von MLN4924 durch PBS mit 45 µg/ml Cycloheximid (CHX) enthaltendem Medium inkubiert. (C+D) HeLa Zellen wurden mit 200 µM CoCl₂ für 3 h oder mit 20 µM MG132 für 5 h behandelt. Nach Auswaschen der Inhibitoren wurde mit 45 µg/ml Cycloheximid enthaltendem Medium mit oder ohne 1 µM MLN4924 inkubiert. Die Zellen für (A-D) wurden in 2x SDS-Probenpuffer lysiert und anschließend mit SDS-PAGE und *Western Blot* (IB) analysiert.

3.5 Der Abbau von HIF-2 α ist unabhängig von der Cullin-Neddylierung, Ubx7 und p97

Aus den bisherigen Ergebnissen ging hervor, dass der Abbau des Modellsubstrats HIF-1 α nicht wie erwartet vollständig von der Cullin-Neddylierung abhängt und somit HIF-1 α nicht optimal geeignet ist, um die Rolle der Ubx7-Nedd8-Cullin-Interaktion zu untersuchen. Diesen Ergebnissen zufolge könnte HIF-1 α entweder durch weitere zusätzliche, Cullin-unabhängige Abbauwege abgebaut werden oder aber Cullin2 ist auch im deneddylierten Zustand fähig HIF-1 α mit unveränderter Geschwindigkeit zu ubiquitylieren und somit dem Abbau zuzuführen. Deshalb sollte aus zwei Gründen an Stelle von HIF-1 α der Abbau von HIF-2 α als Cullin2 Substrat beobachtet werden. (1) Für HIF-2 α wurde angenommen, dass der Abbau mehr von Cullin2^{VBC} abhängt, als der Abbau von HIF-1 α . (2) Um den Abbau von HIF-2 α in Abhängigkeit von VHL zu studieren, konnten 786-0-Zellen verwendet werden, welche weder HIF-1 α , noch den Substratrezeptor VHL exprimieren, dafür aber HIF-2 α . Diese Zellen wurden stabil mit einem VHL-wt und den shRNAs für *non-silencing*, Ubx7 und p97 transduziert (siehe auch Abb. 3.1G+H).

Um zu überprüfen, ob der Abbau von HIF-2 α von VHL und neddyliertem Cullin2 abhängt, wurden 786-0-Zellen +/- VHL-wt für 3 h mit CoCl₂ oder MLN4924 behandelt (Abb. 3.5A). Der Abbau von HIF-2 α wurde daraufhin nach Zugabe von Cycloheximid verfolgt. In Zellen, denen VHL fehlte, akkumulierte HIF-2 α auch ohne CoCl₂ oder MLN4924 Behandlung, während in Zellen mit VHL fast das gesamte HIF-2 α abgebaut war (Spuren 1 und 6). Die Behandlung mit CoCl₂ und MLN4924 hatte in Zellen ohne VHL keinen Einfluss auf die HIF-2 α -Konzentration, während in Zellen mit VHL nun HIF-2 α stabilisiert wurde (Spuren 2 und 7). In VHL-wt-exprimierenden 786-0-Zellen wurde HIF-2 α , stabilisiert durch CoCl₂ oder MLN4924, mit etwa gleicher Rate abgebaut (Spuren 3-5 und 8-10). In 786-0-Zellen ohne VHL konnte HIF-2 α dagegen nur sehr verlangsamt abgebaut werden (vergleiche Zeitpunkt 90 min = Spuren 5 und 10, mit Zeitpunkt 0 min = Spuren 1 und 6). In den MLN4924 behandelten Zellen lag Cullin2 wie erwartet im komplett deneddylierten Zustand vor (Spuren 7-10).

Zusätzlich konnte auch in diesem Experiment, wie schon unter 3.4 beschrieben, der Abbau von Nrf2, einem Cullin1/3 Substrat, untersucht werden. Erwartungsgemäß wirkte sich die Behandlung mit CoCl₂ nicht auf die Stabilisierung von Nrf2 aus (Abb. 3.5A, Spur 2), wohingegen die Behandlung mit MLN4924 einen Pool an Nrf2 akkumulieren ließ (Spur 7). Nrf2 wurde im Zeitverlauf in den Zellen mit und in den Zellen ohne VHL in gleichem Maße und zu gleicher Rate abgebaut, wobei die CRLs,

wie stellvertretend am Cullin2 Immunoblot zu sehen, deneddyliert vorlagen (Spuren 7 bis 10).

Es sollte nun untersucht werden, wie sich der *Knockdown* von Ubx7 und p97 auf den Abbau von HIF-2 α auswirkt. Dazu wurden 786-0-Zellen-shRNA Zellen +/- VHL-wt für 96 h mit Doxycyclin enthaltendem Medium inkubiert, um die shRNAs und somit die entsprechenden *Knockdowns* zu induzieren. Durch Vorinkubation mit CoCl₂ wurde in den VHL-Null-Zellen ein *Pool* von HIF-2 α stabilisiert, dessen Abbau dann in Anwesenheit von Cycloheximid beobachtet wurde (Abb. 3.5B). In Zellen ohne VHL war HIF-2 α weitgehend stabil, und die *Knockdowns* von Ubx7 und p97 zeigten keinen Einfluss (Spuren 1-5). In VHL-wt-exprimierenden Zellen wurde unter Ubx7- und p97-*Knockdown* durch CoCl₂ etwas weniger HIF-2 α stabilisiert (Spur 7). Die Rate des Abbaus war jedoch in Kontrolle und *Knockdowns* in etwa gleich (Spuren 8-10). Sowohl in der Kontrolle, als auch bei Ubx7- und p97-*Knockdown*, war ein wesentlicher Teil des HIF-2 α -Pools bereits nach 60 min abgebaut und der größte Teil nach 90 min (Spuren 9 und 10).

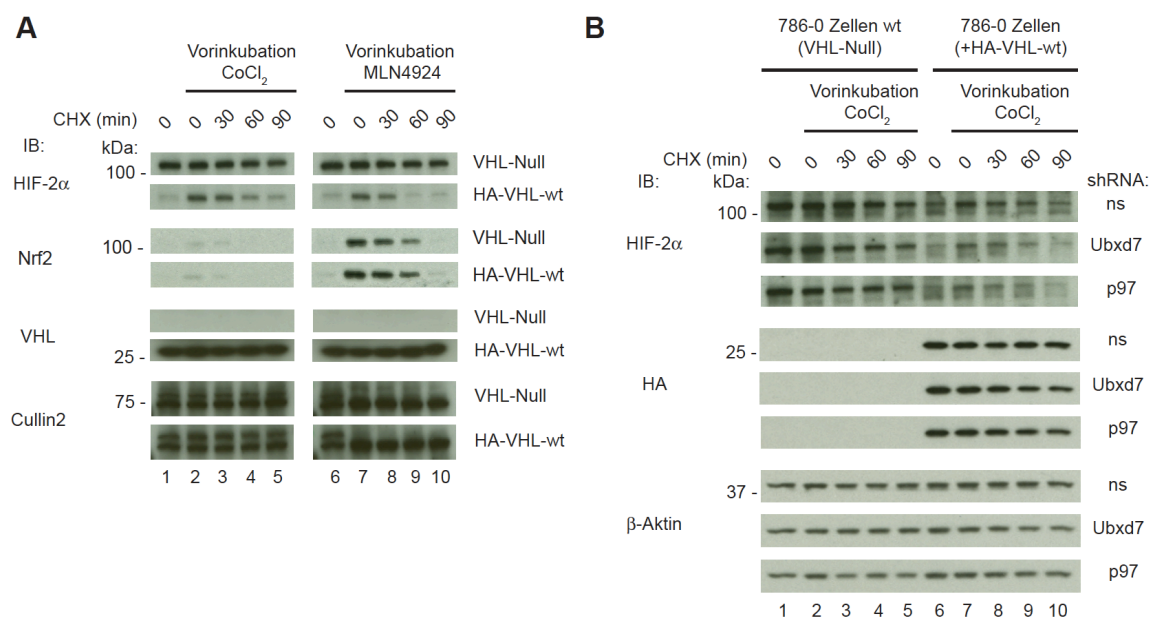


Abbildung 3.5. Der Abbau von HIF-2 α ist unabhängig von der Cullin-Neddylierung, Ubx7 und p97.

(A) 786-0-wt Zellen (VHL-Null) oder 786-0-HA-VHL-wt Zellen (HA-VHL-wt) wurden mit 200 μ M CoCl₂ oder 1 μ M MLN4924 für 3 h behandelt. Nach dem Auswaschen von CoCl₂ und MLN4924 durch PBS wurden die Zellen mit 45 μ g/ml Cycloheximid (CHX) enthaltendem Medium inkubiert. **(B)** 786-0-wt Zellen oder stabil wt-VHL exprimierende 786-0 Zellen mit Doxycyclin induzierbaren shRNAs für *non-silencing* (ns), Ubx7 und p97 wurden für 96 h mit 1 μ g/ml Doxycyclin inkubiert. Nach Behandlung mit CoCl₂ für 3 h wurde CoCl₂ mit PBS ausgewaschen und die Zellen mit 45 μ g/ml Cycloheximid enthaltendem Medium inkubiert. Die Zellen für **(A+B)** wurden direkt in 2x SDS-Probenpuffer lysiert und anschließend mit SDS-PAGE und Western Blot (IB) analysiert.

3.6 Ubxd7 inhibiert die Ubiquitylierung eines HIF-1 α -Peptids *in vitro*

Um die Funktion der Ubxd7-Nedd8-Cullin-Interaktion genauer zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Ubiquitylierungsassay für ein mit dem Radioisotop ^{32}P markiertes HIF-1 α -Peptid etabliert (siehe auch Kapitel 2.6). Das HIF-1 α -Peptid sollte vom Cullin2^{VBC}-Komplex (neddyliert oder deneddyliert) in An- oder Abwesenheit von Ubxd7 *in vitro* ubiquityliert werden. Die Ubiquitylierungsreaktion wurde deshalb mit vier verschiedenen Ansätzen durchgeführt: (1) Cullin2^{VBC} ohne Ubxd7 (-N8/-U7). (2) Cullin2^{VBC} mit Ubxd7(-N8/+U7). (3) Nedd8-Cullin2^{VBC} ohne Ubxd7(+N8/-U7). (4) Nedd8-Cullin2^{VBC} mit Ubxd7(+N8/+U7). Nach je 5, 10 und 20 min wurden den Reaktionsansätzen Proben entnommen und mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt.

Die Proben wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel wurde anschließend getrocknet. Mit Hilfe eines *Phosphor-Screens* wurde eine Autoradiographie durchgeführt und dann der *Phosphor-Screen* mit einem *Phosphor-Imager* gescannt. (Abb. 3.6A). Das ^{32}P -Signal wurde quantitativ erfasst und gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 3.6B). Wie zu erwarten und bereits beschrieben (Saha und Deshaies, 2008), steigerte die Neddylierung des Cullin2^{VBC}-Komplexes die Effektivität der Ubiquitylierungsreaktion etwa um das 7- bis 8-Fache (s = Steigung; $s(+\text{N8}/-\text{U7})/s(-\text{N8}/-\text{U7}) = 6,90$; $s(+\text{N8}/+\text{U7})/(-\text{N8}/\text{U7}) = 7,82$). Ohne Neddylierung war die Effektivität der Ubiquitylierung in dieser Reaktion sehr gering. Nach 20 min waren ohne Zugabe von Ubxd7 nur 3,8 % (-N8/-U7) des HIF-1 α -Peptids und mit Ubxd7 nur 1,8 % (-N8/+U7) ubiquityliert. Mit Neddylierung waren nach 20 min ohne Ubxd7 25,6 % (+N8/-U7) und mit Ubxd7 16,9 % (+N8/+U7) ubiquityliert. Auch die Rate der Ubiquitylierung war in beiden Fällen, mit oder ohne Neddylierung des Cullin2^{VBC}-Komplexes, nach Zugabe von Ubxd7 verringert. Ubxd7 verlangsamte die Ubiquitylierungsreaktion des neddylierten Cullin2^{VBC}-Komplexes um 65,5 % ($s(+\text{N8}/+\text{U7})/s(+\text{N8}/-\text{U7})$) und die des nicht neddylierten Cullin2^{VBC}-Komplexes um 57,8 % ($s(-\text{N8}/+\text{U7})/(-\text{N8}/-\text{U7})$).

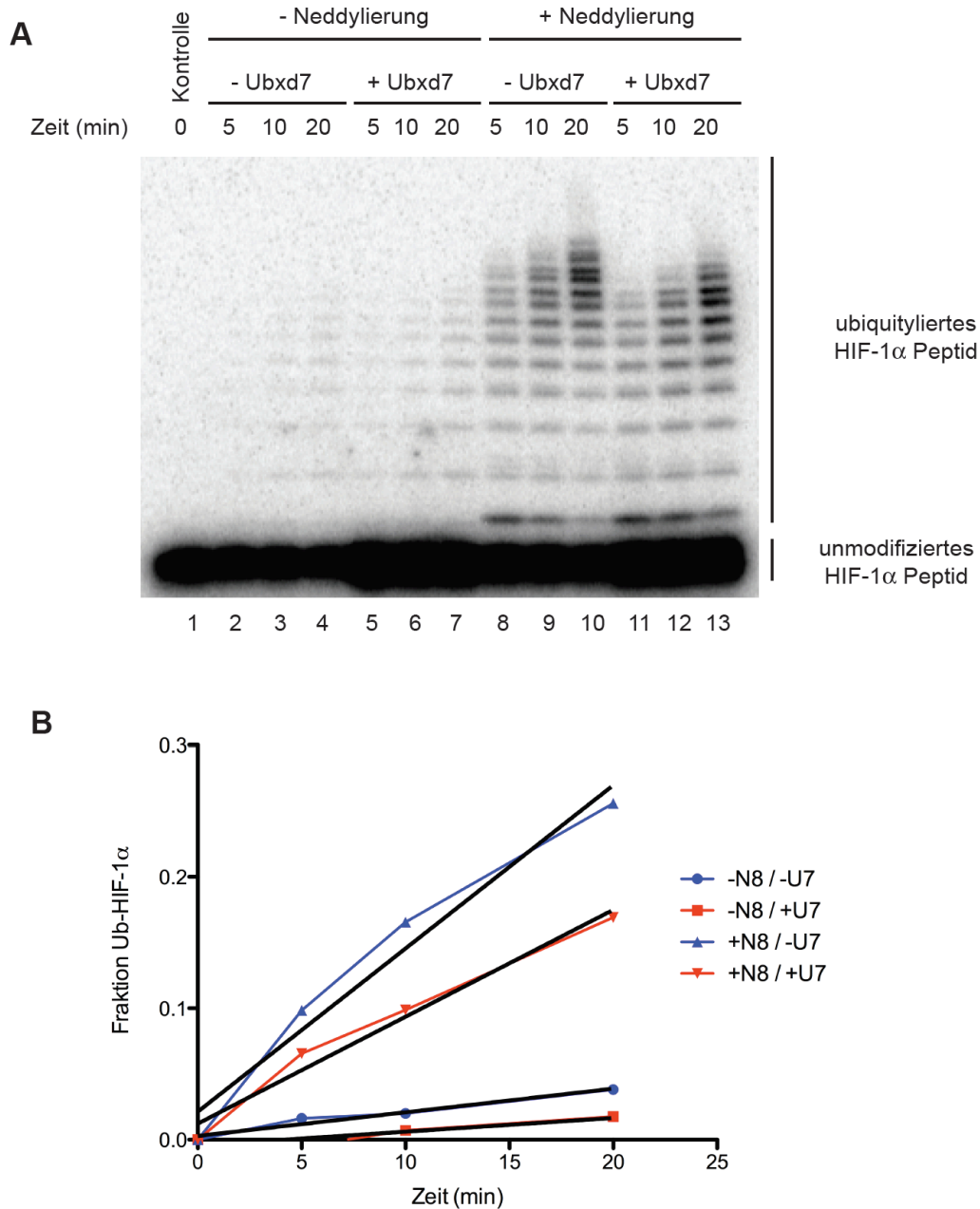


Abbildung 3.6. Ubxd7 inhibiert die Ubiquitylierung eines HIF-1α-Peptides *in vitro*

(A) 150 nM Cullin2, 150 nM VCB und 800 nM 32 P-markiertes HIF-1α-Peptid wurden mit oder ohne Neddylierungs-Enzymen (+/-N8) (0,3 μ M Nedd8-E1, 2 μ M Ubc12 und 10 μ M Nedd8) und mit oder ohne 1 μ M Ubxd7 (+/-U7) für 30 min in 1x Reaktions-Puffer (30 mM Tris pH 7,6; 5 mM $MgCl_2$; 2 mM DTT; 2 mM ATP; 100 mM NaCl) bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Ubiquitylierungsreaktion durch Zugabe der Ubiquitylierungs-Enzyme (1 μ M Ubiquitin-E1, 100 nM Cdc34 (Ubiquitin-E2) und 60 μ M Ubiquitin) gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer beendet. Die Proben wurden durch ein 4-20 % SDS-PAGE aufgetrennt, und das Gel wurde anschließend getrocknet. **(B)** Mit Hilfe eines *Phosphor-Screens* wurde eine Autoradiographie durchgeführt. Der *Phosphor-Screen* wurde dann mit einem *Phosphor-Imager* gescannt und die Signale der Banden jeweils einer Spur mit der Software ImageQuant ausgewertet. Der Graph wurde mit GraphPad Prism erstellt.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es durch Beobachtung der Ubiquitylierung und des proteasomalen Abbaus von HIF-1 α und HIF-2 α , mehr über die Rolle der Interaktion des Cullin2^{VBC}-Komplexes mit Ubx7 und p97 zu erfahren. Die CRL-Substrate HIF-1 α und HIF-2 α bilden nicht nur einen wichtigen O₂-Sensor und modulieren die Hypoxieantwort der Zelle, sondern spielen über mehrere hundert Zielgene und vielfache Funktionen eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen. Durch die Regulation einer großen Anzahl an Substraten, unter anderem Tumorsuppressoren und Protoonkogenen, beeinflussen CRLs eine Vielzahl an Signalwegen. Aus diesen Gründen ist die Regulation der HIFs und CRLs, und somit eine mögliche Rolle der Interaktion der CRLs mit Ubx7 und p97, von großem wissenschaftlichen und klinischen Interesse.

Die Experimente dieser Arbeit lieferten drei wichtige Beobachtungen: Während Ubx7 den Abbau und die Ubiquitylierung von HIF-1 α zu inhibieren scheint (1), ist der HIF-Turnover weitgehend unabhängig von der Cullin-Neddylierung (2). Außerdem konnte das HIF-1 α -Abbauprodukt HDP-80 identifiziert werden (3). Diese Beobachtungen machen weiterführende Experimente notwendig, um Mechanismen und mögliche physiologische Konsequenzen dieser Beobachtungen besser zu verstehen.

4.1 Identifikation des HIF-1 α -Abbauprodukts HDP-80

Die Inhibierung des Proteasoms wurde in Experimenten dieser Arbeit genutzt, um ubiquityliertes HIF-1 α akkumulieren zu lassen, wobei in den *Western Blots* regelmäßig ein von verschiedenen HIF-1 α -Antikörpern spezifisch erkanntes und ca. 80 kDa großes Protein detektiert wurde (Abb. 3.2A). Da dieses Protein speziell bei Blockade des proteasomalen Abbaus akkumuliert und ein Spalt- oder Abbauprodukt von HIF-1 α darstellen könnte, wurde es HDP-80 (HIF-1 α -*Degradation-Product-of* 80 kDa) genannt. Weitere Fraktionierungs-, Transfektions- und *Pulldown*-Experimente bestätigten, dass es sich dabei um ein hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiertes, vermutlich im Bereich des N-Terminus von HIF-1 α gespaltenes, Abbauprodukt oder Zwischenprodukt von HIF-1 α handelt (Abb. 3.2B, C, D). Auch nach einer Hypoxie-imitierenden Stabilisation von HIF-1 α -wt-V5-His durch CoCl₂ konnte HDP-80 im *His-Pulldown* ohne zusätzliche

Inhibierung des Proteasoms angereichert werden (Abb. 3.2D, Spur 5). Dies spricht dafür, dass ein kleiner Teil von HIF-1 α auch unter physiologischen, hypoxischen Bedingungen gespalten werden könnte, so dass HDP-80 akkumuliert. Außerdem lässt sich aus dem *His-Pulldown*-Experiment schlussfolgern, dass HDP-80 ein Substrat des Proteasoms ist, da im Vergleich zur CoCl₂-Behandlung unter Inhibierung des Proteasoms mehr HDP-80 akkumuliert (Abb. 3.2D, Spuren 5+6). Es wäre denkbar, dass HIF-1 α durch einen spezifischen oder unspezifischen Mechanismus am N-Terminus gespalten wird, bevor es vom Proteasom abgebaut wird. Da HDP-80 gerade unter Hemmung des Proteasoms stabilisiert wird, scheint es eher unwahrscheinlich, dass es ein reines Zwischenprodukt des proteasomalen Abbaus ist. Auffallend ist, dass genau in jenem Bereich, in dem HIF-1 α gespalten würde, um ein 80 kDa großes, C-terminales Abbauprodukt zu produzieren, die PAS1-Domäne liegt, welche die Dimerisierung mit HIF-1 β vermittelt (Abb. 3.2E). Das Protein HDP-80 könnte deshalb vermutlich nicht mehr mit HIF-1 β interagieren und wäre somit transkriptionell inaktiv. Zusätzlich zu HDP-80 konnten im *His-Pulldown*-Experiment vier weitere, weniger häufige HDPs identifiziert werden, die jedoch endogen ohne Überexpression von HIF-1 α -wt-V5-His nicht detektiert werden konnten (Abb. 3.2D+E).

Zu einer möglichen Rolle dieses Spaltmechanismus von HIF-1 α und HDP-80 erscheinen drei Möglichkeiten plausibel: (1) Die Behandlung mit CoCl₂ und MG132 könnte Sekundäreffekte verursachen, die wiederum zur Aktivierung unspezifischer Proteasen führen könnten. Wie bereits berichtet wurde, induziert MG132 Apoptose in Tumorzellen, wodurch Caspasen aktiviert werden, die HIF-1 α womöglich unspezifisch spalten könnten (Guo und Peng, 2013). Auch Hypoxie und CoCl₂, wenn auch nur in hohen Konzentrationen, können über mehrere Signalwege Apoptose induzieren und somit Caspasen aktivieren (Stenger *et al.*, 2011). Würde HIF-1 α während Hypoxie-induzierter Apoptose in HDP-80 gespalten, wäre auch eine physiologische Rolle von HDP-80 beim kontrollierten Zelltod denkbar. (2) Die Spaltung von HIF-1 α könnte aber auch zu dessen Inaktivierung beitragen. Es wurde bereits beschrieben, dass durch Inhibierung des Proteasoms stabilisiertes Ub-HIF-1 α zwar an DNA gebunden sein kann, transkriptionell aber nicht aktiv ist (Yu und Kodadek, 2007). Es wäre denkbar, dass zusätzlich zur Ubiquitylierung eine Protease HIF-1 α an der DNA spaltet und somit schnellstmöglich inaktiviert, noch bevor das Proteasom rekrutiert wird. (3) Eine weitere Möglichkeit wäre, dass ein gewisser Teil stabilisiertes HIF-1 α in HDP-80 umgewandelt wird, welches dann eine von der Aktivierung der Transkription unabhängige Funktion ausführen könnte. Als transkriptions-unabhängige Funktionen von HIF-1 α wurden kürzlich die Inhibierung der DNA-Replikation und der Zellproliferation beschrieben (Huang, 2013).

4.2 Die Rolle von Ubx7 und p97 im HIF-1 α -Turnover bleibt weiterhin unklar

Bisher wurde die Interaktion von Ubx7 und p97 mit dem Cullin2^{VBC}-Komplex in vier Publikationen beschrieben. In 2008 wurde erstmals gezeigt, dass eine Vielzahl von *UBX-Domain*-Proteinen mit Cullin-RING-Ligasen interagieren. Speziell Ubx7 zeigte eine starke, aber von p97 unabhängige, Interaktion mit Cullin2^{VBC} und dessen Substrat HIF-1 α (Alexandru *et al.*, 2008). In 2012 wurde dann in zwei weiteren und voneinander unabhängigen Studien gezeigt, dass Ubx7 durch eine UIM-Domäne über Nedd8 an aktive CRLs bindet. Außerdem wurde beschrieben, dass in Hefen nicht funktionales Ubx5 (Hefenhomolog zu Ubx7) in Abhängigkeit von der UIM-Domäne den Abbau von Rpb1 verlangsamt (Verma *et al.*, 2011; Besten *et al.*, 2012) und dass die Überexpression von Ubx7 in humanen Zellen, ebenfalls abhängig von der UIM-Domäne, HIF-1 α akkumulieren lässt (Bandau *et al.*, 2012).

4.2.1 Inhibiert Ubx7 die Ubiquitylierung und den Abbau von HIF-1 α ?

Nach der Etablierung eines Zeitverlaufsassays zur Analyse des Abbaus von HIF-1 α und der Herstellung von shRNA-Zelllinien zum *Knockdown* von Ubx7 und p97 (Abb. 3.1) wurde zunächst die Ubiquitylierung und der Abbau von HIF-1 α untersucht. Das Fehlen von Ubx7 und p97 beschleunigte den Abbau von HIF-1 α in geringem Maße und veränderte den Ubiquitylierungs-Status von HIF-1 α (Abb. 3.3A). Auch in einem weiteren Experiment, bei dem der HIF-1 α -Abbau gezielt nach subzellulärer Lokalisation untersucht wurde, konnte diese Beobachtung bestätigt werden (Abb. 3.3B). Speziell die lösliche Kernfraktion zeigte ebenfalls einen schnelleren Abbau von HIF-1 α bei einem Mangel an Ubx7 und p97. HIF-1 α wird interessanterweise im Vergleich zum Zytoplasma im Kern erheblich langsamer abgebaut, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass es als Transkriptionsfaktor im Kern an die DNA bindet und von dort erst extrahiert werden muss. Während die Akzeleration des HIF-1 α -Abbaus unter *Knockdown* von Ubx7 zu einem in 2008 von Alexandru *et al.* vorgeschlagenen Modell passen würde, lässt sich eine Beschleunigung des HIF-1 α -Abbaus unter p97-*Knockdown* damit nicht vereinbaren. Nach dem Modell von Alexandru *et al.* bindet Ubx7 das jeweilige Substrat über die Ubiquitin-Ketten und verhindert in diesem Moment dessen Abbau, um zunächst p97 als *Proteasome*-

Targeting-Factor zu rekrutieren. Bei Fehlen von p97, als prozessierenden Faktor, würde somit der Abbau des Substrats erheblich beeinträchtigt sein. In Abwesenheit von Ubx7 könnten jedoch andere Faktoren dazu führen, dass das Substrat im Vergleich schneller abgebaut würde. Zusätzlich müsste man die Funktion eines Ubx7-p97-Komplexes beim Abbau von HIF-1 α von der Funktion von p97 im ERAD-System abgrenzen. Bei Substraten des ERAD ist gewöhnlich ein von p97 vermittelter Retro-Translokationschritt aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma nötig um den Abbau zu vermitteln. So zeigten Studien in Hefen, dass ein Verlust des dazu notwendigen p97-Adapters Ubx2 ebenfalls zur Stabilisierung der jeweiligen Substrate führt. Im Falle von HIF-1 α , das ein lösliches Substrat darstellt, wäre aber ein solcher Schritt nicht notwendig (Alexandru *et al.*, 2008). Das zu diesem Modell führende Ergebnis war, dass unter *Knockdown* von Ubx7 weniger und unter *Knockdown* von p97 mehr HIF-1 α akkumuliert. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche Inhibierung des Proteasoms multipliziert und konnte auch in dieser Arbeit reproduziert werden (Abb. 3.4A). Dem Modell zufolge müsste HIF-1 α im *Turnover-Assay* unter *Knockdown* von Ubx7 schneller und unter *Knockdown* von p97 wesentlich langsamer abgebaut werden. Dennoch zeigen zwei unabhängige Ergebnisse (Abb. 3.3A und 3.3B), dass der *Knockdown* von p97 in etwa gleichem Maße wie der *Knockdown* von Ubx7 den Abbau von HIF-1 α paradoxer Weise geringfügig beschleunigt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass in der Zelle ein erheblicher Unterschied zwischen der Menge an p97 und der Menge an HIF-1 α besteht. Das Protein p97 zählt zu den häufigsten Proteinen der Zelle (Peters *et al.*, 1990), während HIF-1 α bei weitem weniger häufig ist. Trotz eines durchaus potenten *Knockdowns* von p97, könnte eine zwar kleine aber ausreichend funktionelle Restmenge von p97 vorliegen und so die Funktion im HIF-1 α -*Turnover* ausführen. Hierbei wäre aber zu erwarten, dass die Beschleunigung des HIF-1 α -Abbaus ausbleibt. Falls jedoch, eine durch den *Knockdown* extrem reduzierte Menge von p97 auch zu einer Veränderung der Menge an freien UBX-Adapterproteinen wie Ubx7 führt, könnte diese Situation einen Mangel an Ubx7 vortäuschen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter p97-*Knockdown*, sind die Ergebnisse unter Ubx7-*Knockdown* mit dem bisherigen Modell vereinbar, wobei HIF-1 α ohne Ubx7 durch die fehlende Prozessierung über p97 schneller abgebaut werden könnte. Kürzlich wurde auch beschrieben, dass eine Überexpression von Ubx7 zur vermehrten Akkumulation von HIF-1 α führt (Bandau *et al.*, 2012), wobei nach bisheriger Theorie ein Überschuss an Ubx7 vermehrt Komplexe aus HIF-1 α und Cullin2^{VBC} binden könnte und somit den Abbau oder die Ubiquitylierung verzögert. In einem *in vitro*-Ubiquitylierungsassay mit einem HIF-1 α -Peptid konnte gezeigt werden,

dass rekombinantes Ubxd7 die HIF-1 α -Peptid-Ubiquitylierung um mehr als 50 % inhibiert, unabhängig davon, ob der Cullin2^{VBC}-Komplex neddyliert oder deneddyliert war (Abb. 3.6). Geht man davon aus, dass Ubxd7 über seine UIM-Domäne nur die neddylierte Form der CRLs bindet (Besten *et al.*, 2012), erscheint dies zunächst paradox. Jedoch wurde unabhängig davon ebenfalls *in vitro* gezeigt, dass Ubxd7 mit fehlender UIM-Domäne ebenfalls Cullin1 bindet, hierbei unabhängig davon ob es neddyliert oder deneddyliert vorliegt (Bandau *et al.*, 2012). Vermutlich ist die Ubxd7-CRL-Interaktion nicht allein über die UIM-Domäne und Nedd8 vermittelt, sondern durch einen mehr verzahnten und breiten Kontakt der beiden Proteine. Der Kontakt über UIM-Nedd8 könnte dazu dienen, die Affinität und die Spezifität zu erhöhen.

Unabhängig davon dürfen bei der Beurteilung dieses Experiments einige experimentelle Details nicht außer Acht gelassen werden. Die Effektivität der Ubiquitylierungsreaktion mit maximal etwa 26 % (neddyliertes Cullin2, ohne Ubxd7) ist eher gering. Bei nicht neddyliertem Cullin2 ist die Effektivität gar nur 4 % ohne Ubxd7. So scheint es, dass die Ubiquitylierungsreaktion allgemein, auch ohne Ubxd7, nicht effizient und langsam abläuft. Dies kann vor allem daran liegen, dass zum einen die Neddylierungs-Enzyme in den Reaktionsansätzen belassen wurden und zum anderen eine sehr niedrige Konzentration von Ub-E2 Cdc34 verwendet wurde. Wie bereits beschrieben, könnte Nedd8-E2 Ubc12 über Rbx1 ebenfalls an Cullin2 binden und somit mit Ubiquitin-E2 Cdc34 konkurrieren (Calabrese *et al.*, 2011). Da Ubc12 auch in höherer Konzentration im Reaktionsansatz vorliegt als Cdc34 könnte dies ein Grund für die geringe Effektivität der Reaktion sein. Würde also Ubc12 die Ubiquitylierungsreaktion schon kompetitiv hemmen, könnte dies einen eventuell größeren Effekt von Ubxd7 maskieren. Die Ergebnisse dieses ersten Pilot-Experiments können nur mit Vorsicht interpretiert werden, wobei sie dennoch auf eine CRL-inhibierende Funktion von Ubxd7 hindeuten. Dieser Assay erfordert noch weitere experimentelle Verbesserungen, um zu eindeutigen Ergebnissen zu führen.

Zusammen mit den bereits publizierten Ergebnissen deuten auch die Ergebnisse aus dem HIF-1 α -Turnover-Assay unter *Knockdown* von Ubxd7 und dem *in vitro*-Ubiquitylierungsassay zumindest auf eine inhibierende Funktion von Ubxd7 bei der Ubiquitylierung und dem Abbau von HIF-1 α hin.

4.2.2 Ubx7 und p97 beeinflussen den Ubiquitylierungsstatus von HIF-1 α

Bereits durch Alexandru et al. wurde beschrieben, dass unter *Knockdown* von p97 nicht nur mehr, sondern auch höhermolekulare, ubiquitylierte HIF-1 α -Spezies akkumulieren, was zusätzlich zu erhöhten Proteinkonzentrationen des HIF-1 α -Zielgens CA IX führt (Alexandru et al., 2008). Bei Fehlen von p97 akkumulierten im HIF-1 α -Turnover-Assay unter zusätzlicher Inhibierung des Proteasoms ebenso höhermolekulare Ub-HIF-1 α -Spezies (> 250 kDa), was bei Fehlen von Ubx7 nur in geringerem Maße zu sehen war (Abb. 3.3A). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass über die Interaktion mit p97 bestimmte Deubiquitylierungs-Enzyme (DUBs) rekrutiert werden, welche den Ubiquitylierungsstatus von CRL-Substraten verändern. Wäre diese Rekrutierung von DUBs über p97 allein von Ubx7 abhängig, würde man jedoch auch bei *Knockdown* von Ubx7 einen ähnlichen Effekt als bei *Knockdown* von p97 erwarten. Da der Effekt auf den Ubiquitylierungsstatus von Ub-HIF-1 α bei Mangel an Ubx7 jedoch geringer ist, könnte dieser Prozess beispielsweise von weiteren Cofaktoren abhängen. Für den ERAD-Pathway konnte bereits gezeigt werden, dass p97 mit mindestens zwei DUBs assoziiert ist, und so den Ubiquitylierungsstatus von Substraten verändern kann. Außerdem wurde in einem Interaktions-Screen gezeigt, dass mindestens drei weitere DUBs mit p97 interagieren (Liu und Ye, 2012). So könnte durch DUBs, die über Ubx7, p97 und weitere Cofaktoren zum Cullin2^{VBC}-Komplex rekrutiert werden, die Länge der HIF-1 α -Ubiquitinkette verkürzt werden, um optimale Erkennung und Abbau durch das Proteasom zu vermitteln oder um einen zu schnellen Abbau zu verhindern.

Des Weiteren wurde der Abbau von Ub-HIF-1 α , welches durch Inhibierung des Proteasoms stabilisiert wurde, durch einen Mangel an p97 wesentlich verlangsamt (Abb. 3.3D). Diese Beobachtung passt zu dem von Alexandru et al. bereits vorgeschlagenen Modell, dass p97 einen *Proteasome-Targeting-Factor* für HIF-1 α darstellen könnte und für einen Prozessierungsschritt zwischen Ubiquitylierung und proteasomalem Abbau verantwortlich ist. Außerdem konnte hierbei gezeigt werden, dass der schnelle Abbau dieser Ub-HIF-1 α -Spezies vollständig vom Proteasom abhängt. Nach zusätzlicher Inhibierung des Proteasoms während der Cycloheximid-Behandlung, konnte Ub-HIF-1 α über einen Zeitraum von 120 min nicht abgebaut werden (Abb. 3.3D).

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die zu höhermolekularen Ub-HIF-1 α -Spezies führenden Effekte des p97-*Knockdowns*, in reinen Akkumulations-

experimenten bei zusätzlicher Inhibierung der CRL-Neddylierung durch MLN4924 nicht mehr zu beobachten waren (Abb. 3.4A). Der zur vermehrten Akkumulation von ubiquitylierten Proteinen führende Effekt eines Mangels an p97 war unter MLN4924-Behandlung ebenfalls aufgehoben (Abb. 3.4A). Dies könnte zunächst ein Hinweis darauf sein, dass der p97-Effekt von der Neddylierung der CRLs abhängt. Kürzlich wurde beschrieben, dass Ubx7 als p97-Adapter vornehmlich neddylierte CRLs bindet und so vermutlich p97 an den CRL-Komplex rekrutieren kann (Bandau *et al.*, 2012; Besten *et al.*, 2012). Im Falle von nicht neddylierten CRLs wäre diese Interaktion um ein Vielfaches geringer und somit die Rekrutierung von p97 nicht möglich. In diesem Fall könnten CRL-Substrate durch sekundäre Abbauege ubiquityliert und abgebaut werden. Diese Situation käme in Theorie dem Ergebnis nahe bei dem unter Ubx7-*Knockdown* weniger Ub-HIF-1 α akkumuliert (Abb. 3.4A, Spuren 4-6), nur dass unter Inhibierung der Neddylierung auch im Falle des p97-*Knockdowns* kein Ubx7 an die CRLs rekrutiert werden kann, und somit den HIF-1 α -Abbau nicht behindert (Abb. 3.4A, Spuren 10-12). Wie bereits vorgeschlagen, könnten hierbei sekundäre Abbauege zum *Turnover* von CRL-Substraten führen.

Im Zeitverlaufsassay war dieser Effekt jedoch nicht zu beobachten, da durch MLN4924 stabilisiertes HIF-1 α - also in einer Situation in der CRLs deneddyliert vorliegen - auch bei Mangel an p97 in höhermolekularen Spezies > 250 kDa vorlag (Abb. 3.3C, Spuren 13-18). Stattdessen war im Zeitverlaufsexperiment der zuvor nur sehr geringfügige Effekt eines Mangels an Ubx7 auf den Ubiquitylierungsstatus von HIF-1 α (Abb. 3.3A, Spuren 7-12) unter zusätzlicher Behandlung mit MLN4924 ausgeprägter als der Effekt des p97-*Knockdowns* (Abb. 3.3C). Zu diesem Zeitpunkt fällt es schwer diese Diskrepanz der Ergebnisse aus dem Akkumulierungs- und Zeitverlaufsexperiment zu interpretieren. Vermutlich sind die Interaktionen von p97 und CRLs weitaus komplexer und hängen neben Ubx7 auch von weiteren Cofaktoren ab. Ebenfalls ist zu berücksichtigen, dass sich beide Experimente (Abb. 3.3C und 3.4A) wesentlich in der Art der Stabilisierung der jeweiligen *Pools* von HIF-1 α unterscheiden und deshalb nicht direkt miteinander zu vergleichen sind. Zumindest jedoch scheinen die Effekte von Ubx7 und p97 auf den Ubiquitylierungsstatus von HIF-1 α in gewisser Weise von der CRL-Neddylierung abhängig zu sein, da sich bei Blockade der CRL-Neddylierung durch MLN4924 Veränderungen – wenn auch nicht vollständig erklärbar - beobachten ließen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten also das von Alexandru *et al.* postulierte Modell in zwei Punkten bestätigen: (1) Ein Mangel an Ubx7 führt zu schnellerem Abbau von HIF-1 α und zu geringer Akkumulation von Ub-HIF-1 α . (2) Ein Mangel an p97 lässt höhermolekulare Ub-HIF-1 α -Spezies akkumulieren und verlangsamt den Abbau von

Ub-HIF-1 α . Diesem Modell kann unter Vorbehalt ein dritter Punkt hinzugefügt werden: (3) Die Effekte des *Knockdowns* von Ubx α 7 und p97 auf den Ubiquitylierungsstatus von HIF-1 α zeigen Veränderungen in Abhängigkeit von der CRL-Neddylierung.

4.3 Der HIF-Turnover ist großteils unabhängig von der Cullin-Neddylierung

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass der Sauerstoff- und Cullin²^{VBC}-abhängige Weg den Hauptabbauweg für die durch Hypoxie induzierbaren Faktoren darstellt. Daher ging man ebenfalls davon aus, dass der HIF-Turnover von der Aktivität und somit vom Neddylierungsstatus der CRLs abhängt. Wie sich in mehreren unabhängigen Studien (beschrieben unter 4.3.3) herausstellte, bestehen aber auch mehrere Sauerstoff- und CRL-unabhängige Abbaumöglichkeiten für HIFs. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Turnover von HIF-1 α und auch von HIF-2 α zum großen Teil nicht von der Cullin-Neddylierung abhängt. Diese Beobachtung führt zu der entscheidenden Frage, ob ein großer Teil von HIF-1/2 α durch alternative Wege abgebaut werden kann oder ob CRLs auch im deneddylierten Zustand bestimmte Substrate ubiquitylieren können.

4.3.1 Die Ubiquitylierung und der Abbau von HIF-1 α sind großteils unabhängig von der CRL-Neddylierung

Experimente, in denen der Abbau von durch MLN4924 stabilisiertem HIF-1 α untersucht wurde, zeigten überraschenderweise einen normal erscheinenden, nicht verlangsamten Turnover, obwohl die CRLs in dieser Situation im deneddylierten Zustand vorlagen (Abb. 3.3C & 3.4B). Ein mit CoCl₂ stabilisierter Pool von HIF-1 α wird in Zellen mit komplett deneddylierten CRLs (MLN4924 Behandlung während der Cycloheximid-Behandlung) nur geringfügig langsamer abgebaut als in Zellen in denen die CRLs im normalen, neddylierten und deneddylierten Zustand vorliegen (Abb. 3.4C). Aus Ergebnissen von *in vitro* Ubiquitylierungs-Reaktionen ist bekannt, dass neddylierte CRLs das Substrat um ein vielfaches schneller ubiquitylieren, als nicht-neddylierte CRLs. Jedoch ist die Konjugation mit Nedd8 für die Ubiquitylierungsreaktion *in vitro* nicht obligat (Saha und Deshaies, 2008). Bisher liegen jedoch keine Daten vor, welche diesen Sachverhalt *in vivo* bestätigen würden, und somit wird bis heute angenommen,

dass nur neddylierte CRLs auch aktiv sind. In Studien zum NAE-Inhibitor MLN4924 konnte zwar gezeigt werden, dass durch Deneddylierung von CRLs deren Substrate akkumulieren, wobei jedoch der *Turnover* von Substraten unter den Bedingungen neddylierte versus nicht-neddylierte CRLs nicht untersucht wurde (Soucy *et al.*, 2009). Es wäre also zunächst denkbar, dass HIF-1 α im Falle einer Blockierung der Neddylierung der CRLs durch MLN4924, auch *in vivo* von diesen ubiquityliert wird. Auch andere CRL-Substrate wie Nrf2 und p27 zeigten in *Turnover*-Assays eine unterschiedliche Abhängigkeit vom CRL-Neddylierungsstatus. Während Nrf2, ein Cullin1/3 Substrat, unter komplett deneddylierten CRLs nur langsamer abgebaut wurde, blieb p27 als Cullin1/4 Substrat völlig stabil (Abb. 3.4D). Der *Turnover* von p53, einem CRL-unabhängigen Proteasom-Substrat, wurde wie erwartet von der MLN4924 Behandlung nicht beeinflusst. Der CDK-Inhibitor p27 ist mit einer Größe von etwa 27 kDa ein eher kleines Protein (Lu und Hunter, 2010), während Nrf2 als Transkriptionsfaktor mit etwa 110 kDa wesentlich größer ist (Wakabayashi *et al.*, 2010). Zusammen mit den Beobachtungen zum Abbauprozess von HIF-1 α , wäre denkbar, dass große Substrate wie Nrf2 und HIF-1 α auch durch CRLs ubiquityliert werden können wenn diese deneddyliert vorliegen, während die Ubiquitylierung kleiner Substrate wie p27 mehr von der CRL-Neddylierung abhängt. Da die Neddylierung eine CRL-Konformationsänderung bewirkt, die Substrat und Ub-E2 näher zusammenbringt, könnte es durchaus möglich sein, dass dies für relativ große Substrate nicht oder weniger nötig ist. Je nach Exposition der Lysin-Reste am jeweiligen Substrat wären dann wiederum Unterschiede in Ubiquitylierungseffektivität und Abbaugeschwindigkeit zu erwarten. Im Moment bleiben diese Überlegungen nur spekulativ, da bei diesen Zellkultur-basierten *Turnover*-Assays angenommen werden muss, dass unter MLN4924-Behandlung und somit unter Inhibierung der CRLs für bestimmte Substrate zusätzliche Abbauewege greifen. In den letzten Jahren wurden für HIF-1 α mehrere, Sauerstoff- und CRL-unabhängige Abbauewege beschrieben (im Detail diskutiert unter 4.3.3), weshalb davon auszugehen ist, dass der HIF-*Turnover* in diesen Experimenten nicht vollständig von CRLs abhängt. Auch der Abbau von p27 steht unter dem Einfluss vieler verschiedener Faktoren wie zum Beispiel Zellzyklusphase oder intrazellulärer Lokalisation des Proteins, wobei auch hier mehrere Abbauewege bekannt sind (Lu und Hunter, 2010).

4.3.2 Der Abbau von HIF-2 α ist unabhängig von Cullin-Neddylierung, Ubx7 und p97

Im Gegensatz zum vielfältigen HIF-1 α -Turnover, ging man beim HIF-2 α -Turnover davon aus, dass er hauptsächlich über CRL^{VBC} vermittelt wird. Bisher wurde nur ein zusätzlicher, CRL-unabhängiger Mechanismus beschrieben, der HIF-2 α Proteasom-abhängig abbauen kann. Der Tumorsuppressor Int6, eine Untereinheit des Elongations-Initiations-Faktors eIF3, kann HIF-2 α binden und seinen Abbau durch das Proteasom vermitteln (Chen *et al.*, 2007). Allerdings ist der Mechanismus, durch den Int6 die Konzentration von HIF-2 α beeinflusst, noch unbekannt. Außerdem lässt sich noch keine Aussage darüber treffen, in welchem Maße die beiden Abbauwege HIF-2 α im Vergleich regulieren. Da der CRL^{VBC}-Weg länger bekannt und besser verstanden ist, galt er bisher als Hauptabbauweg für HIF-2 α .

Um zu untersuchen, ob der Abbau von HIF-2 α - im Unterschied zu HIF-1 α - mehr von der Cullin-Neddylierung abhängt und deshalb eventuell besser geeignet wäre die CRL-Ubx7-p97-Interaktion zu untersuchen, wurden die Zeitverlaufsstudien für HIF-2 α wiederholt. Ein System aus 786-0-Zellen, welche nur HIF-2 α und entweder kein VHL oder stabil transfiziertes VHL exprimieren, diente hierbei als Modell, um den Abbau eines CRL-Substrats mit Abhängigkeit vom jeweiligen Substratrezeptor zu beobachten. Ohne den Substratrezeptor VHL waren die HIF-2 α -Levels stabil und reagierten nicht auf die Behandlung mit CoCl₂ oder MLN4924 (Abb. 3.5A). Der durch Fehlen des CRL-Substratrezeptors VHL stabilisierte Pool von HIF-2 α konnte während der Cycloheximid-Behandlung nur sehr verlangsamt abgebaut werden. Dies deutet zunächst darauf hin, dass in diesen Zellen der Großteil des Abbaus von HIF-2 α vom Substratrezeptor VHL abhängig ist. Die Expression von VHL-wt vermittelte den Abbau von HIF-2 α (Abb. 3.5A, Spuren 1 und 6), und HIF-2 α konnte nun sowohl durch CoCl₂ als auch MLN4924 stabilisiert werden (Spuren 2-5 und 7-10). Überraschender Weise konnte HIF-2 α dennoch in beiden Fällen mit etwa gleicher Geschwindigkeit, und somit unabhängig vom Cullin2-Neddylierungsstatus abgebaut werden. Auch das Protein Nrf2 konnte, wie schon in Experiment 3.4, durch eine Behandlung mit MLN4924 stabilisiert werden, und wurde im Zeitverlauf sowohl unabhängig vom Cullin-Neddylierungsstatus, als auch unabhängig vom Vorhandensein des Substratrezeptors VHL abgebaut (Abb. 3.5A, Spuren 7-10).

Dadurch dass der Abbau von HIF-2 α in diesen Zellen hauptsächlich von VHL abhängt, wäre nach bisheriger Theorie davon auszugehen, dass der HIF-2 α -Turnover zu großen Teilen vom Cullin2^{VBC}-Komplex vermittelt wird und somit von dessen Aktivität

beziehungsweise dessen Neddylierung abhängt. Das Ergebnis zeigt jedoch deutlich, dass der *Turnover* von HIF-2 α nicht vom Neddylierungsstatus des Cullin2^{VBC}-Komplexes abhängt. Wie bereits unter 4.3.2 für HIF-1 α diskutiert, stellt sich auch hier die Frage, ob der deneddylierte Cullin2^{VBC}-Komplex widererwarten in der Lage ist HIF-2 α zu ubiquitylieren, oder ob unter diesen Bedingungen ein anderer Abbauweg, in diesem Fall eventuell vermittelt durch Int6, greift. Wäre der Cullin2^{VBC}-Komplex im deneddylierten Zustand weiterhin in der Lage HIFs zu ubiquitylieren, erscheint es jedoch paradox, dass die Behandlung mit MLN4924 und somit die Inaktivierung der CRLs HIFs akkumulieren lässt. Eine Erklärung dafür wäre, dass in Anwesenheit von VHL die Behandlung mit MLN4924 die Cullin2^{VBC}-Komplexe zwar deneddyliert aber nicht vollkommen inaktiviert. Da der HIF-*Turnover* in Normoxie sehr schnell ist und auch relativ viel HIF neu synthetisiert wird, könnte dies dazu führen, dass deneddylierte Cullin2^{VBC}-Komplexe nun langsamer ubiquitylieren und somit HIF-2 α akkumuliert. In diesem Fall wären die Cullin2^{VBC}-Komplexe, nach Blockade der Proteinneusynthese durch Cycloheximid, noch fähig den *Pool* von HIF-2 α zu ubiquitylieren und dem proteasomalen Abbau zuzuführen. Hierbei wäre jedoch zu erwarten, dass im Vergleich zu einem durch CoCl₂ stabilisierten *Pool* von HIF-2 α , der durch MLN4924 stabilisierte *Pool* infolge der langsameren Ubiquitylierung auch verlangsamt abgebaut wird. Es könnte jedoch sein, dass durch das Auswaschen mit PBS CoCl₂ nicht komplett aus den Zellen entfernt wird. Somit könnte verbleibendes CoCl₂ ebenfalls den Abbau von HIF-2 α verzögern. Direkt zu vergleichen sind diese beiden Experimente mit einem CoCl₂ und MLN4924 stabilisierten HIF-2 α -*Pool* jedoch nicht, da Nebeneffekte durch die unterschiedlichen Inhibitoren nicht ausgeschlossen werden können.

Auch die weitere Möglichkeit, dass Int6 und oder ein anderer, alternativer *Pathway* in diesem Experiment zum Abbau von HIF-2 α beitragen, muss in Erwägung gezogen werden. Das Fehlen von VHL lässt in diesen Experimenten zwar HIF-2 α akkumulieren, jedoch kann der stabilisierte *Pool* trotzdem abgebaut werden, wenn auch erheblich verlangsamt (Abb. 3.5A, Spuren 3-5 und 8-10). Wie bereits erwähnt, wurde von Chen et al. beschrieben, dass Int6 unabhängig von VHL den Abbau von HIF-2 α vermitteln kann. Wenn auch bisher nur für HIF-1 α beschrieben (Hubbi et al., 2013), wäre es auch für HIF-2 α denkbar, dass ein Teil über einen lysosomalen Weg abgebaut wird. Zusammengefasst mit den Ergebnissen für HIF-1 α und unter Berücksichtigung der neuesten Erkenntnisse, scheint es wahrscheinlich, dass auch HIF-2 α zusätzlich von alternativen, CRL-unabhängigen *Pathways* abgebaut werden kann.

Zusätzlich deuten diese Beobachtungen auch darauf hin, dass die Rolle der Nedd8-vermittelten Ubx7-p97-CRL-Interaktion mit HIFs nicht optimal untersucht werden

kann, da der Abbau von HIFs unabhängig von der CRL-Neddylierung geschehen kann. Bei einer Wiederholung der bereits diskutierten *Turnover-Assays* unter *Knockdown* von Ubx7 und p97 konnten keine Differenzen im Abbau von HIF-2 α beobachtet werden (Abb. 3.5B).

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Experimente lassen sich in zwei Punkten zusammenfassen: (1) Der Abbau der HIFs ist zum großen Teil nicht abhängig von der CRL-Neddylierung. (2) Die Inhibierung der Cullin-Neddylierung beeinflusst die Stabilität und den Abbau verschiedener Substrate in unterschiedlicher Weise. Der NAE-Inhibitor MLN4924 hatte deutlich unterschiedliche Effekte auf den *Turnover* der CRL-Substrate HIF, Nrf2 und p27. Da MLN4924 bereits als Krebsmedikament in klinischen Studien eingesetzt wird, wird es weiterhin von großem Interesse sein einerseits seine Wirkung so detailliert wie möglich und andererseits sein pharmakologisches Ziel, die CRLs und deren Regulation, genauer zu verstehen.

4.3.3 HIFs sind nicht als Cullin2-Modellsubstrate geeignet

In einem *Turnover-Assay* für HIFs wären die Folgen eines *Knockdowns* von Ubx7 und p97 nur optimal zu beobachten, wenn Ubiquitylierung und Abbau der HIFs größtenteils vom Cullin2^{VBC}-Komplex, oder zumindest von aktiven, neddylierten CRLs abhängen würden. Nach bisherigem Kenntnisstand interagiert Ubx7 am stärksten mit neddylierten CRLs und Effekte eines Mangels an Ubx7 und p97 auf den HIF-1 α -Ubiquitylierungsstatus sind unter Inhibierung der Neddylierung aufgehoben.

In den letzten Jahren wurden zusätzlich zu dem bisher am besten studierten und als Standard angesehenen, Sauerstoff- und Cullin2^{VBC}-abhängigen Abbauweg der HIFs, auch andere HIF-Abbaumechanismen beschrieben. Anstatt dem üblichen Substratrezeptor VHL könnte eventuell das Protein RACK1 HIF-1 α binden und weder O₂- noch VHL-abhängig zu dessen Ubiquitylierung und Abbau führen (Liu *et al.*, 2007). Des weiteren wurde berichtet, dass HIF-1 α auch durch den Cullin1^{Fbw7}-Komplex (Flügel *et al.*, 2012) und eine neue, atypische E3-Ligase HIF assoziierter Faktor (HAF) ubiquityliert werden kann (Koh und Powis, 2009). Während HAF zum Abbau von HIF-1 α führt, bindet und transaktiviert es auch HIF-2 α , womit die Hypoxieantwort in diesem Fall mehr von HIF-2 α vermittelt wird (Koh *et al.*, 2011). Kürzlich wurde zudem ein lysosomaler Abbauweg beschrieben, bei dem HIF-1 α über Chaperon-vermittelte Autophagie abgebaut wird (Hubbi *et al.*, 2013). Wie bereits erwähnt, wurde auch für HIF-2 α ein CRL-unabhängiger Abbauweg, vermittelt durch Int6, entdeckt (Chen *et al.*, 2007). Außerdem hat sich die Meinung über HIF-1 α als typischen Transkriptionsfaktor

entscheidend geändert, und es wurden neben den transkriptionellen Effekten auch nicht-transkriptionelle Mechanismen beschrieben durch welche HIF-1 α unter Hypoxie die DNA-Replikation und die Zellproliferation inhibiert (Huang, 2013).

Diesen Ergebnissen zufolge stellt sich die Regulation der HIFs wesentlich komplizierter dar als bisher angenommen. Die meisten der neu beschriebenen Abbaumechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt und beziehen sich allein auf HIF-1 α . Im Moment kann auch noch keine quantitative Aussage darüber getroffen werden, welcher Anteil von HIF-1 α durch welchen Mechanismus abgebaut wird. Auffällig ist jedoch, dass ein Großteil der Beobachtungen auf ein CRL-abhängiges System zurückgeht. Sollte sich herausstellen, dass ein erheblicher Anteil der HIFs dennoch durch einen CRL-unabhängigen Abbauweg verstoffwechselt wird, wären HIFs in einem *in vivo* Experiment nicht optimal als Substrate geeignet, um den Hintergrund der Ubxd7/p97-Cullin2-Interaktion zu untersuchen. Dies gilt auch, wenn HIFs unabhängig von der Cullin-Neddylierung abgebaut würden, da die Bindung von Ubxd7 über das an die CRL gebundene Nedd8 vermittelt wird.

Die Zeitverlaufsexperimente für HIF-1 α und HIF-2 α in dieser Arbeit liefern einen deutlichen Hinweis dafür, dass der Abbau eines großen Teils der HIFs nicht von der CRL-Neddylierung abhängt (Abb. 3.4 + 3.5). Die HIFs wurden überraschenderweise unter Inhibierung der NAE mit MLN4924, und somit bei kompletter Deneddylierung der CRLs, ebenso schnell abgebaut wie im Falle von neddylierten CRLs. Daraus lässt sich folgern, dass HIFs nicht als Cullin2-Modellsubstrate geeignet sind, um die CRL-Ubxd7-p97-Interaktion zu untersuchen.

Die entscheidende Frage, ob HIFs im Falle von deneddylierten CRLs vermehrt durch alternative Pathways abgebaut werden oder ob auch deneddylierte CRLs für bestimmte Substrate aktiv sind, kann jedoch noch nicht beantwortet werden. Einzig die Ergebnisse aus dem Experiment mit HIF-2 α (Abb. 3.5A) weisen darauf hin, dass der Großteil von HIF-2 α abhängig von VHL und damit vermutlich abhängig von CRLs abgebaut wird, was dafür sprechen könnte, dass der Cullin2^{VBC}-Komplex HIF-2 α auch im deneddylierten Zustand ubiquitylieren kann.

4.4 Ausblick

4.4.1 Wird HDP-80 spezifisch gespalten, und besitzt es eine eigene Funktion?

Die bisherigen Beobachtungen zu HDP-80 beschränken sich darauf, dass es besonders unter Inhibition des Proteasoms akkumuliert und ein zytosolisches, vermutlich am N-Terminus gespaltenes, Abbauprodukt von HIF-1 α darstellt. Dies lässt hinsichtlich des Spaltmechanismus, der genauen Aminosäuresequenz oder auch einer möglichen physiologischen Rolle von HDP-80 noch viele Fragen offen.

Zunächst wäre zu klären, ob die Behandlung mit MG132 und CoCl₂ eventuell über die Induktion von Apoptose Caspasen aktiviert, die HIF-1 α spalten könnten. Hierzu könnte man in einem ersten Experiment durch MG132 Ub-HIF-1 α akkumulieren lassen und die Zellen zusätzlich mit einem Caspase-Inhibitor behandeln. Würde hierbei weniger HDP-80 akkumulieren, könnte dies ein Hinweis auf einen Caspase-vermittelten Spaltmechanismus sein. Wäre dies der Fall, könnten weiterführende Experimente Hinweise auf eine mögliche Rolle von HDP-80 bei der Apoptose geben.

Ein weiterer Schritt wäre die Identifikation der genauen Aminosäuresequenz von HDP-80. Die Kenntnis der Peptidbindung, dessen Spaltung zu HDP-80 führt, könnte zum einen die Suche nach einer Protease erheblich eingrenzen, zum anderen könnte man daraufhin einen Plasmid-Vektor klonieren, um Transfektionsexperimente durchzuführen. Hierbei könnten zum Beispiel Fragen nach den Folgen einer Überexpression von HDP-80 oder nach potentiellen Interaktionspartnern, zum Beispiel auch HIF-1 β , geklärt werden.

4.4.2 Inhibiert Ubxd7 die Funktion von CRLs?

Wie sich in den Experimenten dieser Arbeit herausstellte, sind HIFs nicht als CRL-Modellsubstrat geeignet, um die Rolle der Interaktion von Ubxd7 und p97 mit CRLs zu untersuchen. Dennoch gaben die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse Hinweise darauf, dass Ubxd7 die Funktion von CRLs inhibiert. Um diese Zusammenhänge besser greifbar zu machen, wird es in Zukunft einerseits von großer Bedeutung sein, weitere Cullin-Substrate - insbesondere Cullin2 Substrate - zu identifizieren und andererseits *in vitro*-Ubiquitylierungsassays zu optimieren. Um Rückschlüsse auf eine Funktion von Ubxd7 für CRLs zu ziehen, müsste der *Turnover* eines Substrats zumindest größtenteils von CRLs abhängen. Um mögliche Nebeneffekte zu vermeiden und die Experimente so

physiologisch wie möglich zu gestalten, könnte man die *Turnover*-Versuche mit durch Hypoxie stabilisierten *Pools* von HIFs wiederholen. Generell ist über die physiologische Rolle von Ubx^{d7} noch sehr wenig bekannt. Wie bereits erwähnt, konnte einzig für das Hefe-Homolog Ubx⁵ gezeigt werden, dass es den *Turnover* von Rpb1 beeinflusst (Verma *et al.*, 2011). Um auch diese Frage zu klären, könnten in einem anderen Modellorganismus wie dem Zebrafisch mit einem *Knockout*-Modell weitere Erkenntnisse gewonnen werden.

4.4.3 Sind deneddylierte CRLs *in vivo* in der Lage Substrate zu ubiquitylieren?

Aus *in vitro* Experimenten ist bekannt, dass die Neddylierung von CRLs eine Konformationsänderung verursacht, die die Distanz zwischen Substrat und E2 verringert und somit die Ubiquitylierung um das 6-8fache beschleunigt (Duda *et al.*, 2008; Saha und Deshaies, 2008). Basierend auf diesen Erkenntnissen und darauf, dass die Inhibierung der Neddylierung durch MLN4924 CRL-Substrate akkumulieren lässt (Soucy *et al.*, 2009), wird davon ausgegangen, dass CRLs *in vivo* hauptsächlich im neddylierten Zustand aktiv sind. Auch wenn im Moment vieles darauf hinweist, dass für CRL-Substrate wie HIF alternative Abbauwege existieren und deshalb deren Abbau nicht von der Cullin-Neddylierung abhängen könnte, besteht dennoch die Möglichkeit, dass auch deneddylierte CRLs *in vivo* bestimmte Substrate effizient ubiquitylieren können. Die Beobachtung, dass MLN4924 den Abbau verschiedener Substrate in unterschiedlicher Weise beeinflusst, könnte ein Hinweis darauf sein, wobei die Größe des Substrats oder die Positionen der zu ubiquitylierenden Lysin-Reste eine Rolle spielen könnte. Speziell für den Fall HIF-1 α könnte man zum Beispiel in einem *in vitro*-Ubiquitylierungsassay untersuchen, ob die Ubiquitylierung eines HIF-Peptids im Vergleich zum wesentlich größeren HIF-1 α -Protein mehr vom Neddylierungsstatus der CRL abhängt. *In vivo* könnte man diesen Sachverhalt in einem *Turnover*-Assay nur anhand eines Substrats prüfen, dessen Abbau und Ubiquitylierung rein von CRLs abhängig sind. Dazu müssten zunächst mehrere CRL-Substrate identifiziert werden oder eventuelle, alternative Abbauwege durch Inhibierung oder *Knockdown* ausgeschaltet werden. Außerdem könnte man, wie bereits erwähnt, die *Turnover*-Assays in 786-0 Zellen wiederholen indem man HIF-2 α durch Hypoxie akkumulieren lässt, um eventuelle technische Probleme wie zum Beispiel insuffizientes Auswaschen von CoCl₂ oder mögliche Nebeneffekte der chemischen Stabilisatoren zu vermeiden.

5. Zusammenfassung

Neben den bekannten Funktionen im ER-assoziierten Proteinabbau (ERAD), wird der AAA-ATPase p97 zunehmend eine Rolle im UPS zugeschrieben. So wurde zum Beispiel erkannt, dass p97 und dessen Adapterprotein Ubxd7 im *Turnover* des CRL Substrats HIF-1 α eine Rolle spielen, wobei Ubxd7 direkt über eine UIM-Domäne an das Nedd8 der neddylierten CRL bindet. CRLs sind mit ihrer Vielfalt an Substraten ein wichtiger Faktor für die Zellhomöostase und spielen eine große Rolle bei der Pathogenese maligner oder neurodegenerativer Erkrankungen. Während der Ubiquitylierungsprozess durch CRLs schon detailliert verstanden ist, ist der genaue Mechanismus ihrer Regulation noch zu großen Teilen unklar. Gerade der Interaktion mit Ubxd7 und p97 könnte ein neuer Mechanismus der CRL-Regulation oder Substrat-Prozessierung zu Grunde liegen.

In dieser Studie konnte in Zellkultur-basierten Cycloheximid-*Turnover*-Assays unter *Knockdown* von Ubxd7 und p97 beobachtet werden, dass Ubxd7 und p97 die Ubiquitylierung von HIF-1 α abhängig vom Neddylierungsstatus der CRLs zu verändern scheinen. *Turnover*-Assays und *in vitro*-Ubiquitylierungsreaktionen mit einem HIF-1 α -Peptid wiesen zudem auf eine CRL-inhibierende Rolle von Ubxd7 hin.

Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass HIF-1/2 α als Cullin2^{VC}-Substrate völlig unabhängig von der Aktivität von Nedd8-E1 und somit unabhängig vom Neddylierungsstatus der CRLs abgebaut werden können. Die Frage, ob CRLs auch *in vivo* im deneddylierten Zustand HIFs ubiquitylieren und somit deren Abbau vermitteln können oder ob in diesem Fall verschiedene, alternative Abbauewege greifen, bleibt jedoch unbeantwortet.

Weiterhin konnte mit Hilfe von Transfektions- und *Pulldown*-Experimenten das zytosolische und C-terminale HIF-1 α -Abbauprodukt HDP-80 identifiziert werden, wobei ein möglicher Abbaumechanismus und die physiologische Rolle dieser Beobachtung Gegenstand weiterführender Experimente sein müssen.

Zusammen genommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Ubxd7 möglicherweise die Funktion von CRLs inhibiert, und dass die Neddylierung für verschiedene Substrate von unterschiedlicher Bedeutung ist. Da die Neddylierung bereits Ziel pharmakologischer Therapien ist (MLN4924), wird es zukünftig von besonderem Interesse sein, wie und in welchem Maße CRL-Substrate davon abhängen.

6. Summary

Currently, the protein p97, an AAA-ATPase involved in ER-associated protein degradation (ERAD), is becoming more and more linked to the ubiquitin proteasome system (UPS). Recently, it was described that p97, together with its adapter protein Ubx7, is implicated in the turnover of the Cullin-RING ligase (CRL) substrate HIF-1 α , whereby Ubx7 through its UIM-domain directly interacts with the Nedd8-conjugated CRL. Regulating a plethora of substrates, CRLs play a pivotal role in cellular homeostasis as well as in the pathogenesis of malignancies and neurodegenerative diseases. While the process of ubiquitylation is well described, a detailed understanding of mechanisms regulating CRLs is still missing. Through their direct interaction with CRLs, p97 and Ubx7 could potentially be involved in a new mechanism of CRL-regulation or substrate processing.

Using tissue culture-based cycloheximide-turnover-assays and knockdowns of Ubx7 and p97, it was observed that Ubx7 and p97 seem to alter HIF-1 α ubiquitylation dependent on the neddylation status of CRLs. Other results from turnover assays and *in vitro* ubiquitylation assays with a HIF-1 α peptide also suggest an inhibitory role of Ubx7 in CRL ubiquitylation reactions.

Furthermore, it was shown for the first time that Cullin2^{VC} substrates HIF-1/2 α can be degraded independently of Nedd8-E1 activity and CRL-neddylation. It remains unclear, whether either deneddylated CRLs are still able to ubiquitylate HIFs *in vivo* or if other alternative pathways mediate HIF-degradation while CRLs are deneddylated.

Additionally, a cytosolic and C-terminal HIF-1 α degradation product named HDP-80 was identified using transfection and pulldown experiments. A possible cleavage mechanism and a physiological role for HDP-80 need to be the focus of future investigations.

Taken together, these results suggest that Ubx7 possibly inhibits CRL function and that various CRL-substrates might depend to different degrees on CRL-neddylation. Since neddylation is already a target of pharmacological therapies (MLN4924), it will be of particular interest to determine why and how many CRL-substrates depend on neddylation.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
19S RP	Regulatorisches Partikel des Proteasoms
20S KP	Kernpartikel des Proteasoms
26S	Proteasom aus 19S RP und 20S KP
293T	<i>Human embryonic kidney cells</i>
786-0	<i>Renal cell carcinoma cells</i>
A	Ampere
Å	Ångström (= 10^{-10} m)
AAA-ATPase	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
Ang2	Angiopoetin 2
ASPL	<i>Alveolar soft part sarcoma locus</i> (auch UBXD9)
ATP	Adenosintriphosphat
B	Elongin B
bHLH	<i>Basic Helix-Loop-Helix Domain</i>
C	Elongin C
C-TAD	<i>C-terminal transactivation domain</i>
CA IX	Carboanhydrase IX
CA12	Carboanhydrase 12
CAND1	<i>Cullin associated and dissociated Protein 1</i>
CAS	<i>Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1</i>
CBP	<i>[cAMP Response Element Binding Protein (CREB)] Binding Protein (CBP)</i>
CHX	Cycloheximid
CRL2 ^{VBC}	Cullin2-VHL-ElonginB-ElonginC-RING-Ligase
CRLs	Cullin-RING-Ligasen
CSN	<i>COP9 signalosome</i>

Cul2	Cullin2
DDR	<i>DNA damage response</i>
DUB	<i>Deubiquitylating enzyme</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym 1
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym 2
E3	Ubiquitin-ligierendes Enzym 3
E4	Ubiquitin-ligierendes Enzym 4 (Enzym zur sekundären Ubiquitylierung)
EPO	Erythropoetin
ERAD	<i>Endoplasmatic reticulum associated degradation</i>
FAF1	<i>FAS associated factor 1</i>
FBP	F-Box-Protein
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIH-1	<i>Factor inhibiting HIF-1</i>
g	Gramm
G	Gravitationskraft der Erde
h	Stunde/n
HDP	<i>HIF degradation product</i>
HECT	<i>Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus</i>
HIFs	Hypoxie induzierbare Faktoren
HRP	<i>Horseraddish peroxidase</i>
IBMFD	<i>Inclusion body myopathy with frontotemporal dementia</i>
JAMM	Jab1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal/MPN
K-48	Lysinrest 48 des Proteins Ubiquitin
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere

min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms mono	<i>mouse monoclonal</i>
N-TAD	<i>N-terminal transactivation domain</i>
N8	Nedd8
NAE	<i>Nedd8 activating enzyme</i>
Nedd8	<i>Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i>
nM	Nanomolar
ODDD	<i>Oxygen dependent degradation domain</i>
P	Phosphat
p27	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
p300	<i>E1A binding protein p300</i>
p53	<i>Tumor protein p53</i>
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PHD	Prolylhydroxylase
rbb poly	rabbit polyclonal
Rbx1	RING-Box-Protein 1
RING	Really interesting new gene
RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
Rpb1	<i>DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1</i>
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
SCF	<i>Skp-Cullin-F-box-containing complex</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde/n
Skp1	<i>S-phase kinase-associated Protein 1</i>

SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
U7	Ubxd7
Ub	Ubiquitin
UBA	<i>Ubiquitin associated domain</i>
Ubc12	<i>Nedd8-conjugating enzyme Ubc12</i>
UBIs	<i>UBiquitylated inclusion bodies</i>
UBX	<i>Ubiquitin regulatory X</i>
Ubxd7	<i>UBX-domain-protein 7</i>
UIM	<i>Ubiquitin interaction motif</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
VCP	<i>Valosine-Containing-Protein</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHL	Von Hippel Lindau Protein
w/o	<i>without</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
wt	<i>Wild type</i>
x	-fach
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	2
Abbildung 1.2	Zusammensetzung des 26S Proteasom Komplexes in <i>S. cerevisiae</i>	3
Abbildung 1.3	Aufbau eines CRL-Komplexes am Beispiel einer SCF-RING-Ligase	5
Abbildung 1.4	Der Nedd8-CAND1-Zyklus am Beispiel eines SCF-CRL-Komplexes	8
Abbildung 1.5	Aufbau der Cullin2-VHL-ElonginB/C-E3-Ligase (CRL2 ^{VBC})	9
Abbildung 1.6	Der klassische HIF-Pathway am Beispiel von HIF-1 α	12
Abbildung 1.7	Struktur des p97-Hexamers	14
Abbildung 1.8	Allgemeines akzeptiertes Modell für die Funktion von p97 im UPS	15
Abbildung 1.9	Struktur der Domänen des p97-Adapterproteins Ubx7	17
Abbildung 2.1	Messung des Zeitverlaufs der Proteolyse von HIF-1/2 α	46
Abbildung 3.1	Etablierung von Bedingungen zur Analyse des Abbaus von HIF-1/2 α	54
Abbildung 3.2	Identifikation des HIF-1 α Abbauprodukts HDP-80	57
Abbildung 3.3	<i>Knockdowns</i> von Ubx7 und p97 führen zu Veränderungen bei HIF-1 α -Abbau und -Ubiquitylierung	61/62
Abbildung 3.4	Der Abbau und die Ubiquitylierung von HIF-1 α sind zu großen Teilen unabhängig von der Cullin-Neddylierung	66
Abbildung 3.5	Der Abbau von HIF-2 α ist unabhängig von der Cullin-Neddylierung, Ubx7 und p97	68
Abbildung 3.6	Ubx7 inhibiert die Ubiquitylierung eines HIF-1 α -Peptids <i>in vitro</i>	70

9. Literaturverzeichnis

- Alexandru, G., Graumann, J., Smith, G. T., *et al.* (2008). UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. *Cell* **134**, 804-816.
- Anchoori, R. K., Karanam, B., Peng, S., *et al.* (2013). A bis-benzylidene piperidone targeting proteasome ubiquitin receptor RPN13/ADRM1 as a therapy for cancer. *Cancer Cell* **24**, 791-805.
- Bader, H. L. & Hsu, T. (2012). Systemic VHL gene functions and the VHL disease. *FEBS Lett* **586**, 1562-1569.
- Bairoch, A., Apweiler, R., Wu, C. H., *et al.* (2005). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic acids research* **33**, 154-159.
- Bandau, S., Knebel, A., Gage, Z. O., *et al.* (2012). UBXN7 docks on neddylated cullin complexes using its UIM motif and causes HIF1alpha accumulation. *BMC Biol* **10**, 36.
- Besten, W., Verma, R., Kleiger, G., *et al.* (2012). NEDD8 links cullin-RING ubiquitin ligase function to the p97 pathway. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 511-516.
- Bornstein, G., Ganoth, D. & Hershko, A. (2006). Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-box protein and substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11515-11520.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brahimi-Horn, M. C. & Pouyssegur, J. (2009). HIF at a glance. *J Cell Sci* **122**, 1055-1057.
- Bruick, R. K. & McKnight, S. L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337-1340.
- Cai, Z., Zhong, H., Bosch-Marce, M., *et al.* (2008). Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res* **77**, 463-470.
- Calabrese, M. F., Scott, D. C., Duda, D. M., *et al.* (2011). A RING E3-substrate complex poised for ubiquitin-like protein transfer: structural insights into cullin-RING ligases. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 947-949.
- Cayli, S., Klug, J., Chapiro, J., *et al.* (2009). COP9 signalosome interacts ATP-dependently with p97/valosin-containing protein (VCP) and controls the ubiquitination status of proteins bound to p97/VCP. *The Journal of biological chemistry* **284**, 34944-34953.
- Chen, L., Uchida, K., Endler, A., *et al.* (2007). Mammalian tumor suppressor Int6 specifically targets hypoxia inducible factor 2 alpha for degradation by hypoxia- and pVHL-independent regulation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 12707-12716.
- Cope, G. A., Suh, G. S., Aravind, L., *et al.* (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* **298**, 608-611.

- DeLaBarre, B. & Brunger, A. T. (2005). Nucleotide dependent motion and mechanism of action of p97/VCP. *J Mol Biol* **347**, 437-452.
- Deshaies, R. J. & Joazeiro, C. A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**, 399-434.
- Deshaies, R. J., Emberley, E. D. & Saha, A. (2010). Control of cullin-ring ubiquitin ligase activity by nedd8. *Subcell Biochem* **54**, 41-56.
- Drews, O. & Taegtmeyer, H. (2014). Targeting the ubiquitin-proteasome system in heart disease: the basis for new therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal* **21**, 2322-2343.
- Duda, D. M., Borg, L. A., Scott, D. C., et al. (2008). Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation. *Cell* **134**, 995-1006.
- Eckle, T., Kohler, D., Lehmann, R., et al. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* **118**, 166-175.
- Feinman, R., Deitch, E. A., Watkins, A. C., et al. (2010). HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G833-843.
- Flügel, D., Gorch, A. & Kietzmann, T. (2012). GSK-3 β regulates cell growth, migration, and angiogenesis via Fbw7 and USP28-dependent degradation of HIF-1 α . *Blood* **119**, 1292-1301.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., et al. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research* **31**, 3784-3788.
- Guo, N. & Peng, Z. (2013). MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. *Asia Pac J Clin Oncol* **9**, 6-11.
- Haines, D. S. (2010). p97-containing complexes in proliferation control and cancer: emerging culprits or guilt by association? *Genes Cancer* **1**, 753-763.
- Hanzelmann, P., Buchberger, A. & Schindelin, H. (2011). Hierarchical binding of cofactors to the AAA ATPase p97. *Structure* **19**, 833-843.
- Herndon, T. M., Deisseroth, A., Kaminskis, E., et al. (2013). U.S. Food and Drug Administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**, 4559-4563.
- Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., et al. (2002). Identification of ter94, Drosophila VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death Differ* **9**, 264-273.
- Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., et al. (2001). VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ* **8**, 977-984.
- Hu, C. J., Iyer, S., Sataur, A., et al. (2006). Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in stem cells. *Molecular and cellular biology* **26**, 3514-3526.
- Huang, L. E. (2013). Biochemistry. How HIF-1 α handles stress. *Science* **339**, 1285-1286.
- Hubbi, M. E., Hu, H., Kshitiz, F., et al. (2013). Chaperone-mediated autophagy targets HIF-1 α for lysosomal degradation. *The Journal of biological chemistry*.

- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., *et al.* (2004). Physical and functional interaction between Dorfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *The Journal of biological chemistry* **279**, 51376-51385.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., *et al.* (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464-468.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., *et al.* (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472.
- Jentsch, S. & Rumpf, S. (2007). Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem Sci* **32**, 6-11.
- Jia, L. & Sun, Y. (2011). SCF E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Curr Cancer Drug Targets* **11**, 347-356.
- Kane, R. C., Bross, P. F., Farrell, A. T., *et al.* (2003). Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist* **8**, 508-513.
- Katsnelson, A. (2012). Next-generation proteasome inhibitor approved in multiple myeloma. *Nat Biotechnol* **30**, 1011-1012.
- Kim, H., Zhang, H., Meng, D., *et al.* (2013). UAS domain of Ubxd8 and FAF1 polymerizes upon interaction with long-chain unsaturated fatty acids. *J Lipid Res* **54**, 2144-2152.
- Kisselev, A. F., van der Linden, W. A. & Overkleeft, H. S. (2012). Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol* **19**, 99-115.
- Kisselev, A. F. (2013). A novel bullet hits the proteasome. *Cancer Cell* **24**, 691-693.
- Koh, M. Y. & Powis, G. (2009). HAF : the new player in oxygen-independent HIF-1 α degradation. *Cell Cycle* **8**, 1359-1366.
- Koh, M. Y., Lemos, R., Jr., Liu, X., *et al.* (2011). The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res* **71**, 4015-4027.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lipkowitz, S. & Weissman, A. M. (2011). RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **11**, 629-643.
- Liu, J., Furukawa, M., Matsumoto, T., *et al.* (2002). NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120(CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. *Mol Cell* **10**, 1511-1518.
- Liu, Y. & Ye, Y. (2012). Roles of p97-associated deubiquitinases in protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Curr Protein Pept Sci* **13**, 436-446.
- Liu, Y. V., Baek, J. H., Zhang, H., *et al.* (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O₂-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Mol Cell* **25**, 207-217.

- Lonergan, K. M., Iliopoulos, O., Ohh, M., *et al.* (1998). Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Molecular and cellular biology* **18**, 732-741.
- Lu, Z. & Hunter, T. (2010). Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell Cycle* **9**, 2342-2352.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., *et al.* (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**, 1382-1385.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., *et al.* (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271-275.
- Meyer, H., Bug, M. & Bremer, S. (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol* **14**, 117-123.
- Moreau, P., Richardson, P. G., Cavo, M., *et al.* (2012). Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* **120**, 947-959.
- Moroz, E., Carlin, S., Dyomina, K., *et al.* (2009). Real-time imaging of HIF-1 α stabilization and degradation. *PLoS One* **4**, e5077.
- Okumura, F., Matsuzaki, M., Nakatsukasa, K., *et al.* (2012). The Role of Elongin BC-Containing Ubiquitin Ligases. *Front Oncol* **2**, 10.
- Peet, D. & Linke, S. (2006). Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation. *Novartis Found Symp* **272**, 37-49; discussion 49-53, 131-140.
- Peters, J. M., Walsh, M. J. & Franke, W. W. (1990). An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *The EMBO journal* **9**, 1757-1767.
- Pickart, C. M. & Cohen, R. E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 177-187.
- Pickart, C. M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell* **116**, 181-190.
- Pierce, N. W., Lee, J. E., Liu, X., *et al.* (2013). Cdn1 Promotes Assembly of New SCF Complexes through Dynamic Exchange of F Box Proteins. *Cell*.
- Pye, V. E., Dreveny, I., Briggs, L. C., *et al.* (2006). Going through the motions: the ATPase cycle of p97. *J Struct Biol* **156**, 12-28.
- Reinhardt, H. C. & Schumacher, B. (2012). The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* **28**, 128-136.
- Saha, A. & Deshaies, R. J. (2008). Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation. *Mol Cell* **32**, 21-31.
- Schröder, R., Watts, G. D., Mehta, S. G., *et al.* (2005). Mutant valosin-containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia. *Ann Neurol* **57**, 457-461.
- Schuberth, C. & Buchberger, A. (2008). UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2360-2371.
- Semenza, G. L., Neifelt, M. K., Chi, S. M., *et al.* (1991). Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 5680-5684.
- Semenza, G. L. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* **2007**, cm8.

- Semenza, G. L. (2010a). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 51-56.
- Semenza, G. L. (2010b). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625-634.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**, 399-408.
- Shimoda, L. A. & Semenza, G. L. (2011). HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 152-156.
- Skaar, J. R., Pagan, J. K. & Pagano, M. (2014). SCF ubiquitin ligase-targeted therapies. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 889-903.
- Soucy, T. A., Smith, P. G., Milhollen, M. A., *et al.* (2009). An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* **458**, 732-736.
- Stenger, C., Naves, T., Verdier, M., *et al.* (2011). The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status. *Int J Oncol* **39**, 601-609.
- Tian, H., McKnight, S. L. & Russell, D. W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* **11**, 72-82.
- Verma, R., Oania, R., Fang, R., *et al.* (2011). Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II. *Mol Cell* **41**, 82-92.
- Vij, N. (2008). AAA ATPase p97/VCP: cellular functions, disease and therapeutic potential. *J Cell Mol Med* **12**, 2511-2518.
- Wakabayashi, N., Slocum, S. L., Skoko, J. J., *et al.* (2010). When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid Redox Signal* **13**, 1649-1663.
- Wilck, N. & Ludwig, A. (2014). Targeting the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: status quo, challenges, and perspectives. *Antioxid Redox Signal* **21**, 2344-2363.
- Wolfenden, R. & Snider, M. J. (2001). The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Acc Chem Res* **34**, 938-945.
- Yu, F., White, S. B., Zhao, Q., *et al.* (2001). HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 9630-9635.
- Yu, P. & Kodadek, T. (2007). Dynamics of the hypoxia-inducible factor-1-vascular endothelial growth factor promoter complex. *The Journal of biological chemistry* **282**, 35035-35045.
- Zhang, Q. & Yang, H. (2012). The Roles of VHL-Dependent Ubiquitination in Signaling and Cancer. *Front Oncol* **2**, 35.
- Zheng, J., Yang, X., Harrell, J. M., *et al.* (2002). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol Cell* **10**, 1519-1526.

10. Anhang

10.1 Zusätzliche Informationen zur Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen (Kapitel 2.6.1)

Ein Auszug aus der „*Supplementary Information*“ von „Besten, W., Verma, R., Kleiger, G., Oania, R. S. & Deshaies, R. J. (2012). NEDD8 links cullin-RING ubiquitin ligase function to the p97 pathway. *Nature structural & molecular biology* **19**, 511-516, S511.“.

SUPPLEMENTARY METHODS

Protein expression and purification

Plasmids for Split-n-Coexpress CUL2 (pACYC184 CUL2 NTD and pGEX-RBX1rbs-CUL2 CTD) (RDB2611&2612) were co-transformed into BL21 DE3 (Invitrogen) and selected on LB plates containing ampicillin (100 µg/ml) and chloramphenicol (25 µg/ml). An overnight starter culture grown at 37°C was diluted 200 fold and incubated at 37°C until an OD₆₀₀ 1.0 was reached. Cells were shifted to 16°C and protein expression induced by the addition of 400 µM IPTG for 16 hours. Bacteria were harvested, resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, protease inhibitors (Roche)) and lysed by 4 rounds of sonication. Cleared lysates were incubated with Glutathione Sepharose 4B resin (GE Healthcare) for 1-3 hours after which the beads were washed with lysis buffer and incubated with elution buffer (20 mM glutathione, 50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol). The GST tag on RBX1 was removed by incubating the eluted recombinant protein with Thrombin (Sigma) for 16 hours at 4°C. CUL2-RBX1 complexes were further purified by ion exchange (Resource Q) followed by sizing column (S200) and stored at -80°C in storage buffer (30 mM Tris-Cl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM DTT and 10% (v/v) glycerol).

pGEX4T-2 TEV vectors encoding Flag-UBXD7 and Flag-Ubx5 (wt, domain deletion, single and triple mutants) were transformed into BL21 Rosetta cells and selected on LB plates containing ampicillin (100 µg/ml) and chloramphenicol (25 µg/ml). An overnight starter culture grown at 37°C was diluted 200 fold and incubated at 37°C until an OD₆₀₀ 0.8 was reached. Protein expression was induced by the addition of 400 µM IPTG for 3 hours. Bacteria were harvested, resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, protease inhibitors (Roche)) and lysed by 4 rounds of sonication. Cleared lysates were incubated with glutathione sepharose (GE Healthcare) for 3 hours after which the beads were washed with lysis buffer and resuspended in TEV-cleavage buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.5 mM EDTA and 1 mM DTT) to make a 20% slurry. TEV protease (AcTEV, Invitrogen) was added to a final concentration of 75 U/ml and the beads were incubated for 16 hours at 4 °C with gentle agitation. Supernatant containing Flag-tagged UBXD7 or Ubx5 was snap frozen after the addition of glycerol to final concentration of 5% (v/v) and stored at -80°C.

Expression plasmids

Mammalian expression constructs for Flag-UBXD7

Mammalian expression construct, pCMV5-Flag-UBXD7¹, was used as a template for site directed mutagenesis to generate the following alterations: ΔUBA (deleted for amino acids 9-54), ΔUAS (deleted for amino acids 141-259), ΔUIM (deleted for amino acids 284-301), ΔUBX (deleted for amino acids 408-

489), A293Q, and the triple mutant E286R, L290E, A293Q. For the single Δ UBX and the double (Δ UBA Δ UBX, Δ UAS Δ UBX, Δ UIM Δ UBX) domain deletion constructs, a stop codon was introduced upstream of the UBX domain in UBXD7.

Primers used for site directed mutagenesis:

(Nucleotides at the deletion boundary and nucleotides that were substituted are highlighted in red)

UBXD7 Δ UBA
 5' - GCCCACGGGGCTCCGCGATCGCTGAAGAGCCAGTAC
 5' - GTACTGGGCTCTTCAGCGATCGCGGAGCCCCGTGGGC
 UBXD7 Δ UAS
 5' - CGATAAGAAATTAACCTACCCCTTGACAGTGAACATGGCAACTGGATGGACTTTCTAGC
 5' - GCTAGAAAGTCCATCCAGTTGTCCATGTTCTCTGCAAGGTAGTTAATTCTTATCG
 UBXD7 Δ UIM
 5' - GTGCCCCGTTTCAGAGAGCCTTATAGATCATTGTTGATTCAACACAGACAAAACAGG
 5' - CCTGTTTGTCTGTGTTGAATCAAATGATCTATAAGGCTCTCTGACGGGCAC
 UBXD7 Δ UBX
 5' - GATGGAGTAGTGGAGGGGTAAGATGTAATGGACAAAAGCAC
 5' - GTGCTTTTGGTCCATTACATCTTACCCCTCCACTACTCCATC
 UBXD7 A293Q
 5' - CAGCCAGCTAGAAAGCTCAGATCAGAGCCTCCTTAC
 5' - GTAAGGAGGCTCTGATCTGAGCTTCTAGCTGGCTG
 UBXD7 E286R, L290E, A293Q
 5' - CTTATAGATGCAAGTAGAGACAGCCAGGAAAGCTCAGATCAGAGCCTCCTTAC
 5' - GTAAGGAGGCTCTGATCTGAGCTTCTTCTGGCTGTCTACTTGCATCTATAAG

MSCV-Flag UBA-UBX Δ UBX expression constructs

Full-length cDNAs for all five UBA-UBX genes (p47, UBXD8, FAF1, UBXD7, and SAKS1) ¹ were amplified by PCR using primers that contained attB sites at the 5'-termini. After gel purification, PCR products were cloned into the pDONR223 vector ² using BP clonase (Invitrogen) according to manufacturers instructions. Correct clones were used for site-directed mutagenesis to introduce a stop codon upstream of the UBX domain in each of the UBA-UBX genes. Lastly, each UBA-UBX cDNA was transferred to an MSCV-Flag-Gateway-Ires-GFP vector with LR clonase (Invitrogen).

Primers used for PCR amplification and cloning into pDONR223 with BP clonase:
 (Nucleotide homologs with the cDNA's are highlighted in red)

P47
 5' - GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCATGGCGCGGAGCGACAGGAGG
 5' - GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCTTATGTTAACCGCTGCACGATG
 UBXD8
 5' - GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCATGGCGCGCCTGAGGAG
 5' - GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCTCATTCGTCAGTTAGGTCTTGAAC
 FAF1
 5' - GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCATGGCGTCCAACATGGACC
 5' - GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCTTACTCTTTTGCTTCAAGGAAAAGG
 UBXD7
 5' - GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCATGGCTGCCACGGGGGCTCC
 5' - GGGGACAACCTTTGTACAAAAAGTTGGCTTAATTCTTCTCCTGTACAAAGACAGTCT

SAKS1
 5' - GGGGACAACTTTGTACAAAAAGTTGGC **ATGGCGGAGCTGACGGCTCTTG**
 5' - GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGGG **TCACAAAGCCCTTCTCTTTGCATC**

Primers used for the introduction of a stop codon upstream of the UBX domain:

P47
 5' - CTCGTCCATCTTAATCAATTAGGCAGAACCTACCACGAAC
 5' - GTTCGTGGTAGGTTCTGCCTAATTGATTAAGATGGACGAG
 UBXD8
 5' - CCTGATGACCCCTGAATGAGTCAAGATCATCTTCAAATTAC
 5' - GTAATTTGAAGATGATCTTGACTCATTAGGGTCATCAGG
 FAF1
 5' - CCTGAGCCAAAGGAAGAATAAGCTGAGCCTGTGAGCAAAC
 5' - GTTTGCTCACAGGCTCAGCTTATTCTTCCTTTGGCTCAGG
 UBXD7
 5' - GATGGAGTAGTGGAGGGGTAAGATGTAAATGGACAAAAGCAC
 5' - GTGCTTTTGGTCCATTTACATCTTACCCCTCCACTACTCCATC
 SAKS1
 5' - GAGCCTCCCAAGCGGTAGTATGACCAGTGTGTCATAC
 5' - GTATGCGACACTGGTCATACTACCGCTTGGTGGGAGGCTC

The gateway destination vector, MSCV-Flag-GW-Ires-GFP, was made by ligating an annealed oligo containing a Flag tag into the BamHI-XhoI sites of MSCV-Ires-GFP. Next the RFA gateway cassette (Invitrogen) was introduced into the SnaBI site.

Flag tag oligo:

5' - GATCCAGATCTGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTACGTAG
 5' - TCGACTACGTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATGGTGGCAGATCTG

Bacterial expression constructs for Flag-UBXD7

Flag-tagged UBXD7, as an NcoI fragment isolated from pCMV5-Flag-UBXD7, was first cloned into pBluescript-SK II-NcoI, then isolated as an EcoRI-XhoI fragment and cloned into pGEX-4T-2 (GE Healthcare). Because thrombin cleaved recombinant Flag-UBXD7 protein, we introduced a TEV cleavage site into the BamHI-EcoRI sites of pGEX-4T-2 Flag-UBXD7. All DNA fragments containing Flag-UBXD7 domain deletions or amino acid substitutions were isolated from the pCMV5 vector as NcoI fragments and used to replace Flag-UBXD7 in the pGEX-4T-2 TEV vector. pBluescript SK II-NcoI was made by introducing an NcoI linker into the EcoRV site of pBluescript SK II (Stratagene).

UBXD7 UIM replacement constructs

Mammalian expression construct, pCMV5-Flag-UBXD7¹, was used as a template for site directed mutagenesis to introduce recognition sequences for the restriction endonucleases RsrII (at bp 829-835) and Nrul (at bp 934-939) located upstream and downstream of the UIM, respectively. Next UBXD7 was digested with RsrII and Nrul and annealed oligo's, containing the UIM domain of S5a (S5a-1 residues 211-231; S5a-2 residues 282-302) or HRS (residues 258-278), were introduced.

Primers used for site directed mutagenesis:

(Nucleotides that were substituted are highlighted in red and restriction sites are underlined)

RsrII:

5'-ccccaaaaatgtgcccggtccgagagccttatagatgc
 5'-gcattctataaggctctcggaaccgggcacattttttggg

NruI:

5'-cacagacaaaacaggattccgagatcagatgaagaatctgaatc
 5'-gattcagattcttcatctgatcgcgaatcctgtttgtctgtg

Sequence of oligo's used to insert the UIM domain of:**S5a UIM-1**

5'-gtccgagagccttatagatgcaagtgtgatcctgagctggccttggcccttcgtgtatctatggaagagcagcgg
 cagcgggtcaacacagacaaaacaggattcg
 5'-cgaatcctgtttgtctgtgttgaccgctgcccgtgctcttccatagatacacgaagggccaaggccagctcagga
 tcagcacttgcatctataaggctctcg

S5a UIM-2

5'-gtccgagagccttatagatgcaactgaggaagagcagattgcttatgccatgcagatgtccctgcagggagcagag
 ttggctcaacacagacaaaacaggattcg

5'-cgaatcctgtttgtctgtgttgagcacaactctgtccctgcagggacatctgcattggcataagcaatctgtctc
 toctcagttgcattctataaggctctcg

HRS UIM

5'-gtccgagagccttatagatgcacagagagagagagagctgcagctggccctggcgtgtcacagtcagagggcggag
 gagaagtcaacacagacaaaacaggattcg

5'-cgaatcctgtttgtctgtgttgactctctcgcctctgaactgtgacagcgcgaagggccagctgcagctcctcc
 tctcctgtgcattctataaggctctcg

UBX5 constructs for bacterial expression and yeast genomic integration

Full-length yeast *UBX5* was amplified by PCR with primers that contained *Sall* and *NotI* sites and the PCR product was cloned into the pGEM-T easy vector (Promega). The pGEM-T easy *UBX5* construct was used for site directed mutagenesis to generate Δ UIM (deleted for amino acids 359-376), as well as single (A368Q) and triple (E361R, M365E, A368Q) point mutant constructs. Wild type and mutant forms of *UBX5* as *Sall*-*NotI* fragment were subsequently used to replace UBXD7 in pGEX-4T-2 TEV Flag-UBXD7. The same *Sall*-*NotI* fragment of *UBX5* Δ UIM was inserted into pRS306³.

Primers used for site directed mutagenesis of yeast *UBX5*:

(Nucleotide at the deletion boundary and nucleotides that were substituted are highlighted in red)

Ubx5 Δ UIM

5'-CCTCTTCCTAAAGTGGATCCAACAAC^TTCGAGCAAATCAAACCAAGAAGAAGTG

```
5'-CACTTCTTCTTGGTTTGATTGCTCGAAGTTGTTGGATCCACTTTAGGAAGAGG
Ubx5 A368Q
5'-CCAACAACCTTTGACCGAAGAGCAACAAATGGAATTACAGATTAAAGAGTCATTA
5'-TAATGACTCTTTAATCTGTAATCCATTGTTGCTCTTCGGTCAAAGTTGTTGG
Ubx5 E361R, M365E, A368Q
5'-CCAACAACCTTTGACCGAGAGAGCAACAAGAATTACAGATTAAAGAGTCATTA
5'-TAATGACTCTTTAATCTGTAATCTTCTTGTGCTCTCTGGTCAAAGTTGTTGG
```

Generation of a Split-n-Coexpress CUL2–RBX1 bacterial expression construct

The N-terminal part of human CUL2 (amino acids 6-379) was amplified by PCR using primers that contained *Asel* and *NotI* restriction sites. The bacterial expression vector, pACYC184 containing CUL1 NTD⁴, was digested with *NdeI* and *NotI* to release CUL1 NTD. In its place, the CUL2 NTD PCR product, digested with *Asel* and *NotI*, was introduced.

The bacterial expression construct, pGEX-RBX1-rbs-CUL1 CTD⁴, was digested with *NcoI* and *NotI* and the released CUL1 CTD fragment was cloned into pBluescript-SK II-*NcoI*. The C-terminal part of human CUL2 (amino acids 380-745) was amplified by PCR using primers that contained *Asel* and *NotI* restriction sites. CUL1 CTD was removed from pBluescript-SK II-*NcoI* with *NdeI* and *NotI* and CUL2 CTD PCR product was inserted. Using *NotI* and *NcoI*, the CUL2 CTD fragment from pBluescript-SK II-*NcoI* CUL2 CTD was used to replace CUL1 CTD in the pGEX-RBX1-rbs-CUL1CTD vector.

11. Publikationsverzeichnis

Reichermeier, K. M., Caselitz, M. & Wagner, S. (2014). An unusual case of a pancreatic cyst. *Gastroenterology* **147**, e1-2.

12. Ehrenwörtliche Erklärung

„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.“

Deggendorf, den 10. Dezember 2014

Kurt Michael Reichermeier

13. Danksagung

Zuallererst möchte ich den Laboren der Arbeitsgruppen Meinhardt und Deshaies für das Ermöglichen dieser Arbeit, die Bereitstellung aller Materialien und die lehrreiche sowie unvergessliche Zeit danken.

Ganz besonderer Dank gilt hierbei Andreas Meinhardt und Jörg Klug, die mich auf meinem bisherigen Weg in einer Weise förderten, wie ich sie mir nicht besser hätte vorstellen und wünschen können. Vielen Dank auch an Julius Chapiro, Suada Fröhlich und Eva Schneider, die mich bei ersten Gehversuchen im Labor geduldig und engagiert unterstützten.

Besonders möchte ich mich auch bei Raymond Deshaies für die mir entgegengebrachte Offenheit, Flexibilität und Unterstützung bedanken. Großer Dank gilt Willem den Besten für eine exzellente Betreuung, unzählige Materialien und die langen Gespräche und Erklärungen. Auch Ruzbeh Mosadeghi möchte ich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen in wöchentlichen „gotta minutes“ und seine Freundschaft danken. Ebenfalls danke ich Robert Oania für das ausgezeichnete Labormanagement, seine unvergleichliche ECL-Lösung und die täglichen Witze.

Sehr großer Dank gilt natürlich meiner Familie für die mentale sowie finanzielle Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen, das Studium so offen zu gestalten.

Weiterer Dank gilt der International Academy of Life Sciences, dem DAAD und der Marburger Bund Stiftung für die Förderung dieses Projekts und meiner Zeit am Caltech.

Des weiteren möchte ich mich beim Studiendekanat des Fachbereichs Medizin, besonders bei Herrn Joachim Kreuder, Herrn Richard Wagner und Frau Petra Frank bedanken, mein „academic year“ unterstützt und ermöglicht zu haben.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Helmut Zirngibl, dem netten Team der Gräflichen Verwaltung in Moos und beim Gräflichen Hause Arco-Zinneberg für die bürotechnische Unterstützung in den letzten Stunden der Fertigstellung meiner Arbeit.

Schließlich nochmals ein großer Dank an Jörg, für die unvergleichliche Betreuung, die vielen Gespräche sowie Ratschläge und die Korrektur dieser Arbeit.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**