

**Charakterisierung von Herc2 und seiner Interaktion
mit der Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Ulrike Kogel

aus Köln

Köln 2006

Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut W. Klein

Prof. Dr. Thomas Langer

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 30.06.2006

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. M. Scheffner danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. W. Klein für die freundliche Übernahme der Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. T. Langer möchte ich mich für die freundliche Bereitschaft das Koreferat zu übernehmen bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit danke ich Elvira, Alex und Kosta.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Scheffner - Adrian, Alejandro, Alexander, Dragica, Elvira, Hans-Peter, Iyappan, Kosta, Michael, Nicole, Petric, Rajesh, Shahri und Thomas - für Ihre stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank an Thomas für seine Unermüdlichkeit und Zuversicht.

Ein herzliches Dankeschön an Elvira für „Alles“.

Special thanks to the „indian-community“ Rajesh, Kumar and Michael -it was nice to have you as labmates.

Auch bei den “Alt”-Kölnern Steffi, Sandra, Laëtitia und Arnd möchte ich mich für die schöne Zeit bedanken.

Ein liebevoller Dank an meine Eltern sowie Andrea und Jens, die mich während all der Jahre begleitet und vorbehaltlos unterstützt haben.

Vor allem und für alles gilt mein besonderer Dank Jens.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Ubiquitin	1
1.2 Das Ubiquitin-Konjugationssystem	2
1.2.1 Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1)	3
1.2.2 Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2)	3
1.2.3 Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3)	4
1.2.4 Ubiquitinketten-Verlängerungsfaktoren (E4)	5
1.3 Ubiquitinketten	6
1.3.1 Lysin 48-verknüpfte Ketten	6
1.3.2 Lysin 63-verknüpfte Ketten	7
1.3.3 Lysin 6-, 11- und 29-verknüpfte Ketten	7
1.3.4 Monoubiquitinierung	8
1.4 Deubiquitinierende Enzyme	8
1.5 Ubiquitin-Protein-Ligasen	9
1.5.1 HECT-Ligasen	9
1.5.1.1 Nedd4-ähnliche HECT-Ligasen	9
1.5.1.2 Herc-Proteine	10
1.5.1.3 Andere HECT-Ligasen	13
1.5.2 RING-Finger-Ligasen	13
1.5.2.1 Monomere oder homodimere RING-Finger-Ligasen	13
1.5.2.2 Multimere RING-Finger-Ligasen	14
1.6 Ubiquitinierungssignale zur Substraterkennung und Regulation	15
1.7 Ubiquitin-ähnliche Proteine	16
1.7.1 Ubl-Proteine	16
1.7.2 Ubl-Domänen-Proteine	18
1.8 E6-AP	18
1.9 Herc2	21
1.10 Zielsetzung	24
2 Material und Methoden	25

2.1 Material.....	25
2.1.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	25
2.1.2 Medien.....	26
2.1.2.1 <i>E. coli</i>	26
2.1.2.2 Insektenzellen.....	26
2.1.2.3 Säugerzellen	26
2.1.3 Zellen.....	27
2.1.3.1 <i>E. coli</i>	27
2.1.3.2 Insektenzellen.....	27
2.1.3.3 Zelllinien	27
2.1.4 Oligonukleotide	27
2.1.4.1 Primer	27
2.1.4.2 siRNAs	29
2.1.5 Vektoren	29
2.1.6 Plasmidkonstrukte	30
2.1.6.1 pGex-2TK-Konstrukte	30
2.1.6.2 pRc/CMV-Konstrukte	31
2.1.6.3 pCDNA3-Konstrukte	31
2.1.6.4 pET3a-Konstrukte	31
2.1.6.5 pGEM-1-Konstrukte	32
2.1.6.6 pRetro.SUPER.puro-Konstrukte	32
2.1.6.7 pAcHLT-A-HIS ₆ -Konstrukte.....	32
2.1.6.8 pBluescript II SK (+)-Konstrukte	33
2.1.7 Antiseren.....	33
2.1.8 Längenstandards	33
2.1.9 Rekombinante Baculoviren	34
2.2 Methoden	34
2.2.1 Kultivierung und Lagerung von Zellen.....	34
2.2.1.1 <i>E. coli</i>	34
2.2.1.2 Insektenzellen.....	34
2.2.1.3 Eukaryotische Zellen.....	35
2.2.2 Herstellung und Amplifikation von Baculoviren	35
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	36

2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
2.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion	36
2.2.3.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	36
2.2.3.5 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen....	37
2.2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
2.2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.2.3.8 Präparation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.3.9 Präparation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	37
2.2.3.10 Transformation in CaCl ₂ -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	38
2.2.3.11 Transformation in elektrokompetente <i>E. coli</i> -Zellen (Elektroporation) .	38
2.2.3.12 DNA-Sequenzierung.....	38
2.2.3.13 Gesamtlängen-Herc2-Klonierung	38
2.2.4 Proteinexpression	40
2.2.4.1 Expression in <i>E. coli</i>	40
2.2.4.2 <i>In vitro</i> Translation.....	41
2.2.4.3 Expression in Insektenzellen.....	41
2.2.5 Aufreinigung von Proteinen	41
2.2.5.1 Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	41
2.2.5.2 Affinitätsreinigung von His-Fusionsproteinen.....	42
2.2.5.3 Anionenaustauschchromatographie	42
2.2.6 Analyse von Proteinen.....	43
2.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.2.6.2 Coomassie Blau Färbung von Proteinen	43
2.2.6.3 Fluorographie	43
2.2.6.4 Western-Blot und Immunodetektion.....	44
2.2.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
2.2.6.6 Massenspektrometische Analysen	44
2.2.7 Aufreinigung spezifischer Antikörper	44
2.2.8 <i>In vitro</i> Assays	45
2.2.8.1 GST-Kopräzipitationsassays	45
2.2.8.2 <i>In vitro</i> Ubiquitinierungsassays.....	46
2.2.8.3 Thioesterassays	46

2.2.9 <i>In vitro</i> Zellkultur Methoden (<i>in vivo</i> Methoden)	47
2.2.9.1 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen mittels Lipofektion	47
2.2.9.2 Halbwertszeitmessungen mittels Cycloheximid	48
2.2.9.3 Stabilisierung mittels MG132	48
2.2.9.4 RNA Interference	48
2.2.10 Koimmunpräzipitation	49
2.2.11 <i>In vivo</i> Ubiquitinierungsassays.....	49
2.2.12 Immunfluoreszenz.....	50
2.2.13 Subzelluläre Fraktionierung.....	51
3 Ergebnisse	53
3.1 Charakterisierung der Bindung zwischen Herc2 und E6-AP <i>in vitro</i>	53
3.1.1 Bindung von Herc2 an E6-AP <i>in vitro</i>	53
3.1.2 Minimaler Bindebereich auf Herc2 für die Bindung an E6-AP	55
3.1.3 Spezifität der Bindung von E6-AP an die RCC1b-Domäne von Herc2.....	56
3.1.4 Bindung zwischen gereinigtem E6-AP und der RCC1b-Domäne von Herc2..	57
3.1.5 Minimaler Bindebereich auf E6-AP für die Bindung an Herc2	57
3.2 Charakterisierung der Bindung zwischen Herc2 und E6-AP <i>in vivo</i>	59
3.2.1 Bindung von Herc2 an E6-AP unter Überexpressionsbedingungen	59
3.2.2 Nachweis von endogenem Herc2 mittels poly- und monoklonaler Antikörper61	
3.2.3 Bindung von endogenem Herc2 an E6-AP	65
3.2.4 Bindung von endogenem E6-AP an die RCC1b-Domäne von Herc2.....	65
3.2.5 Bindung von endogenem Herc2 an endogenes E6-AP.....	66
3.3 Charakterisierung von Herc2 als Ligase, Effektor und Substrat	68
3.3.1 Herc2 als HECT-Ligase	68
3.3.1.1 Thioesterbildung von Herc2.....	68
3.3.1.2 Autoubiquitinierung von Herc2	69
3.3.2 Ubiquitinkettenbildung <i>in vitro</i>	72
3.3.2.1 Ubiquitinketten-Katalyse von Herc2.....	73
3.3.2.2 Ubiquitinketten-Katalyse von E6-AP und anderen Ligasen	74
3.3.2.3 Einfluss von Herc2 auf die Kettenbildung von E6-AP	75
3.3.3 Einfluss von Herc2 und E6 auf die Autoubiquitinierung von E6-AP <i>in vitro</i> ..	77
3.3.4 Einfluss von Herc2 auf E6-AP <i>in vivo</i>	80
3.3.5 Herc2 als Substrat von E6-AP <i>in vitro</i>	82

3.3.6 Ubiquitinierung von Herc2 <i>in vivo</i>	83
3.3.7 Abbau von Herc2 <i>in vivo</i>	86
3.4 Charakterisierung von Gesamtlängen-Herc2	89
3.4.1 Stabilität von Herc2	89
3.4.2 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Herc2	91
3.4.3 Klonierung von Gesamtlängen-Herc2	92
3.5 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von Herc2	94
3.5.1 Identifizierung potentieller Bindungspartner der RCC1b-Domäne von Herc2	94
3.5.2 Kopurifikation mit dem <i>E. coli</i> Protein Rho	95
3.5.3 Bindung von eIF-2 γ an Herc2	96
4 Diskussion	99
4.1 Herc2 als Bindungspartner von E6-AP	100
4.1.1 Herc2 ist ein Bindungspartner von E6-AP <i>in vitro</i>	100
4.1.2 Herc2 ist ein Bindungspartner von E6-AP <i>in vivo</i>	101
4.2 Herc2 als Ligase	102
4.2.1 Herc2 ist eine E3-Ligase	102
4.2.2 Herc2 bildet Ubiquitinketten durch die Lysine K6, K11, K48, K63	104
4.2.3 Andere Ligasen katalysieren auch Ubiquitinketten über verschiedene Lysine	105
4.3 Herc2 als Effektor	106
4.3.1 RCC1b und E6 beeinflussen die Aktivität von E6-AP	106
4.3.2 RCC1b und E6 beeinflussen die Aktivität von E6-AP-Mutanten	107
4.4 Herc2 als Substrat	110
4.4.1 Herc2 ist ein Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP <i>in vitro</i>	110
4.4.2 Herc2 ist ein Ubiquitinierungssubstrat <i>in vivo</i>	110
4.4.3 Herc2 wird in Anwesenheit von E6-AP abgebaut	112
4.4.3.1 Stabilität von Herc2	112
4.4.3.2 Herc2 ist an Membranen lokalisiert	113
4.5 Weitere Bindungspartner von Herc2	115
4.5.1 Transkriptionsterminationsfaktor Rho aus <i>E. coli</i>	115
4.5.2 Bindung von Herc2 an Komponenten des Translationsinitiationskomplexes	116
4.5.3 Bindung von Herc2 an eIF-2 γ	120
4.6 Physiologische Rolle von Herc2	121

4.6.1 Herc2 ist nicht essentiell für die Zelle.....	121
4.6.2 Phänotyp der Herc2- und E6-AP-Maus-Mutanten.....	122
5 Literaturverzeichnis.....	124
6 Zusammenfassung.....	140
7 Abstract.....	141
8 Erklärung.....	142
9 Lebenslauf.....	143

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	IP	Immunpräzipitation
μ	micro	K	Lysin
A	Adenin, Ampere, Alanin	kb	Kilobasen
Abb.	Abbildung	kDa	Kilodalton
AS	Aminosäure, Angelman-Syndrom	l	Liter
ATP	Adenosintriphosphat	M	Molar
bp	Basenpaare	m	Meter, milli
BSA	Rinderserumalbumin	MEF	Maus-embryonale Fibroblasten
bzw.	beziehungsweise	mg	Milligramm
C	Cytosin, Cystein	min	Minute(n)
c	centi	ml	Milliliter
ca.	circa	mM	Millimolar
cDNA	complementary DNA	mu	murin
Da	Dalton	NTA	Nitrilotriacetic Acid
DMSO	Dimethylsulfoxid	OD	optische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat	PBS	phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol	PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	PVDF	Polyvinyliden Fluorid
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym	RNA	Ribonukleinsäure
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym	rpm	rounds per minute
E3	Ubiquitin-Protein-Ligase	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop
F	Farad	SDS	Natriumdodecylsulfat
FCS	Fetal calf serum	siRNA	small interfering RNA
G	Guanin, Glycin	T	Thymin
g	Erdbeschleunigung	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
GSH	Glutathion (reduzierte Form)	U	Uracil
GST	Glutathion-S-Transferase	Ub	Ubiquitin
h	Stunde(n)	UV	Ultraviolett
HA	Hemagglutinin-epitop	V	Volt
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure	vgl.	vergleiche
hu	human	WB	Westernblot
IgG	Immunglobulin	w/v	Gewicht pro Volumen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

In Zellen werden Proteine in ihrer Quantität, Aktivität und Lokalisation reguliert. Eine bedeutende Rolle spielen dabei posttranslationale Modifikationen. Beispiele hierfür sind Phosphorylierung, Methylierung, Glykosylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung. Ubiquitin ist das erste Protein, für das gezeigt wurde, dass es ein anderes Protein kovalent modifizieren kann.

1.1 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein eukaryotisches, evolutionär hochkonserviertes, globuläres, 76 Aminosäuren umfassendes Protein (Abb. 1) (Vijay-Kumar et al., 1987). Die Aminosäuresequenzen von Hefe und Mensch unterscheiden sich in nur drei Aminosäuren. Die meisten Eukaryoten besitzen zwei verschiedene Ubiquitin-Gentypen mit einer, je nach Organismus, unterschiedlichen Kopienanzahl. Der eine Gentyp kodiert für ein Polyubiquitin-Protein, bestehend aus einer Aneinanderreihung mehrerer Ubiquitinsequenzen. Der andere Gentyp kodiert für ein Fusionsprotein aus Ubiquitin und einem ribosomalen Protein. Nach der Translation prozessieren spezifische Ubiquitin-Hydrolasen die Vorläuferproteine (Finley et al., 1989; Ozkaynak et al., 1984). Dabei entsteht freies Ubiquitin mit seinem exponierten C-Terminus (Vijay-Kumar et al., 1987). Das endständige Glycin (Gly-76) ist essentiell für die Konjugation des Ubiquitins.

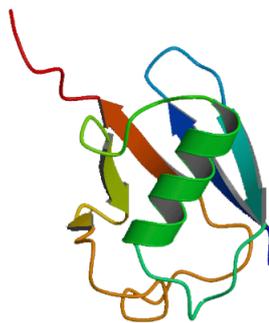


Abb. 1: Dreidimensionale Struktur von Ubiquitin

Ubiquitin besteht aus 5 β -Faltblättern (Pfeile) und einer α -Helix. Der exponierte C-Terminus ist rot dargestellt (entnommen und verändert nach <http://chaos.fccc.edu/research/labs/roder/rodproj.html>).

1.2 Das Ubiquitin-Konjugationssystem

Die Ubiquitin-Konjugation, auch Ubiquitinierung oder Ubiquitylierung genannt, ist ein mehrstufiger, enzymatisch katalysierter Prozess, bei dem Ubiquitin an ein Zielprotein gekoppelt wird. Dabei entsteht eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und einer ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes auf dem Zielprotein.

Die Reaktion wird von einer Kaskade aus mindestens drei Enzymen katalysiert (Abb. 2). Im ersten Schritt aktiviert das Ubiquitin-aktivierende Enzym, auch als UBA oder E1 bezeichnet, Ubiquitin in einem ATP-abhängigen Prozess und bildet anschließend einen Thioester zwischen der Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins von Ubiquitin und seinem katalytischen Cysteinrest. Im zweiten Schritt überträgt E1, ebenfalls unter Bildung eines Thioesters, das Ubiquitin auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (UBC oder E2). Im letzten Schritt der Kaskade wird unter Katalyse einer Ubiquitin-Ligase (oder E3) das Ubiquitin vom E2 auf das Substratprotein transferiert, wobei eine Isopeptidbindung entsteht (Übersicht: Passmore und Barford, 2004; Pickart, 2001; Pickart, 2004; Weissman, 2001).

Ubiquitin kann nun selbst als Substrat der Ubiquitin-Konjugation dienen, was zur Bildung von Ubiquitinketten führt. An der Ausbildung der Ubiquitinkette ist möglicherweise eine vierte Enzymgruppe, die als E4 bezeichnet wird, beteiligt (Hoppe, 2005).

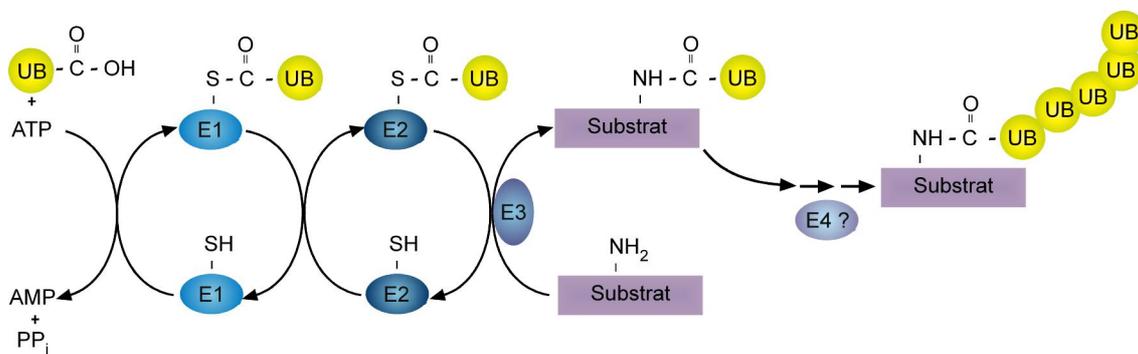


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ubiquitin-Konjugation

Freies Ubiquitin wird im ersten Schritt ATP-abhängig unter Bildung einer Thioesterbindung zwischen E1 und dem C-Terminus von Ubiquitin aktiviert. Im zweiten Schritt wird das Ubiquitin auf ein E2 übertragen, ebenfalls unter Bildung eines Thioesters. E3s katalysieren schließlich unter Bildung einer Isopeptidbindung die Übertragung des Ubiquitins auf ein Substrat. Für die Ausbildung von Ubiquitinketten können zusätzliche Faktoren (E4) notwendig sein.

1.2.1 Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1)

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist ein einziges E1 für alle Ubiquitinierungsreaktionen in eukaryotischen Zellen verantwortlich. Im E1-Gen führen zwei alternative Translationsstarts zu zwei Isoformen (Handley-Gearhart et al., 1994). Die kürzere Form ist überwiegend im Cytosol lokalisiert. Die längere Form ist im Kern zu finden. Seine Lokalisation ist abhängig vom Zellzyklus und einer Modifikation durch Phosphorylierung (Grenfell et al., 1994; Stephen et al., 1997).

Für die Ubiquitin-aktivierende Reaktion bindet das E1 Mg^{2+} -koordiniertes ATP und freies Ubiquitin. Es katalysiert die Bildung einer Ubiquitin-Adenylat-Zwischenstufe unter Abspaltung von Pyrophosphat. Der aktivierte C-Terminus von Ubiquitin wird schließlich unter Bildung eines Thioesters auf das katalytisch aktive Cystein des E1s übertragen. Um seine vollständige Aktivität zu erreichen, müssen zwei Ubiquitinmoleküle, eines kovalent als Thioester und das andere nicht kovalent als Adenylat, gebunden vorliegen. Das als Thioester gebundene Ubiquitin wird zum nächsten Enzym der Kaskade, dem E2, transferiert.

Somit hat E1 drei verschiedene Funktionen: Adenylat- und Thioesterbildung sowie die Bindung des E2-Enzyms (Haas und Rose, 1982; Haas et al., 1982; Pickart, 2001).

1.2.2 Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2)

Freies E2 bindet mit hoher Affinität an beladenes E1 und übernimmt das Ubiquitin unter Bildung eines Thioesters (Hershko et al., 1983; Miura et al., 1999). Die E2-Proteine katalysieren die Ubiquitinierung des Substrats meist in Konjugation mit einer Ubiquitin-Protein-Ligase (E3, vgl. 1.2.3). Die Überlappung der Bindebereiche von E1 und E3 auf dem E2 schließt ihre gleichzeitige Bindung aus (Eletr et al., 2005).

Das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* kodiert für 11 verschiedene E2s. Das humane Genom-Projekt zeigt über 40 E2s. Charakteristisch ist allen E2 eine 14-16 kDa große Domäne. Diese sogenannte UBC-Domäne enthält auch das katalytische Cystein, an welches das Ubiquitin bindet. Einige E2s haben N- oder C-terminale Verlängerungen, andere bestehen ausschließlich aus dieser Domäne (Jensen et al., 1995). Manche E2s scheinen eine eher allgemeine Funktion zu haben. So sind z. B. Ubc4 und Ubc5 aus *S. cerevisiae* und ihre humanen Homologe UbcH5 und UbcH7 für den Abbau von vielen kurzlebigen oder abnormen Proteinen verantwortlich (Seufert und Jentsch, 1990). Andere

wiederum scheinen spezifischere Funktionen auszuüben (Cenci et al., 1997; Schule et al., 2000). Ob E2s auch an der Substraterkennung beteiligt sind, ist unklar. Es konnte bisher nur die Bindung von E2-25k an Huntingtin belegt werden (Kalchman et al., 1996). So wird heute davon ausgegangen, dass die Substratspezifität durch die spezifische Interaktion von E2 an E3 vermittelt wird, wobei die Substraterkennung aber vom E3 ausgeht. Einige E2s können mit verschiedenen E3s interagieren. Beispielsweise bindet UbcH7 an E3-Enzyme aus zwei unterschiedlichen Proteinfamilien: an HECT-Domänen E3s und an RING-Domänen E3s (vgl. 1.5) (Huang et al., 1999; Zheng et al., 2000). Umgekehrt kann ein E3 an verschiedene E2s binden. Ein Beispiel ist die E3 Ligase E6-AP (vgl. 1.8). Die Ubiquitinierung von Proteinen durch E6-AP kann durch UbcH5 (Rolfe et al., 1995; Scheffner et al., 1994), den sehr ähnlichen UbcH5b, UbcH5c (Jensen et al., 1995) und den ferner verwandten UbcH7 (Nuber et al., 1996) oder UbcH8 (Kumar et al., 1997) vermittelt werden. Im „Two Hybrid“-Bindeassay konnte allerdings nur die Interaktion mit UbcH7 und UbcH8, nicht aber mit UbcH5 nachgewiesen werden (Kumar et al., 1997). Es konnte jedoch eine Interaktion mit UbcH5b in *in vitro* Bindungsstudien gezeigt werden (Hatakeyama et al., 1997). Es ist unklar, ob diese Ergebnisse darauf beruhen, dass die verschiedenen E2s mit einer unterschiedlichen Affinität an E6-AP binden. Ebenso wenig ist bekannt, welches die physiologisch relevanten E2s für E6-AP sind.

1.2.3 Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3)

Ubiquitin-Ligasen sind Proteine oder Proteinkomplexe, welche sowohl E2s als auch Substrate binden. Die allgemeine Aufgabe von Ubiquitin-Ligasen besteht darin, das aktivierte Ubiquitin in die räumliche Nähe der Lysinreste auf dem Substratprotein zu bringen. Viele E3s können sowohl die Übertragung des Ubiquitins auf den Lysinrest des Substrats als auch die weitere Verknüpfung von Ubiquitinmolekülen katalysieren. Die E3s bilden die größte Gruppe und sind die am wenigsten definierte Komponente der Kaskade. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Substraterkennung und vermitteln die Spezifität in der Ubiquitinierung (Übersicht: Passmore und Barford, 2004; Pickart, 2001; Robinson und Ardley, 2004). Die E3s können mechanistisch und strukturell in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Die eine Gruppe besitzt eine HECT-Domäne (Homolog zum E6-AP-Carboxyl-Terminus), die andere weist ein als RING-Finger (Really Interesting New Gene) bezeichnetes Sequenzmotiv auf (Borden und Freemont, 1996; Huibregtse et al., 1995).

Der Unterschied zwischen HECT-E3-Ubiquitin-Ligasen und RING-E3-Ubiquitin-Ligasen besteht darin, dass die HECT-Domäne das Ubiquitin vom E2 übernimmt und ein Thioesterintermediat bildet, während den RING-Finger-Proteinen eine Aufgabe als Adapter zugesprochen wird, welcher räumliche Nähe zwischen E2 und Substrat vermittelt (vgl. 1.5.1 und 1.5.2).

1.2.4 Ubiquitinketten-Verlängerungsfaktoren (E4)

In den meisten Fällen scheinen für Polyubiquitinierung E1, E2 und E3 auszureichen. Teilweise können aber zusätzliche Faktoren notwendig sein (Koepl et al., 1999). Als E4-Faktoren werden Proteine bezeichnet, die in Zusammenarbeit mit den drei Enzymen der Ubiquitinierungskaskade die Verlängerung einer Kette katalysieren.

Die als erstes identifizierten Mitglieder der E4-Familie sind durch eine konservierte C-terminale U-Box charakterisiert. Das erste beschriebene E4 war UFD2 (ubiquitin fusion degradation) aus *S. cerevisiae* (Koepl et al., 1999). Die physiologische Relevanz der E4-Funktion von UFD2 konnte anhand von Daten über den Transkriptionsfaktor SPT23 bestätigt werden (Richly et al., 2005). Auch für das Säuger Homolog UFD2a konnte E4-Aktivität *in vivo* nachgewiesen werden (Matsumoto et al., 2004). Allerdings konnte für UFD2a und andere U-Box-Proteine, wenn auch nur in *in vitro* Studien, eine E3-Aktivität, vergleichbar mit der Aktivität von RING-E3-Ligasen, gezeigt werden. Im Fall der UFD2a-abhängigen Polyubiquitinierung ist jedoch ein zusätzliches E3 notwendig (Matsumoto et al., 2004). Somit könnte ein E4 auch ein spezialisiertes E3 darstellen, welches die Kettenverlängerung von Mono- oder kurzen Polyubiquitinketten katalysiert. Ein weiteres Beispiel dafür wäre das U-Box enthaltende Protein Chip. Nur in Anwesenheit von Chip kann die E3-RING-Ligase Parkin effizient sein Substrat polyubiquitinieren (Imai et al., 2002). Als ein Beispiel für einen E4-Faktor, welcher keine U-Box besitzt, wird p300 beschrieben. p300 kann p53 nur dann ubiquitinieren, wenn dieses bereits monoubiquitiniert vorliegt (Grossman et al., 2003, Übersicht: Hoppe, 2005). Ob es sich jedoch bei den oben beschriebenen Proteinen um eine neue Enzymklasse handelt, ist zur Zeit noch unklar.

1.3 Ubiquitinketten

Die oben genannten Enzyme der Ubiquitinierungskaskade katalysieren alle bekannten Ubiquitinierungsreaktionen. Dabei kann es sich um Mono-, Multi- oder Polyubiquitinierung handeln. Bei Monoubiquitinierung wird nur ein Ubiquitinmolekül an das Substrat gehängt. Multiubiquitinierung bezeichnet die Anheftung von zahlreichen Ubiquitinmolekülen an mehrere Lysinreste auf dem Substrat. Unter Polyubiquitinierung wird die kettenartige Verknüpfung von mehreren Ubiquitinmolekülen an einen einzelnen Lysinrest verstanden (Wilkinson, 1995).

In einer Polyubiquitinkette wird das C-terminale Glycin des Ubiquitins mit einer ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Ubiquitin verknüpft. Ubiquitin hat sieben Lysinreste (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63; Abb. 3). Proteomanalysen in *S. cerevisiae* zeigten, dass alle sieben Lysine für eine weitere Verknüpfung über eine Isopeptidbindung benutzt werden können (Peng et al., 2003). (Übersicht: Pickart, 2000; Pickart und Fushman, 2004)

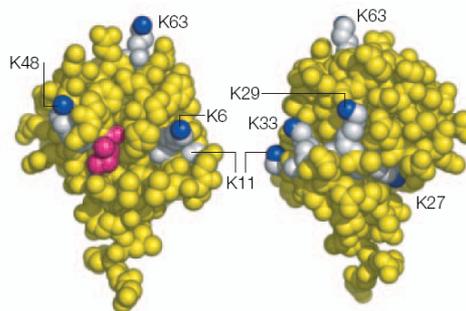


Abb. 3: Darstellung der Lysine im Ubiquitin

Ubiquitin hat sieben Lysine, welche alle für die Kettenverknüpfung verwendet werden können. Es sind zwei gegenüberliegende Seiten eines Ubiquitinmoleküls gezeigt. Die Lysine (K) sind in hellblau dargestellt und die ϵ -Aminogruppe in dunkelblau (entnommen aus Hicke et al., 2005).

1.3.1 Lysin 48-verknüpfte Ketten

Die am besten verstandene Funktion von Ubiquitinketten ist, dass sie als Signal für den Abbau im 26S Proteasom dienen können. Als Abbausignal muss die Ubiquitinkette mindestens vier Ubiquitinmoleküle umfassen (Thrower et al., 2000). Das 26S Proteasom ist eine ca. 2,5 MDa große, multikatalytische, ATP-abhängige Protease, die polyubiquitinierte Proteine zu kleinen Peptiden abbaut. Es besteht aus zwei Subkomplexen, dem zylindrischen aus vier übereinander gelegenen Ringen, die je sieben Untereinheiten enthalten, zusammengesetzten 20S Kernpartikel, sowie einem 19S

regulatorischen Partikel, der an die Enden des 20S Kernpartikels bindet (Übersicht: Glickman und Ciechanover, 2002).

Bekannte Substrate des Proteasoms sind u. a. falsch gefaltete oder fehlerhafte Proteine, Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren und Tumorsuppressoren, die für den Abbau mit einer Lysin 48-Ubiquitinkette markiert werden. Lysin 48-verknüpfte Ubiquitinketten stellen das Haupt-Abbausignal dar (Finley et al., 1994). Sie werden von den regulatorischen 19S-Partikeln des 26S Proteasom erkannt. Die Kette wird abgespalten und das Ubiquitin recycelt. Das abzubauenende Protein wird unter ATP-Verbrauch entfaltet und in den proteolytisch aktiven 20S-Komplex geschleust, wo es zu kleinen Peptiden zerlegt wird (Glickman und Ciechanover, 2002; Miller und Gordon, 2005). Der gesamte Vorgang wird auch als Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg bezeichnet.

1.3.2 Lysin 63-verknüpfte Ketten

Über Lysin 63- (K63) verknüpfte Ubiquitinketten werden vermutlich nicht vom Proteasom als Abbausignal erkannt. Sie stehen im Zusammenhang mit zellulärer Stressantwort (Arnason und Ellison, 1994), postreplikativer DNA-Reparatur (Hofmann und Pickart, 1999; Spence et al., 1995), ribosomalen Funktionen (Spence et al., 2000), Vererbung von mitochondrialer DNA (Fisk und Yaffe, 1999), Signaltransduktion (Deng et al., 2000; Wang et al., 2001) und der Endozytose von einigen Plasmamembranproteinen (Galan und Hagenauer-Tsapis, 1997).

Diubiquitin, welches über eine K63-Isopeptidbindung verbunden ist, hat eine gestrecktere Konformation als über K48-verknüpftes Diubiquitin (Varadan et al., 2004). Dieser strukturelle Unterschied könnte erklären, warum verschiedene Kettenformationen zu unterschiedlichen Funktionen führen.

1.3.3 Lysin 6-, 11- und 29-verknüpfte Ketten

Ubiquitinmoleküle können auch über das Lysin 29 verknüpft werden (Johnson et al., 1995; You und Pickart, 2001). Diese Kettenformation wird, wie die K48-Ketten, vom Proteasom als Abbausignal erkannt. Eine kurze Kette von Lysin 29-verknüpften Ubiquitinen ist als ein Signal für die Rekrutierung von E4-Faktoren mit nachfolgend vermittelter proteasomaler Proteolyse beschrieben worden (Koepl et al., 1999).

K6- und K11-verknüpfte Ubiquitinketten können *in vitro* an das Proteasom binden. Ob sie ihre Substrate auch zum Abbau führen, ist dagegen nicht geklärt (Baboshina und Haas, 1996; Glickman und Ciechanover, 2002). Von K6-verlinkten Ubiquitinketten wird weiterhin angenommen, dass sie eine Funktion in der DNA-Reparatur haben (Morris und Solomon, 2004; Pickart und Fushman, 2004).

1.3.4 Monoubiquitinierung

Die Konjugation eines einzelnen Ubiquitinmoleküls an ein Substrat wird als Monoubiquitinierung bezeichnet. Es ist eine regulatorische Modifikation, die in einer Reihe von zellulären Prozessen involviert ist, wie z. B. Transkription, Histonregulation und Endozytose (Übersicht: Hicke, 2001; Hicke und Dunn, 2003; Muratani und Tansey, 2003).

1.4 Deubiquitinierende Enzyme

Die Ubiquitinierung ist ein reversibler Prozess. Die Umkehrreaktion (Deubiquitinierung) wird von einer Familie von Proteasen übernommen, die unter der Bezeichnung Deubiquitinierende Enzyme (DUBs) zusammengefasst werden (Übersicht: Amerik und Hochstrasser, 2004; Nijman et al., 2005). Die geschätzte Anzahl der exprimierten und putativ funktionellen DUBs im humanen Genom beträgt derzeit 79 (Nijman et al., 2005). Die DUBs spielen eine Rolle in der Erzeugung (vgl. 1.1 Ubiquitin wird als Fusionsprotein translatiert) und im Recycling des Ubiquitins, ebenso wie in der Prozessierung von Polyubiquitinketten. Sie können Polyubiquitinketten verkürzen oder auch vom Substrat entfernen.

Fast alle DUBs sind Cystein-Proteasen. Aufgrund von Sequenzähnlichkeit oder des angenommenen Deubiquitinierungsmechanismus werden sie in wenigstens 4 Untergruppen untergliedert: Ubiquitin-Carboxy-terminale-Hydrolasen (UCH), Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBP), Otubain-Proteasen (OTU) und Machado-Joseph-Disease-Proteasen (MJD).

Auch wenn die UCHs zu den ersten beschriebenen DUBs gehören, ist ihre spezifische Funktion noch nicht verstanden. Es wird angenommen, dass sie hauptsächlich am Recycling von Ubiquitin beteiligt sind, aber auch neu synthetisiertes Ubiquitin prozessieren können. Die UBPs stellen eine weitaus größere Enzymgruppe als die UCHs

dar und spalten Ubiquitin-Ubiquitin-Verknüpfungen als auch Ubiquitin-Substrat-Bindungen. Für die anderen beiden DUBs-Gruppen konnte bisher nur *in vitro* eine deubiquitinierende Aktivität nachgewiesen werden (Balakirev et al., 2003; Burnett et al., 2003).

1.5 Ubiquitin-Protein-Ligasen

1.5.1 HECT-Ligasen

HECT-Domänen-Proteine besitzen eine 350 Aminosäuren lange C-terminale Sequenz mit einem konservierten, katalytisch aktiven Cysteinrest (Huibregtse et al., 1995; Scheffner et al., 1995). Der Name HECT bedeutet Homolog zum C-Terminus von E6-AP und weist damit auf das erste identifizierte Mitglied dieser Proteinfamilie hin, dem E6-assoziierten Protein E6-AP (vgl. zu E6-AP 1.8). Die HECT-Ligasen interagieren bevorzugt mit den E2s UbcH5, UbcH7 und UbcH8 über die HECT-Domäne und bilden ein Thioesterintermediat mit Ubiquitin (Kumar et al., 1997; Schwarz et al., 1998). Der N-Terminus der HECT-Proteine ist variabel und bindet die Substrate (Huibregtse et al., 1997; Kumar et al., 1999; Qiu et al., 2000). Jedoch sind die HECT-Domänen verschiedener Proteine nicht austauschbar (Schwarz et al., 1998).

Anhand von weiteren bekannten Proteinmotiven im N-Terminus, können HECT-Proteine in Untergruppen eingeteilt werden.

1.5.1.1 Nedd4-ähnliche HECT-Ligasen

Die Nedd4-ähnlichen HECT-Ligasen besitzen neben der C-terminalen HECT-Domäne im N-terminalen Bereich eine C2-Domäne und mehrere WW-Domänen. Die WW-Domäne besteht aus ca. 35 Aminosäuren und enthält im Abstand von 20-22 Aminosäuren zwei konservierte Tryptophanreste, durch die der Name der Domäne entstanden ist. Jedes Mitglied der Nedd-ähnlichen HECT-Ligasen besitzt wenigstens eine WW-Domäne, die meisten aber drei bis vier, welche Substraterkennungsadaptoren formen (Übersicht: Macias et al., 2002).

Die C2-Domäne ist eine 120 Aminosäuren lange Ca^{2+} -abhängige Phospholipidbindedomäne mit der Proteine an die Plasmamembran binden können (Übersicht: Rizo und Sudhof, 1998). Das am besten charakterisierte Mitglied der Gruppe

ist das essentielle *S. cerevisiae* Protein Rsp5. Es erkennt eine Reihe von Plasmamembranpermeasen oder -rezeptoren als Substrat und führt diese durch Ubiquitinierung zur Endozytose. Ein anderes, lösliches Substrat ist Rpb1, die große Untereinheit der RNA-Polymerase II. Die Ubiquitinierung durch Rsp5 führt hier jedoch zum Abbau durch das Proteasom (Beaudenon et al., 1999). Ein weiteres Beispiel für die vielfältige Wirkung, welche die Ubiquitinierung von Rsp5 haben kann, ist die Ubiquitinierung der Vorläuferformen der Transkriptionsfaktoren Spt23 und Mga2. Hierbei führt die Ubiquitinierung zur limitierten Prozessierung der Vorläuferproteine, wobei aktive Transkriptionsfaktoren entstehen (Hoppe et al., 2000). In *S. cerevisiae* ist Rsp5 der alleinige Vertreter der Familie der Nedd4-ähnlichen Ligasen. Andere Eukaryoten haben mehrere Vertreter dieser Familie. In Säugern sind Nedd4-Proteine z. B. für die Regulierung des Natriumkanals in Epithelienzellen verantwortlich (Übersicht: Ingham et al., 2004).

1.5.1.2 Herc-Proteine

Eine andere Unterfamilie der HECT-Ligasen besitzt eine oder mehrere RCC1-ähnliche Domänen und wird als Herc bezeichnet (HECT und RCC1). RCC1-ähnliche Domänen zeigen eine Ähnlichkeit zur Sequenz des RCC1-Proteins (regulator of chromosome condensation-1). RCC1-ähnliche Domänen bestehen aus ca. 400 Aminosäuren und zeichnen sich durch die 7-fache Wiederholung eines 51-68 großen Aminosäuresequenzmotivs aus. Die dreidimensionale Struktur zeigt einen 7-fach gefächerten Propeller (Renault et al., 2001; Renault et al., 1998). Das erste und am besten charakterisierte Protein mit einer solchen Domäne war das Protein RCC1 selbst. RCC1 wurde als ein Genprodukt des Hamsters identifiziert, dessen Funktion es ist, die Chromosomenkondensation zu verhindern, bevor die DNA-Replikation vollendet ist (Ohtsubo et al., 1987). Weitere Studien zeigten, dass RCC1 mit dem kleinen GTP-Bindeprotein Ran interagiert und dessen Guaninnukleotidaustausch katalysiert (Bischoff und Ponstingl, 1991a; Bischoff und Ponstingl, 1991b). Die eine Seite der Propellerstruktur von RCC1 bindet an Ran und fungiert als GEF (guanine nucleotide exchange factor), während die gegenüberliegende Seite mit den Histonen H2A und H2B assoziiert und so mit dem Chromatin verknüpft vorliegt (Nemergut et al., 2001; Renault et al., 2001). Zunächst wurde angenommen, dass auch andere RCC1-ähnliche Domänen GEF-Aktivität besitzen, was auch z. B. für Herc1 demonstriert wurde (Rosa et al., 1996). Jedoch stellte

sich kürzlich heraus, dass die angenommene GEF-Aktivität von Herc1 auf der Bindung der RCC1-ähnlichen Domäne an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat beruht und Herc1 eher die Funktion eines GRF (guanine release factor) als die eines GEF inne hat (Garcia-Gonzalo et al., 2005). Neben RCC1 und Herc1 wurde von zwei weiteren Proteinen, die RCC1-ähnliche Domänen enthalten, PRAF aus *Aradopsis thaliana* und dem *Drosophila* Protein Claret, behauptet, dass sie GEF-Aktivität besitzen (Jensen et al., 2001; Ma et al., 2004). Auch hier fehlt allerdings die Bestätigung anhand mehrerer Kriterien. So wurde z. B. im Falle von Claret nur die bevorzugte Bindung an die GDP-gebundene Form von Rab32/38 gezeigt.

Die heutigen Daten weisen darauf hin, dass RCC1-ähnliche Domänen zwar strukturell konserviert sind, aber funktionell vielfältig sein können, d. h. sowohl mit anderen Proteinen oder Phospholipiden interagieren als auch in einigen Fällen GEF-Aktivität für kleine GTPasen besitzen können.

Es gibt 6 humane Herc-Proteine, die wiederum hauptsächlich aufgrund ihrer Größe in zwei Gruppen unterteilt werden können: die großen und die kleinen Hercs (Abb. 4).

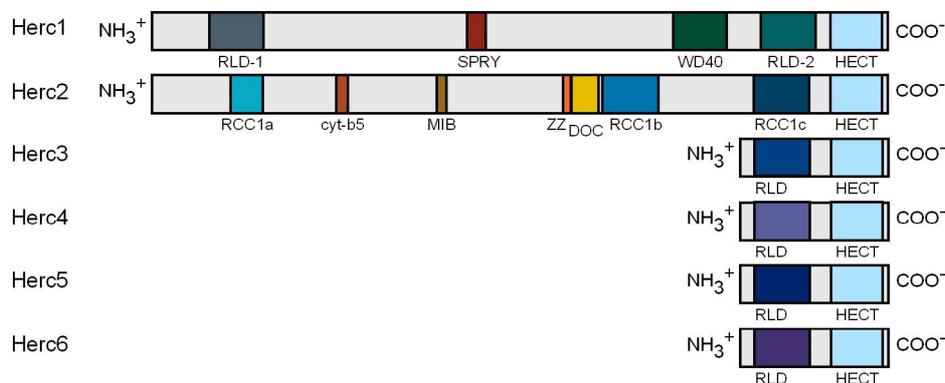


Abb. 4: Schematische Übersicht über die Mitglieder der Herc-Familie

Die Herc-Proteine erhielten ihren Namen, aufgrund der Tatsache, dass sie sowohl eine HECT als auch eine RCC1-ähnliche Domäne aufweisen. Die Familie wird aufgrund der Größe der Proteine in zwei Gruppen untergliedert. Die großen Herc-Proteine (1 und 2) weisen noch weitere konservierte Proteinmotive auf.

RLD, RCC1-like domain; die RLDs von Herc2 werden aufgrund der Erstbezeichnung von Lehman et al., 1998 in dieser Arbeit weiterhin mit RCC1a, b und c beschrieben; SPRY, spl A und RyR (Ponting et al., 1997); WD40, G-Protein β -Untereinheit ähnliche Domäne (Sondek et al., 1996); HECT, Homolog zum C-Terminus von E6-AP (Huibregtse et al., 1995); cyt-b5, Cytochrom b5-ähnliche Domäne (Mifsud und Bateman, 2002); MIB, Mind bomb-Herc2-Domäne (Itoh et al., 2003); ZZ, ZZ-Typ Zinkfinger (Ponting et al., 1996); DOC, DOC1/APC10-Domäne (Grossberger et al., 1999).

Herc1 und Herc2 sind große Proteine mit über 500 kDa, Herc3 bis 6 dagegen haben eine molekulare Masse von ca. 120 kDa. Herc3, 4, 5 und 6 besitzen eine RCC1-ähnliche Domäne sowie eine HECT-Domäne. Herc1 hat zwei und Herc2 hat drei RCC1-ähnliche Domänen. Beide besitzen neben der HECT-Domäne noch weitere Proteindomänen.

So besitzt Herc1 ein WD40-Motiv, eine SPRY-Domäne und noch weitere kleinere Motive, wie z. B. SH3-Sequenzen. Herc1 ist im Cytoplasma von Zellen zu finden, entweder als lösliches Protein oder an vesikuläre Membranen oder den Golgi-Apparat gebunden (Rosa et al., 1996). Mit der ersten RCC1-ähnlichen Domäne kann Herc1 als ein GRF der kleinen GTPasen aus der ARF- und Rab-Familie agieren, wobei PI(4,5)P₂ an diese Domäne gebunden sein muss (Garcia-Gonzalo et al., 2005). Die zweite RCC1-ähnliche Domäne (RLD2, RCC1 like domain) kann dagegen ARF und die schwere Kette von Clathrin, in einem ATP-abhängigen ternären Komplex mit Hsp70, binden (Rosa und Barbacid, 1997; Rosa et al., 1996). Die HECT-Domäne von Herc1 kann Ubiquitin als Thioester (Schwarz et al., 1998) sowie das glykolytische Isoenzym Pyruvatkinase M2 binden (Garcia-Gonzalo et al., 2003).

Mit Herc2 wurden bisher dagegen keine Arbeiten auf Proteinebene durchgeführt. Es enthält neben der HECT-Domäne und den drei bereits erwähnten RCC1-ähnlichen Domänen noch weitere konservierte Regionen, die unter 1.9 näher beschrieben werden.

Herc3 bildet einen Thioester mit Ubiquitin und ist ein Ubiquitinierungssubstrat, welches im Proteasom abgebaut werden kann (Cruz et al., 2001; Schwarz et al., 1998).

Herc4 zeigt, wie auch Herc3, Herc5 und Herc6 in der immunocytochemischen Analyse nach Überexpression eine cytoplasmatische, punktierte Färbung, die auf eine Assoziation mit Membranen hinweist (Hochrainer et al., 2005). Weitere Daten zur Funktion von Herc4 liegen nicht vor.

Herc5 wurde zunächst als Ceb1 (cyclin E-binding protein-1) beschrieben (Mitsui et al., 1999) und auch als Herc4 bezeichnet (Garcia-Gonzalo et al., 2003; Garcia-Gonzalo et al., 2004). Herc5 wird eine mögliche Rolle im Ablauf des Zellzyklus zugeschrieben. Es kann mit Cyclin E und anderen Cyclinen interagieren und seine Expression scheint von Tumorsuppressorproteinen, wie p53 oder Rb reguliert zu werden (Mitsui et al., 1999). Auch wurde eine Hochregulation des mRNA-Levels von Herc5 auf pro-inflammatorische Stimulation beobachtet (Kroismayr et al., 2004).

Herc6 wurde erst kürzlich identifiziert (Hochrainer et al., 2005). Wie auch bei Herc4 kann die Vorläufer-RNA von Herc6 gespleißt werden, wodurch verkürzte Proteine entstehen, deren funktionelle Relevanz zur Zeit jedoch ungeklärt ist (Hochrainer et al., 2005).

Bisher konnte für Herc1, 3 und 5 ein Ubiquitintransfer durch die HECT-Domäne demonstriert werden (Cruz et al., 2001; Kroismayr et al., 2004; Schwarz et al., 1998). Substrate der sechs Herc-Proteine sind bisher nicht identifiziert worden. Kürzlich konnte

gezeigt werden, dass Herc5 ebenfalls das Ubiquitin-ähnliche Protein (vgl. 1.7) ISG15 konjugieren kann (Dastur et al., 2006).

1.5.1.3 Andere HECT-Ligasen

Einige HECT-Ligasen haben, außer der HECT-Domäne, keine bekannten oder keine einheitlichen Proteindomänen und werden somit auch keiner Untergruppe zugeordnet. Hierzu zählt z. B. die E3-Ligase EDD (HYD oder auch Rat100), welche eine PABC-Domäne (poly(A)-binding protein C-terminal domain) trägt (Henderson et al., 2002; Honda et al., 2002; Oughtred et al., 2002). Eine andere HECT-Ligase enthält als weiteres Motiv ein WWE (benannt nach den konservierten Aminosäuren) (Aravind, 2001). E6-AP, der Gründer der HECT-Ligasen, besitzt dagegen kein weiteres bekanntes Proteinmotiv (vgl. 1.8).

1.5.2 RING-Finger-Ligasen

Ein RING-Finger (Really Interesting New Gene) ist ein Strukturmotiv, welches durch insgesamt 8 Histidin- oder Cysteinreste in einem bestimmten Abstand zu einander charakterisiert ist. Ein RING-Finger bindet zwei Zinkionen, jedes 4-fach über eine Art Querbrücke koordiniert (Borden, 2000). RING-Finger-Ligasen bilden ein molekulares Gerüst, welches E2-Enzyme binden kann, jedoch kein Thioesterintermediat mit Ubiquitin, wie die HECT-Ligasen. Sie vermitteln wahrscheinlich die Ubiquitin-Übertragung, indem sie E2-Enzym und Substrat in räumliche Nähe zu einander bringen. Dabei werden Polyubiquitinketten, entweder auf einem Substrat oder auf sich selbst, gebildet (Lorick et al., 1999). Einige RING-Finger-Ligasen können allein die Funktion einer E3-Ligase übernehmen, während andere Bestandteil von Proteinkomplexen sind. So werden monomere bzw. homodimere und multimeren RING-Finger-Ligasen unterschieden.

1.5.2.1 Monomere oder homodimere RING-Finger-Ligasen

Die monomeren oder homodimeren RING-Finger-Ligasen enthalten sowohl die RING-Finger-Domäne als auch die Substratbindungs bzw. -erkennungssequenz in einem Molekül.

Beispiele für monomere RING-Finger-Ligasen sind Mdm2 oder c-Cbl. Unter normalen Wachstumsbedingungen ubiquitiniert Mdm2 p53 für den proteasomalen Abbau (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Die Bindestelle für p53 ist im N-terminalen Bereich von Mdm2 gelegen, während sich der RING-Finger am C-Terminus befindet. Zusätzlich kann Mdm2 sich selbst ubiquitinieren und somit seinen eigenen Abbau regulieren (Fang et al., 2000; Honda und Yasuda, 2000). c-Cbl spielt eine Rolle bei der ubiquitinabhängigen Regulierung von Rezeptortyrosinkinasen (Joazeiro und Weissman, 2000; Joazeiro et al., 1999; Waterman et al., 1999). Ein anderes Beispiel ist die IAP-Familie (inhibitor of apoptosis). Ihre Selbstubiquitinierung ist RING-Finger und E2 abhängig und ihr nachfolgender Abbau fördert die Apoptose (Yang et al., 2000). Zu dieser Genfamilie gehören z. B. Livin α und β . Ro52 ist ebenfalls als ein monomerer RING-Finger aktiv und ubiquitiniert sich selbst (Wada und Kamitani, 2006). Die Ubiquitinierung ist aber als nicht zum Abbau führend beschrieben worden (Wada und Kamitani, 2006). Ro52 spielt als Autoantigen in der Autoimmunerkrankung Sjogren's Syndrom eine wesentliche Rolle.

1.5.2.2 Multimere RING-Finger-Ligasen

In den multimeren RING-Finger-Ligasen, z. B. SCF-, APC/C- oder VCB-Komplex, stellt ein kleines RING-Finger-haltiges Protein eine essentielle Komponente dar. Im SCF- und im VCB-Komplex ist dieses das Protein Rbx1 (auch als Hrt1 oder Roc1 bezeichnet) (Kamura et al., 1999). Rbx1 rekrutiert das E2-Enzym und bindet außerdem ein Protein, welches zur Familie der Culline zählt (Cul1 im SCF-Komplex und Cul2 im VCB-Komplex). Das Cullin bindet ein Adapterprotein (Skp1 im SCF-Komplex und Elongin B und C im VCB-Komplex). Das Adapterprotein seinerseits bindet an das substratbindende bzw. -erkennende Protein (ein F-Box-Protein beim SCF-Komplex und pVHL-Protein beim VCB-Komplex) (Tyers und Jorgensen, 2000; Weissman, 2001). Kürzlich wurden auch Cul3-basierende Ligasen gefunden, die als substratspezifische Adaptoren BTB-Proteine binden (Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003).

Bekannte Substrate von SCF-Komplexen sind Signal- und Zellzyklus-regulierte, phosphorylierte Proteine (Deshaies, 1999). Der VCB-E3-Ligase Komplex ubiquitiniert Hypoxie-induzierte Transkriptionsfaktoren für den Abbau im Proteasom (Maxwell et al., 1999).

Ein anderer RING-Finger E3-Komplex ist das APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome). Es besteht aus 13 Untereinheiten. Der Komplex ist am Abbau von

Zellzyklusregulatoren beteiligt (Wasch und Engelbert, 2005). Das dabei benötigte RING-Finger-Protein ist APC11. Anders als bei Rbx1 kann APC11 auch Substrate binden (Leverson et al., 2000). Die Untereinheit APC2 besitzt eine zu den Cullinen homologe Domäne (Yu et al., 1998).

1.6 Ubiquitinierungssignale zur Substraterkennung und Regulation

E1, E2s und das Proteasom sind konstitutiv aktive Enzyme oder werden nur in begrenztem Maße reguliert. Sie sind an der Modifikation einer Vielzahl von Substraten beteiligt. Somit würde sich eine allgemeine Regulation auf die Aktivität vieler Proteine auswirken (Ciechanover et al., 2000).

Die Substratspezifität in der Ubiquitinierung wird von den E3-Enzymen vermittelt. Zur Zeit ist jedoch nicht vollständig geklärt, wie die E3s zum richtigen Zeitpunkt ihre Substrate erkennen. Es gibt nur wenige Beispiele bei denen E3-Erkennungsmotive oder -sequenzen ersichtlich wurden. Allgemein kann eine Substraterkennung vermittelt werden, wenn z. B. das Substrat modifiziert wird, so dass es entweder erkannt wird oder nicht. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass das E3-Enzym oder der E2/E3-Komplex zur Aktivierung modifiziert werden müssen.

So ist eine Modifikation durch Phosphorylierung teilweise notwendig, damit ein Substrat von seinem E3 erkannt wird, oder aber um die Erkennung zu verhindern. Beispiele für Substrate, die nur abgebaut werden, wenn sie phosphoryliert vorliegen, sind G1-Regulatoren, die Cycline D und E sowie die Transkriptionsregulatoren I κ B κ und β -Catenin. Erkannt werden diese phosphorylierten Proteine von SCF-Komplexen (Ciechanover et al., 2000). Dagegen wird der Abbau des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 durch Phosphorylierung verhindert (Dimmeler et al., 1999). Die Aktivität der Ligase ist konstitutiv und der regulierende Schritt ist die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Substrate.

In einigen Fällen wird das Substrat nicht direkt von der Ligase erkannt, sondern erst durch Bindung eines weiteren Faktors. So bindet das phosphorylierte Protein Vpu des HIV-1 Virus an den T-Zell Rezeptor CD4. Zusammen werden sie von einem SCF-Komplex erkannt, aber nur CD4 wird im Folgenden ubiquitiniert und abgebaut (Margottin et al., 1998).

Das erste Ubiquitinierungssignal, welches entdeckt wurde, ist die „destruction box“, die in mitotischen Cyclinen (Glotzer et al., 1991) und in vielen Substraten des APCs gefunden wurde (Page und Hieter, 1999). Proteine, welche die Sequenz R-A/T-A-L-G-X-I/V-G/T-N aufweisen, werden von dem E3-Ligase-Komplex APC erkannt und ubiquitiniert.

Ein weiteres Erkennungsmotiv bezieht sich auf die endständige N-terminale Aminosäure im Substrat, die sogenannte „N-end-Regel“ (Varshavsky et al., 2000). Das E3 E3 α /Ubr1 hat zwei „N-end-Regel“-Erkennungsstellen für den N-Terminus eines Proteins mit „destabilisierenden“ Aminosäuren (F, L, W, T, I, R, K, H) (Kwon et al., 1998; Reiss et al., 1988). Eine Cohesin-Untereinheit beispielsweise wird aufgrund seines am N-Terminus befindlichen Argininrestes abgebaut (Rao et al., 2001).

Für manche E3-Ligasen konnte ebenfalls ein regulierender Mechanismus identifiziert werden. Das E3 Ubr1 wird allosterisch durch die Bindung von Peptiden aktiviert den Transkriptionsfaktor Cup9, einen negativen Regulator des Gens für den Di/Tripeptid-Transporter Ptr1, zum Abau zu markieren. Dabei wird Cup9 von einer dritten Bindestelle auf Ubr1, die keine „destabilisierenden“ N-terminalen Aminosäuren erkennt, gebunden (Turner et al., 2000).

1.7 Ubiquitin-ähnliche Proteine

Es gibt zwei Gruppen von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen. Die eine Gruppe kann, wie Ubiquitin, kovalent an andere Proteine gekoppelt werden. Sie werden als Ubls (Ubiquitin-like) bezeichnet. Die andere Gruppe besteht aus Proteinen, die Domänen mit dem Ubiquitin-Faltungsmotiv im Kontext eines größeren Proteins aufweisen. Man spricht in diesem Zusammenhang von Ubl-Domänen-Proteinen.

1.7.1 Ubl-Proteine

Zur Modifikation von Substraten durchlaufen die Ubls eine dem Ubiquitinsystem ähnliche Kaskade. In vielen Fällen wurden bisher jedoch keine E3-Enzyme gefunden. Modifikationen durch Ubl-Ketten sind mit einer Ausnahme (siehe unten) nicht bekannt.

Die Gruppe der Ubls umfasst ca. 10 Proteine. Nedd8 (neural-precursor-cell-expressed developmentally downregulated protein 8) ist zu 60 % mit Ubiquitin identisch. Es wird, wie Ubiquitin, aus einem Vorläuferprotein synthetisiert, von einem heterodimeren E1 (APPBP1-UBA3) aktiviert und mit Hilfe eines E2s (UBC12) auf Substrate transferiert.

Bekannte Substrate sind vor allem Mitglieder der Cullin-Familie (Hori et al., 1999). In dem multimeren E3-Komplex SCF führt eine Neddylierung von CUL1 zur Aktivierung des Komplexes, da sie die Bindung an einen Inhibitor des SCF-Komplexes verhindert.

Die Aminosäuresequenz von SUMO (small ubiquitin like modifier) ist nur zu ca. 20 % mit der Ubiquitinsequenz identisch. Beim Menschen existieren drei Isoformen. SUMO-2 und -3 besitzen ein zusätzliches „Sumoylation-Motiv“, welches die Bildung einer Poly-SUMO-Kette erlaubt. SUMO-1 dagegen fehlt dieses Motiv und bildet keine Ketten (Tatham et al., 2001). Die zur Zeit am besten belegte Aufgabe von SUMO-1 ist die Modifizierung von RanGAP, eines GTPase aktivierenden Proteins, durch das als E3 für SUMO agierende Protein RanBP2. Die Sumoylierung bewirkt eine Änderung der Lokalisation von der cytoplasmatischen Seite des Zellkerns in den Kernporenkomplex (Matunis et al., 1996). Interessanterweise scheinen Ubiquitin und SUMO in einigen Fällen um die gleichen Lysine im gleichen Substrat zu konkurrieren und gegenteilige Effekte auszulösen (Desterro et al., 1998; Hoege et al., 2002).

Die im Folgenden beschriebenen Ubls ISG15 und FAT10 sind im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen oder der Immunantwort beschrieben worden und bestehen aus je zwei Ubl-Einheiten.

Die Genexpression von ISG15 (interferon-stimulated gene-15) wird durch die Interferone α und β , bakterielle Lipopolysaccharide und virale Infektionen induziert (Haas et al., 1987). Das Protein wird vermutlich im Zuge der angeborenen Immunantwort an Substrate gekoppelt. Bekannte Substrate sind beispielsweise JAK1 (Janus kinase-1) oder STAT1 (signal transducer and activator of transcription-1). Die physiologische Rolle dieser Modifikation ist zur Zeit noch unklar.

FAT10 ist ein Protein, welches ursprünglich als Diubiquitin bezeichnet wurde. Das FAT10-Gen wird sowohl in dendritischen und in reifen B-Zellen exprimiert als auch in einigen humanen Zelllinien nach Behandlung mit IFN- γ und - β (Bates et al., 1997; Raasi et al., 1999). FAT10 konnte konjugiert an Substrate nachgewiesen werden (Raasi et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass FAT10 ubiquitinunabhängig als Abbausignal für das 26S Proteasom dient (Hipp et al., 2005).

Atg8 und Atg12 (autophagy related 8 bzw. 12 homolog), URM1 (ubiquitin-related modifier-1), UBL5 (ubiquitin-like protein-5) sind zu Ubiquitin nicht sequenzverwandt, ihre Strukturen nehmen aber eine ubiquitinähnliche Faltung ein. Sie gehören zur Gruppe

der Ubls, da sie kleine Proteine sind, die aktiviert und konjugiert werden, wie Ubiquitin (Übersicht: Welchman et al., 2005).

1.7.2 Ubl-Domänen-Proteine

Die Ubl-Domäne ist typischerweise ein am oder nahe des N-Terminus eines Protein gelegenes, dem Ubiquitin ähnliches Strukturmotiv. Diese Domänen enden nicht, wie Ubiquitin, mit den Aminosäuren Glycin und werden daher nicht prozessiert oder an andere Proteine konjugiert. Dennoch sind die meisten Proteine, die eine Ubl-Domäne aufweisen, mit dem Ubiquitinstoffwechselweg verknüpft. So binden z. B. die Ubl-Proteine HHR23A/B und hPlic1/2 ans Proteasom (Hiyama et al., 1999; Kleijnen et al., 2000). Weitere Beispiele für diese Gruppe sind Parkin, eine E3-RING-Finger-Ligase, welche eine Ubl-Domäne enthält sowie Ubp6, ein Ubl-Domänen-haltiges DUB.

1.8 E6-AP

Wie bereits unter 1.5.1 beschrieben, ist E6-AP das erste identifizierte Mitglied der Familie der HECT-Ligasen (Huibregtse et al., 1995). Ursprünglich wurde E6-AP als zellulärer Bindungspartner des viralen E6-Onkoproteins, welches nach Infektion mit humanen „high risk“ Papillomviren (HPVs) in infizierten Zellen exprimiert wird, gefunden (Huibregtse et al., 1991; Huibregtse et al., 1993a). Daraufhin erhielt es seinen Namen als E6-assoziiertes Protein (E6-AP). Der Name „high risk“ HPV beruht darauf, dass nur einige HPV Typen (wie z. B. HPV 16 oder 18) mit bösartigen Läsionen, vor allem Gebärmutterhalskrebs, assoziiert sind. Für das E6-Onkoprotein war bereits zuvor eine Bindung an den Tumorsuppressor p53 gezeigt worden sowie ein dadurch stimulierter Abbau von p53 im Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselweg (Scheffner et al., 1990). Nach der Entdeckung von E6-AP konnte gezeigt werden, dass der Komplex von E6 und E6-AP eine für p53 spezifische E3-Ligase darstellt (Scheffner et al., 1993) (Abb. 5).

In normalen Zellen (HPV negativ) hingegen ist E6-AP nicht an der Regulation von p53 beteiligt (Beer-Romero et al., 1997; Hengstermann et al., 2001; Talis et al., 1998).

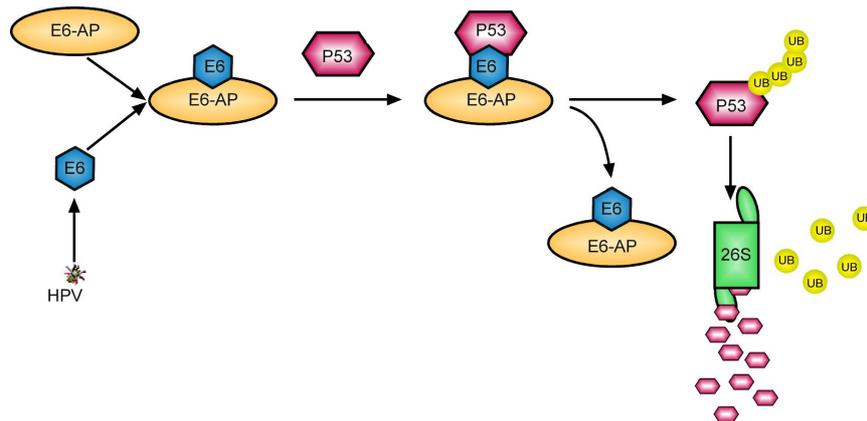


Abb. 5: Model der E6/E6-AP vermittelten Ubiquitinierung sowie Abbau von p53 in HPV positiven Zellen.
 E6-AP formt einen stabilen Komplex mit dem „high risk“ E6-Onkoprotein des HPVs. Der dimere Komplex bindet p53 und induziert in Anwesenheit von E1, E2 und Ubiquitin die Ubiquitinierung von p53. Im Folgenden wird ubiquitiniertes p53 vom 26S Proteasom abgebaut.

In weiteren Untersuchungen wurden die funktionellen Domänen von E6-AP bestimmt, welche für den E6 vermittelten Abbau von p53 ausreichend sind (Abb. 6). Zur Bindung von E6 an E6-AP ist ein Bereich von nur 18 Aminosäuren (AS 377-396) ausreichend. Für die zusätzliche Bindung von p53 ist jedoch ein größerer Bereich auf E6-AP notwendig (AS 266-768). Der Bereich, der für eine E6-abhängige Ubiquitinierung von p53 ausreichend ist, umfasst die Aminosäuren 266-852 auf E6-AP. Dies schließt die gesamte HECT-Domäne mit dem katalytischen Cysteinrest ein (Huibregtse et al., 1993b).

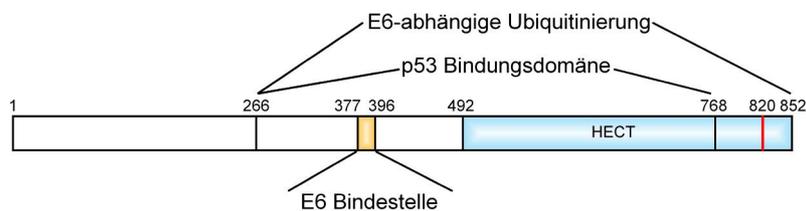


Abb. 6: Schematische Darstellung der funktionellen Regionen auf E6-AP
 Durch Mutationsanalysen wurde der Bereich auf E6-AP an den das E6-Onkoprotein bindet auf die Aminosäuren 377-396 eingegrenzt (orange). Die beiden Regionen, die eine Bindung von p53 sowie die E6-abhängige Ubiquitinierung vermitteln, sind angegeben (Huibregtse et al., 1993b). Die HECT-Domäne ist in blau dargestellt und der katalytische Cysteinrest (820) durch einen roten Strich markiert. Die angegebenen Aminosäuren beziehen sich auf die Isoform I von E6-AP (Yamamoto et al., 1997).

Außer p53 können durch E6 noch andere Proteine in Abhängigkeit von E6-AP abgebaut werden. Dazu gehören beispielsweise das Protein hScrib (humanes Homolog des *Drosophila melanogaster* Scribble (Vartul) Tumorsuppressors) (Nakagawa und Huibregtse, 2000), E6TP-1 (E6-targeting protein 1) (Gao et al., 2002; Gao et al., 1999) und NFX1-91 (nuclear factors binding to X1-Box) (Gewin et al., 2004). E6 kann ebenfalls die Autoubiquitinierung und den Abbau von E6-AP selbst induzieren und so die Halbwertszeit von E6-AP verringern (Kao et al., 2000).

Es wurden allerdings auch an E6 bindende Proteine beschrieben, deren Abbau von E6-AP unabhängig ist (Glaunsinger et al., 2000; Lee et al., 2000; Thomas et al., 2002).

Die Anzahl der identifizierten E6-unabhängigen Substrate oder Bindungspartner von E6-AP ist gering. So wurde bisher Blk (B lymphocyte-specific kinase), ein Mitglied der Scr-Kinasenfamilie, als ein Interaktionspartner von E6-AP beschrieben, dessen aktivierte Form E6-AP-abhängig ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut wird (Oda et al., 1999). Auch wurde von HHR23A und B, den humanen Homologen des *S. cerevisiae* DNA-Reparaturproteins Rad23, eine Ubiquitinierung durch E6-AP in Abhängigkeit vom Zellzyklus gezeigt (Kumar et al., 1999). Für Mcm7 (multycopy maintenance protein 7) und das proapoptotische Protein Bak (Bcl-2-homologous antagonist/killer) wurden sowohl eine vom E6-Onkoprotein-abhängige als auch unabhängige Ubiquitinierung durch E6-AP beschrieben (Kuhne und Banks, 1998; Thomas und Banks, 1998; Thomas und Banks, 1999). Die physiologische Relevanz dieser Wechselwirkungen ist aber zur Zeit noch unklar. Schließlich wurde gezeigt, dass E6-AP, welches nicht an ein Substrat gebunden ist, sich auch ohne E6 autoubiquitiniert und damit seinen eigenen Abbau fördern kann (Nuber et al., 1998).

Als eine von der Ligaseaktivität unabhängige Rolle von E6-AP wurde eine Koaktivatorfunktion für nukleäre Hormonrezeptoren beschrieben (Khan et al., 2006; Nawaz et al., 1999). So wurde gezeigt, dass E6-AP an Progesteron- und Androgenrezeptoren in Abhängigkeit von gebundenem Hormon bindet und die Transaktivierung der Rezeptoren verstärkt.

Das Gen für E6-AP, UBE3A, ist auf Chromosom 15q11-q13 lokalisiert (Nakao et al., 1994). Durch alternatives Spleißen entstehen drei Isoformen von E6-AP, welche sich am extremen N-Terminus unterscheiden (Yamamoto et al., 1997). In den meisten Geweben wird E6-AP von beiden Allelen, in einigen Gehirnregionen, wie den Purkinje-Zellen und Neuronen des Hippocampus, jedoch nur vom maternalen Allel exprimiert. Das väterliche Allel ist in diesen Bereichen stillgelegt (paternales Imprinting) (Albrecht et al., 1997; Rougeulle et al., 1997).

Der Verlust oder die Inaktivierung des UBE3A-Gens verursacht eine neurologische Erkrankung, die als Angelman-Syndrom bezeichnet wird. Das Angelman-Syndrom ist durch eine schwere geistige Entwicklungsverzögerung, Sprachstörungen, Epilepsien, erhöhte motorische Aktivität sowie durch grundloses Lachen charakterisiert. Aufgrund des Lachverhaltens wird diese Krankheit auch als „Happy puppet“-Syndrom bezeichnet. Die

Erkrankung tritt bei einem von 20.000 Neugeborenen auf (Clayton-Smith und Laan, 2003; Sankar, 2005; Williams et al., 2006). In 70-75 % aller Fälle ist eine interstitielle Deletion des mütterlichen Chromosomenabschnittes 15q11-q13 als Ursache zu finden. Bei 2-3 % der Fälle wurde eine uniparentale Disomie (UPD) beschrieben und bei 3-5 % ein Imprintingdefekt nachgewiesen. Bei ca. 20 % der Patienten befindet sich eine Mutation im UBE3A-Gen (Fang et al., 1999; Matsuura et al., 1997). (Übersicht: Clayton-Smith und Laan, 2003).

Eine Analyse der Angelman-Syndrom assoziierten Punktmutationen auf E6-AP zeigte, dass diese die Ligasefunktion beeinträchtigen, während die Koaktivatorfunktion auf Steroidhormonrezeptoren meistens intakt ist (Cooper et al., 2004; Nawaz et al., 1999). Somit steht die Funktion von E6-AP als Koaktivator nicht im Zusammenhang mit dem Angelman-Syndrom, während die fehlende Ubiquitinierung von E6-AP-abhängigen Substraten wahrscheinlich zur Entstehung dieser Erkrankung beiträgt.

1.9 Herc2

Ursprünglich wurde das Herc2-Gen durch Komplementationsstudien am „pinked-eye dilution locus“ p, des Chromosoms 7C der Maus entdeckt. Mutationen im p-Lokus sind durch Hypopigmentierung charakterisiert, die von einer leichten Entfärbung des Fells und dunkler Augenfärbung, bis hin zu einem fast völligen Verlust des Melaninpigments und rosa Augenfärbung unterschiedlich ausgeprägt sein kann. Einige Mutanten weisen aber stärkere Defekte, wie Kleinwüchsigkeit, Fertilitätsstörungen, ruckartige Gehbewegungen und verringerte Lebenserwartung auf. Dieser Phänotyp wurde später als *rjs*-Syndrom (*runty*, *jerky*, *sterile*) und *jd_f2* (*juvenile development and fertility-2*) bezeichnet (Lyon et al., 1992; Rinchik et al., 1995). Durch weitere Studien verdichteten sich die Hinweise, dass dieser vielfältige Phänotyp aus der Fehlfunktion eines einzigen Gens resultiert (Lyon et al., 1992; Rinchik et al., 1995), welches schließlich proximal vom p-Gen isoliert werden konnte (Lehman et al., 1998). Kurze Zeit später wurde auch das menschliche Ortholog identifiziert (Ji et al., 1999). Es erhielt den Namen Herc2 aufgrund seiner hohen Sequenzhomologie zu Herc1 (1.5.1.2). Humanes Herc2 ist auf dem der Maus entsprechenden Chromosom 15q11-q13 lokalisiert. Northernblotanalysen zeigten Transkripte mit einer Größe von ca. 15 kb. Im Gegensatz zu den Mausproben wurden in den menschlichen Proben auch kleinere Transkripte in einer Größe von 6-7 kb detektiert

(Ji et al., 1999). Die kleineren Transkripte sind vermutlich transkribierte Pseudogene, die durch Duplikation des Herc2-Gens entstanden sind. Sie sind stark verkürzt, enthalten eine große Anzahl an Mutationen und die daraus resultierenden Polypeptide würden keine der gefundenen Proteinmotive enthalten (Ji et al., 1999). Diese menschlichen Herc2-Genduplikate stehen in engem Zusammenhang mit dem Prader-Willi-Syndrom (PWS) sowie dem Angelman-Syndrom (AS; vgl. 1.8). PWS und AS sind zwei unterschiedliche neurologische Erkrankungen. In den meisten Fällen (70-80 %) werden sie durch eine Deletion eines ca. 4 Mb langen Bereiches des humanen Chromosoms 15q11-q13 hervorgerufen. Dieser Genbereich enthält DNA-Abschnitte, die einer entgegengesetzten Prägung unterliegen (Imprinting). Bei geprägten Genen wird nur eines der beiden Allele auf den homologen Chromosomen exprimiert. Das PWS entsteht durch den Verlust der paternal exprimierten Gene. Sind die maternalen Gene betroffen entsteht das Angelman-Syndrom (Nicholls et al., 1998).

Eine Deletion dieses Genabschnittes entsteht durch das Brechen der Chromosomen. Die am häufigsten auftretenden Chromosombruchstellen (deletion breakpoint hotspots) sind von den oben erwähnten Herc2-Genduplikaten flankiert (Amos-Landgraf et al., 1999; Nicholls und Knepper, 2001). Es wird angenommen, dass die Deletion durch Fehlpaarung und Rekombination in den homologen Herc2-Genduplikaten während der Meiose entsteht (Amos-Landgraf et al., 1999).

Das Herc2-Gen grenzt an einen geprägten Genbereich, wird aber selbst gleichermaßen vom maternalen und paternalen Gen exprimiert. Somit stehen Mutationen im Herc2-Gen nicht im Zusammenhang mit den oben genannten Syndromen. Dies stimmt auch mit den Daten aus der Maus überein, wo der *rjs*-Phänotyp nur bei homozygoten Mutantenmäusen auftritt.

Menschliche und murine Herc2-Gene kodieren für Proteine mit 4834 und 4836 Aminosäuren (Abb. 7). Ein Aminosäuresequenzvergleich ergibt, dass sie zu 95 % identisch und zu 99 % ähnlich sind. Diese ungewöhnlich hohe Konserviertheit könnte auf die wichtige funktionelle Bedeutung der beiden Genprodukte hinweisen (Ji et al., 1999).

Datenbankrecherchen ergaben Herc2-ähnliche Sequenzen auch in Beuteltieren, Hühnern, Fischen und in der Fruchtfliege. Auch hier konnte eine starke Homologie festgestellt werden, was bedeuten könnte, dass die Funktion von Herc2 im ganzen Tierreich konserviert ist. Da keine Herc2-ähnlichen Sequenzen in *Saccharomyces cerevisiae* und

Caenorhabditis elegans gefunden wurden, scheint es wahrscheinlich, dass das Herc2-Gen durch frühe Genduplikation und Genfusionen entstanden ist (Ji et al., 1999).

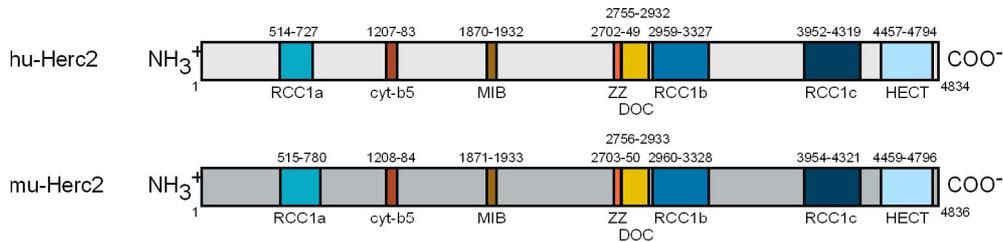


Abb. 7: Schematische Darstellung von murinen und humanen Herc2

Murines und humanes Herc2 haben eine Ähnlichkeit von 99 % zueinander und sind zu 95 % identisch.

Datenbankrecherchen ergeben für die vorhergesagte Aminosäuresequenz signifikante Homologien zu anderen Proteinen. So verfügt Herc2 über drei RCC1-ähnliche Domänen und eine HECT-Domäne (vgl. 1.5.1.2). Auch ist eine Homologie zum Cytochrom b5-Motiv zu finden. Es fehlen jedoch zwei hochkonservierte Histidine, die im Cytochrom b5 zur Koordination des Häms dienen. Das Fehlen dieser Hämkoordinationspartner wurde auch für MARPs (membrane-associated progesterone receptors) und einige Chitin-Synthasen beschrieben. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um eine Bindungstasche für Lipid-Liganden handeln könnte (Mifsud und Bateman, 2002).

Die MIB-Herc2-Domäne entspricht einer noch uncharakterisierten Sequenz, die sowohl in Herc2 als auch in der RING-Finger-E3-Ligase Mind bomb (Mib) des Zebrafisches vorkommt (Itoh et al., 2003). Herc2 enthält auch einen putativen Zinkfinger vom Typ ZZ (Ponting et al., 1996) mit 6 konservierten Cysteinresten und 2 außerhalb gelegenen Histidinresten, welche in Frage kämen, ein Zinkion zu binden. Der putative ZZ-Zinkfinger wird als eine Proteinbindedomäne angesehen.

Weiterhin wurde eine DOC-Domäne auf Herc2 identifiziert (Grossberger et al., 1999). Es handelt sich hierbei um eine ca. 150 Aminosäuren umfassende Region, die homolog zur APC10/DOC1 Untereinheit des APC-Komplexes (vgl. 1.5.2.2) ist. In der Kristallstruktur wurde APC10/DOC1 als eine zusammengerollte β -Sandwich-Struktur gezeigt (Au et al., 2002; Wendt et al., 2001). Dieser Untereinheit wird die Aufgabe zugeschrieben, die Affinität für die Substrate des APCs zu erhöhen und dadurch ihre Polyubiquitinierung zu stimulieren (Carroll und Morgan, 2002; Passmore et al., 2003). Somit wird spekuliert, dass die DOC-Domäne auch in Herc2 zu einer Stabilisierung der Substratbindung beitragen könnte (Garcia-Gonzalo und Rosa, 2005).

Zwei Mutantenmäuse haben jeweils nur kleinere Deletionen in der vorhergesagten

Aminosäuresequenz, weisen aber den vollständigen *rjs*-Phänotyp auf. So fehlen einer Mutante die Aminosäuren 4428-4748, welches einem Großteil der HECT-Domäne entspricht (Lehman et al., 1998). Einer anderen *rjs*-Maus fehlen 53 Aminosäuren (AS 3716-3768) im Bereich zwischen der RCC1b und RCC1c-Domäne (Ji et al., 1999; Walkowicz et al., 1999). Diese Bereiche scheinen mit wichtigen funktionellen Aufgaben in Zusammenhang zu stehen. So wird spekuliert, dass der gesamte *rjs*-Phänotyp auf die Nicht-Ubiquitinierung eines Substrats zurückzuführen sein könnte, dessen Bindestelle der Bereich zwischen RCC1b und RCC1c entspricht (Garcia-Gonzalo und Rosa, 2005). Experimentelle Daten liegen dazu jedoch nicht vor.

Vorhandene Daten beschränken sich auf den RNA-Bereich. Murine Herc2 mRNA wird in fast jedem Gewebe exprimiert mit größeren Mengen in Gehirn und Hoden (Lehman et al., 1998). Die menschliche mRNA-Expression wurde als ubiquitär vorhanden beschrieben (Ji et al., 1999).

1.10 Zielsetzung

Die Mitglieder einer putativen Ubiquitin-Ligase Familie, welche am C-Terminus eine 350 Aminosäuren lange konservierte Sequenz aufweisen, werden als HECT-Domänen-Proteine bezeichnet. Die Bezeichnung ist auf das Gründungsmitglied E6-AP zurückzuführen (Homolog zum E6-AP C-Terminus). Allgemein wird von Ubiquitin-Ligasen angenommen, dass sie eine entscheidende Rolle bei der spezifischen Erkennung von Substraten des Ubiquitinsystems spielen. Allerdings sind Substrate und physiologische Funktion von vielen HECT-Domänen-Proteinen oftmals noch unbekannt.

Vor Beginn dieser Arbeit gab es Hinweise auf eine Interaktion von E6-AP mit einem weiteren HECT-Protein, dem Herc2. Die Ziele dieser Arbeit waren es daher:

- (1) Diese Interaktion sollte *in vitro* und *in vivo* mit biochemischen und zellbiologischen Methoden verifiziert und näher charakterisiert werden.
- (2) Da auch das Herc2-Protein bisher nicht untersucht wurde, sollte gezeigt werden, ob es sich hierbei um eine aktive Ubiquitin-Ligase handelt. Eine Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern von Herc2 sollte Aufschluß über seine physiologische Rolle geben.
- (3) Durch die Untersuchung der beiden HECT-Domänen-Proteine sollte ein vertieftes Verständnis über die Mechanismen und Funktionen der Ubiquitinierung im Allgemeinen erhalten werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Coomassie Blau-Färbelösung

2 g/l Coomassie Brilliant Blue R250
in Entfärbelösung

DNA-Probenpuffer für Agarosegele

60 % Saccharose (w/v)
0,25 M EDTA
Bromphenolblau

Fixierlösung

40 % Methanol
10 % Essigsäure

Hypotoner Puffer

10 mM Hepes-NaOH, pH 7,4
20 mM NaCl
10 mM MgCl₂
0,5 mM ATP
pH 7,4

ONPG

4 mg/ml Ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
in 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,0

Sammelgelpuffer für SDS-Gele

0,5 M Tris/ pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS

T₂₅N₅₀

50 mM NaCl
25 mM Tris/HCl, pH 7,6

TNE-T (für Western Blot)

10 mM Tris/HCl
2,5 mM EDTA
50 mM NaCl
pH 7,5
0,1 % Tween 20

Cycloheximid

100 mg/ml in Methanol (Stock)
50 µg/ml (Endkonzentration)

Entfärbelösung

40 % Methanol
10 % Essigsäure

Guanidin-Hydrochlorid-Lysepuffer

6 M Guanidin-HCl
100 mM Na₂HPO₄, pH 8,0
10 mM Imidazol
10 mM β-Mercaptoethanol
1 mM PefaBloc
1 µg/ml Aprotinin+Leupeptin

10x Lämmli-Laufpuffer für SDS-Gele

250 mM Tris/HCl, pH 8,4
2 M Glycin
1 % (w/v) SDS

Puffer Z

100 mM NaH₂PO₄, pH 7,0
10 mM KCl
1 mM MgSO₄
50 mM β-Mercaptoethanol

SDS-Probenpuffer nach Laemmli (2x)

20 % Glycerin
4 % SDS
125 mM Tris/HCl, pH 6,8
200 mM DTT
0,001 % Bromphenolblau

50x TAE (Elektrodenpuffer für Agarosegele)

2 M Tris
950 mM Essigsäure
50 mM EDTA

TNN-Lysepuffer

1 % NP40 (IGEPAL)
0,1 M Tris/HCl, pH 8,0
0,1 M NaCl
1 mM DTT,
1 µg/ml Aprotinin + Leupeptin,
1 mM PefaBloc

Transferpuffer (für Western Blot)

12,5 mM Tris
100 mM Glycin
pH 8,3

Trenngelpuffer für SDS-Gele

1,5 M Tris pH 8,8
0,4 % SDS

1xTSS

10 % (w/v) PEG 8000
40 mM MgCl₂
20 mM Mops
2,5 % (w/v) LB-Pulver
auffüllen mit H₂O - autoklavieren
danach 5 % DMSO steril zugeben

Alle Chemikalien wurden von den üblichen in Deutschland vertretenen Firmen bezogen.

2.1.2 Medien**2.1.2.1 *E. coli***Vollmedium (LB):

25 g/l Luria Broth/Miller's LB broth (Firma Sigma)

Soc-Medium:

20 mM Glucose, 2 % Select Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl,
10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7,5

Bei Kultivierung unter selektiv Bedingungen wurden je Bedarf 100 µg/ml Ampicillin,
30 µg/ml Kanamycin oder 35 µg/ml Chloramphenicol zum autoklavierten Medium
hinzugesetzt. Für feste Nährmedien wurde 2 % Agar (Difco) hinzugefügt.

2.1.2.2 Insektenzellen

TNM-FH Insektenmedium (Sigma), 10 % fötales Kälberserum (FCS), 50 µg/ml
Gentamycin

Grace Insektenmedium (Sigma)

2.1.2.3 Säugerzellen

DMEM (Sigma), 10 % FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

RPMI-1640 (Sigma), 10 % FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

2.1.3 Zellen

2.1.3.1 *E. coli*

- DH5 α ; Genotyp: F⁻ ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* ($r_k^- m_k^+$) *phoA supE44 $\lambda^- thi-1$ gyrA96 relA1* (Invitrogen)
- BL21(DE3); Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻)gal dcm* (DE3) (Novagen)
- BL21-CodonPlus-RIL; Genotyp: F-*ompT hsdS(r_B-m_B-) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]* (Stratagene)

2.1.3.2 Insektenzellen

- Sf9-Zellen; abgeleitet aus Eierstockzellen von *Spodoptera frugiperda* (BD Pharmingen); verwendet zur Herstellung und Amplifikation von rekombinanten Baculoviren.
- High Five-Zellen; abgeleitet aus Eizellhomogenaten von *Trichoplusia ni* (Invitrogen); verwendet zur Expression von Proteinen, die durch rekombinante Baculoviren kodiert werden.

2.1.3.3 Zelllinien

- H1299 humanes großzelliges Bronchialkarzinom, p53-Null (H. Oie)
- H1299 mit stabilem E6-AP-, „knock down“ (P. Kuballa)
- HeLa humanes Zervixkarzinom, HPV18 positiv (M. Scheffner)
- HeLa-A1, HeLa mit stabilem p53-, „knock down“ (Hengstermann et al., 2001)
- HaCaT humane, spontan immortalisierte Keratinozyten Zelllinie (DKFZ)
- JURKAT humane T-Zell Leukemia Zelllinie (DSMZ-Nr. ACC 282)
- RKO humanes rektales Kolonkarzinom (A. Pause)
- E6-AP-/-MEFs Mausfibroblasten, E6-AP-Null (M. Scheffner)

2.1.4 Oligonukleotide

2.1.4.1 Primer

Im Folgenden sind die zur Klonierung verwendeten, synthetisch hergestellten Oligonukleotide aufgelistet.

Oligo-Nr.	Sequenz	Schnittstelle	Protein	AS
UK13	CCCAAGCTTGGGTTACGTCAAGTCACAT TCCAC	3' <i>HindIII</i>	E6-AP	250
UK17	CGCGGATCCATGACCAAGGAAGAAGT AAATC	5' <i>BamHI</i>	E6-AP	151
UK18	CCCAAGCTTGGGTTAATTGTTGTCTCCCT GTGAG	3' <i>HindIII</i>	E6-AP	200
UK26	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTGTCTGT CAAGTAGTC	3' <i>NotI</i>	muHerc2	4836
UK33	GGACTAGTACCACCATGGCGTACCCATA CGACGTCCCAGACTACGCGGTCGACATG CCTTCTGAGTCTTTCTGTTTGGCTGCC	5' <i>SpeI</i> , <i>Sall</i>	muHerc2	1
UK34	CCGCTCGAGGATCACCAGCTTCTGCTTC AACCTCAAGGCTGAGAGTGTAGTGGTAG CTGACTGGACAGCCAGGGCTTGTGTTCT TTAACCAGCACAGAAAGACTCC	3' <i>XhoI</i>	muHerc2	171
UK35	GGACTAGTATGGAAGAAGAAGAGACAC CTG	5' <i>SpeI</i>	muHerc2	147
UK36	CCGGAATTCACATGTCCCAAGCGGCCGT AG	3' <i>EcoRI</i> , <i>AflIII</i>	muHerc2	585
UK39	CCGCTCGAGATGAATCTTACCGAATTAA AGAATACG	5' <i>XhoI</i>	<i>E. coli</i> Rho	1
UK40	ATAGTTTAGCGGCCGCTTATGAGCGTTT CATCATTTCC	3' <i>NotI</i>	<i>E. coli</i> Rho	420
UK43	CCGGAATTCGCGAGGGAGCAGCACC GGAGCTGGGTACACTGGGCTTCGTCCG CAGCATTGCCCTCACCCACAGGCCTGT GGTGCTCTCAGC	5' <i>EcoRI</i> <i>NruI</i>	muHerc2	2018
UK44	TTTTCTTTTGC GGCCGCTCTAGAAGCC ACCCAACCAGGCTTCAACACCAGGCAAA ACCAGATGC	3' <i>NotI</i> <i>XbaI</i>	muHerc2	2504
UK45	CCGGAATTCGCTAGCCCACTCTGATGTC CAGGTTAC	5' <i>EcoRI</i> <i>NheI</i>	muHerc2	2504
UK46	TTTTCTTTTGC GGCCGCTCGGGACCAG CTGTCCAGGAGC	3' <i>NotI</i> , <i>AhdI</i>	muHerc2	2782
UK47	CGCGAATTCATGGCTTCAGCACGCTTG	5' <i>EcoRI</i>	Ro52	2
UK48	CCGCTCGAGTCAATAGTCAGTGGATCCT TG	3' <i>XhoI</i>	Ro52	475
UK49	TTTTCTTTTGC GGCCGCTTATCGCGAC CAGTCTGTCTGGAGGAGCTGGCTTATCTG TTGTTCC	3' <i>NotI</i> <i>NruI</i>	muHerc2	2018
UK51	TTTTCTTTTGC GGCCGCTTAGTGTCTG TCAAGTAGTCTTG	3' <i>NotI</i>	muHerc2	4836
UK52	CGGAATTCATGGCGGGCGGAGAAGC	5' <i>EcoRI</i>	eIF-2 γ	1
UK53	GCTCTAGATCAGTCATCATCTACTGTTG GC	3' <i>XbaI</i>	eIF-2 γ	473
UK59	CGGAATTCGACAGCTGGTCCCGAATGG TGAAAAGCCTGAACG	5' <i>EcoRI</i> <i>AhdI</i>	muHerc2	2782
UK60	GATGCCATGGCTCTAGTGAAGATGAGGC CATTCCAATGCTGG	5' <i>NcoI</i>	muHerc2	587
UK64	GCTCTAGATTAGGATTTGCAAAAGTGGA TGGC	3' <i>XbaI</i>	muHerc2	4792
UK66	CGGAATTCGGGTCAACC	3' <i>EcoRI</i>	muHerc2	851
UK70	TGCTCTAGAGCTAGCGTGCTG	5' <i>NheI</i>	muHerc2	3454
UK71	CCGGAATTCGCTAGCTGCTGA	3' <i>NheI</i>	muHerc2	3454
UK80	TACCAAGCAAAATGCTCATTAATTAAGA CTCATCAAG	<i>PacI</i>	muHerc2	1490

UK81	CTTGATGAGTCTTAATTAATGAGCATTTT GCTTGGTA	<i>PacI</i>	muHerc2	1490
UK82	CCTATCAATGGATCTAGATTCAAATGTA GAAACTGTG	<i>XbaI</i>	muHerc2	2721
UK83	CACAGTTTCTACATTGAATCTAGATCC ATTGATAGG	<i>XbaI</i>	muHerc2	2721
SG108	CGCGGATCCATGTGTGATGTCTACTTAT GG	<i>5' BamHI</i>	huHerc1	3996
SG109	GCTCTAGATTAAGGTGGTGTGCTCCAT GC	<i>3' XbaI</i>	huHerc1	4362
SG114	CGCGGATCCATGGGGGAGGTGTACTCC	<i>5' BamHI</i>	muHerc2	515
SG116	GCTCTAGATTAACAGATGACCACGA	<i>3' XbaI</i>	muHerc2	780
SG117	CGGAATTCATGACCAAAGTGTGTGTG GG	<i>EcoRI</i>	muHerc2	2960
SG124	CGCGGATCCATGTGTGCTAAGATGAGTT CC	<i>BamHI</i>	muHerc2<	4491
SG126	GCTCTAGATTAGTGTCTGTCAAGTAGT C	<i>3' XbaI</i>	muHerc2	4836
BK51	CGCGGATCCCACCATGAAGCGAGCAGCT GCA	<i>5' BamHI</i>	E6-AP	1
SS3	CGCAAGCTTTTACAGCATGCCAAATCC	<i>3' HindIII</i>	E6-AP	852

2.1.4.2 siRNAs

siRNA	korrespondierende mRNA	Sequenz 5'→3'
siRNA-Luc	Renilla luciferase	AAACAUGCAGAAAUGCUG
siRNA-H2-9	Herc2	CACGCAGAUUGGAGAUUA
siRNA-H2-10	Herc2	AGAUGUUCUUGUUCUAAGA
siRNA-H2-11	Herc2	GCAACCAGAUGUGAAUGAA
siRNA-Hdm2	Hdm2	CAAGAGACCCUGGUUAGAC
siRNA-E6-AP	E6-AP	AGAUGUGACUUACUUAACA

Die siRNAs wurden als annealte, doppelsträngige RNAs mit zusätzlichen 2 Nukleotid (TT)-3'-Überhang von MWG-Biotech AG bezogen.

2.1.5 Vektoren

Folgende Vektoren wurden zur Klonierung von Konstrukten als Ausgangsprodukt verwendet.

Vektor	Charakteristika	Referenz
pRc/CMV	5,5 kb, Ampicillin-Resistenz; CMV-Promotor; zur <i>in vitro</i> und transienten Proteinexpression in Säuger-Zellen verwendet	Invitrogen
pCDNA3-FLAG	5,4 kb, Ampicillin-Resistenz; CMV-Promotor; zur <i>in vitro</i> und transienten Proteinexpression in Säuger-Zellen verwendet, FLAG-„tag“ N-terminal	D. Roth, MPI, Frankfurt
pCDNA3-HA	5,4 kb, Ampicillin-Resistenz; CMV-Promotor; zur <i>in vitro</i> und transienten Proteinexpression in Säuger-Zellen verwendet, HA-„tag“ N-terminal	D.Roth, MPI, Frankfurt
pGEX-2TK	5,0 kb Ampicillin-Resistenz, Protein Kinase A Erkennungssequenz, Thrombin-Schnittstelle, zur bakteriellen Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen verwendet	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Vektor	Charakteristika	Referenz
pCI	4,0 kb, Ampicillin-Resistenz, CMV-Promotor, zur Proteinexpression in Säugerzellen verwendet	Promega
pET 3a	4,6 kb, Ampicillin-Resistenz, zur bakteriellen Proteinexpression verwendet	Novagen
pBluescript II SK (+)	3,0 kb, Ampicillin-Resistenz, zur <i>in vitro</i> Translation verwendet	Stratagene
pAcHLT-A-HIS ₆	8,1 kb, Ampicillin-Resistenz, Baculovirus Transfervektor, His ₆ -“tag”, N-terminal, Polyhedrin-Promotor	BD Bioscience
pSL1180	3,3 kb, Ampicillin-Resistenz, Klonierungsvektor mit ca. 40 Restriktionsschnittstellen in der MCS,	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
pGEM-1	2,9 kb, Ampicillin-Resistenz, zur <i>in vitro</i> -Translation verwendet, T7 und Sp6 Promotoren	Promega

2.1.6 Plasmidkonstrukte

2.1.6.1 pGex-2TK-Konstrukte

Plasmid-Nummer	Protein/Bezeichnung	Aminosäuren	Schnittstellen	Oligos
UK48	Transkriptionsterminationsfaktor Rho aus <i>E. coli</i>	1-420	5' <i>Xho</i> I 3' <i>Not</i> I	UK39, UK40
UK66	eIF-2 γ	1-473	5' <i>Eco</i> RI, 3' <i>Xba</i> I	UK52, UK53
UK69	Ro52	2-475	5' <i>Eco</i> RI, 3' <i>Xho</i> I	UK47, UK48
UK83	RLD-2/Herc1	3996-4362	5' <i>Bam</i> HI 3' <i>Xba</i> I	SG108, SG109
UK97	RCC1a/Herc2	515-780	5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Afl</i> III, 5' <i>Nco</i> I 3' <i>Xba</i> I	SG114, UK36, UK60, SG116

Die DNA des Transkriptionsterminationsfaktors Rho wurde freundlicherweise von Skordalakes und Berger, 2003 zur Verfügung gestellt.

Darüber hinaus wurden folgende Plasmide verwendet:

Ubiquitin	Scheffner et al., 1993
Herc2(2959-3327)	S. Glockzin
Herc2(2918-3606)	S. Glockzin
Herc2(3954-4321)	S. Glockzin
E6/16	Huibregtse et al., 1991
Livin α	K. Butz
E6-AP	Y. Haupt
E6-APHECT	M. Scheffner
E6-AP(1-500)	B. Keck
HECTH9 Δ 4	M. Eilers

2.1.6.2 pRc/CMV-Konstrukte

β-Gal	A. Hengstermann
p53	T. Unger
HPV-16 E6	M. Scheffner
His-Ubiquitin	M. Scheffner
hu RCC1b(2959-3327)	S. Glockzin
mu RCC1b(2960-3328)	S. Glockzin

2.1.6.3 pCDNA3-Konstrukte

Plasmid-Nummer	Protein/Bezeichnung	Aminosäuren	Schnittstellen	Oligos
UK51	HA-Herc2(2960-4836)	2960-4836	5' <i>EcoRI</i> 3' <i>XbaI</i>	SG117, SG126
UK55	FLAG-Herc2(2960-4836)	2960-4836	5' <i>EcoRI</i> 3' <i>XbaI</i>	- -
UK65	HA-eIF-2γ	1-473	5' <i>EcoRI</i> 3' <i>XbaI</i>	UK52, UK53
UK67	FLAG-eIF-2γ	1-473	5' <i>EcoRI</i> 3' <i>XbaI</i>	UK52, UK53
UK73	HA-Herc2HECTΔC44	4491-4792	5' <i>BamHI</i> 3' <i>XbaI</i>	SG124, UK64
UK78	HA-Herc2Mut-Hect	2960-4781	5' <i>BclI</i> , 3' <i>XbaI</i>	- -

Darüber hinaus wurden die folgenden pCDNA3-HA- oder FLAG-Konstrukte verwendet:

HA-E6-AP	S. Glockzin
HA-E6-AP C820A	S. Glockzin
FLAG-E6-AP	S. Glockzin
HA-Herc2(2918-3606)	S. Glockzin
FLAG-Herc2(2918-3606)	S. Glockzin

2.1.6.4 pET3a-Konstrukte

E1	Hatfield und Vierstra, 1992
UbcH5	Scheffner et al., 1995
UbcH7	Nuber et al., 1996
Ubiquitin-R48	You et al., 1999
Ubiquitin-K48	You et al., 1999

Ubiquitin-K63 You et al., 1999
 Ubiquitin-K0 You et al., 1999

2.1.6.5 pGEM-1-Konstrukte

Plasmid-Nummer	Protein/Bezeichnung	Aminosäuren	Schnittstellen	Oligos
UK27	E6-AP Δ C602	1-250	5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Hind</i> III	BK51, UK13
UK28	E6-AP Δ N150	151-852	5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Hind</i> III	UK17, SS3
UK29	E6-AP Δ C651	1-200	5' <i>Bam</i> HI, 3' <i>Hind</i> III	BK51, UK18

E6-AP-95 kD Huibregtse et al., 1993a
 E6-AP Δ HECT M. Scheffner
 E6-APHECT Schwarz et al., 1998
 E6-AP Δ E6 M. Scheffner
 E6-AP Δ N199 Huibregtse et al., 1993b
 E6-AP Δ N309 Huibregtse et al., 1993b
 E6-AP Δ C84 Huibregtse et al., 1993b
 E6-APDC170 Huibregtse et al., 1993b

2.1.6.6 pRetro.SUPER.puro-Konstrukte

pRSpuro-siE6-AP M. D'silva
 pRSpuro-siLuc M. D'silva

2.1.6.7 pAchLT-A-HIS₆-Konstrukte

Plasmid-Nummer	Protein/Bezeichnung	Aminosäuren	Schnittstellen	Oligos
UK52	Herc2(2960-4836)	2960-4836	5' <i>Eco</i> RI 3' <i>Not</i> I	SG117, UK26

2.1.6.8 pBluescript II SK (+)-Konstrukte

Plasmid-Nummer	Protein/Bezeichnung	Aminosäuren	Schnittstellen	Oligos
UK49	Herc2(2960-4836)	2960-4836	5' <i>EcoRI</i> 3' <i>XbaI</i>	SG117, SG126
UK100	Herc2(2960-4836)C:A inaktiv	2960-4836	5' <i>BclI</i> 3' <i>XbaI</i>	- -

2.1.7 Antiseren

Antikörper	Referenz	Verdünnung
monoklonaler Maus Anti-p53 IgG, DO-1	Dianova, Hamburg	1:1.000
monoklonaler Maus Anti-HA	Hiss Diagnostics, Heidelberg	1:1.000
monoklonaler Maus Anti-FLAG, M2	Sigma	1:1.000
polyklonaler Kaninchen Anti-E6-AP	M. Scheffner	1:500
Peroxidase gekoppelter Ziege Anti-Maus IgG (H+L)	Dianova	1:5.000
Peroxidase gekoppelter Ziege Anti-Kaninchen IgG	Dianova	1:5.000
polyklonaler Kaninchen Anti-Aktin	Sigma	1:1.000
polyklonaler Kaninchen Anti-Herc2	M. Scheffner	1:1.000
Monoklonaler Maus Anti-Herc2	BD Bioscience	1:500
Polyklonaler Kaninchen Anti-DEK	R. Knippes, Universität Konstanz	1:10.000
Monoklonaler Maus Anti-E6-AP	M. Scheffner	1:1.000
AlexaFluor 568 Ziege Anti Maus IgG,	Molecular probes	1:1.000

2.1.8 Längenstandards

DNA-Marker:

- λ (Lambda)-DNA *HindIII*-Marker (Invitrogen):

23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 545, 125 (bp)

- 100 bp ladder (New England Biolabs):

1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 (bp)

Protein-Molekulargewichtsstandards:

- Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas):

180, 130, 100, 73, 54, 48, 35, 24, 16, 10 (kDa)

- Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad):

250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 (kDa)

2.1.9 Rekombinante Baculoviren

E6-AP (95 kDa-Form)	Huibregtse et al., 1993a
E6-AP Δ E6	M. Scheffner
His ₆ -Herc2(2960-4836)	diese Arbeit

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Lagerung von Zellen

2.2.1.1 *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien erfolgte in über Nacht Kulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz (2.1.2.1) bei 37°C und ausreichender Belüftung in einem Schüttler.

Für Plasmid-Minipräparationen wurden 3 ml LB mit Antibiotika (2.1.2.1) mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht geschüttelt. Für Plasmid-Midipräparationen dagegen wurden 100 ml Medium mit einigen μ l einer über Nacht Kultur angeimpft.

Zur Anzucht für eine Proteinexpression wurde zunächst eine über Nacht Kultur angelegt, von der am folgenden Tag eine Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft wurde.

Zur Lagerung von Dauerkulturen wurden 700 μ l einer über Nacht Kultur mit 300 μ l sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.2 Insektenzellen

Sf9- und High Five-Zellen wurden in Insektenzellmedium (2.1.2.2) bei 27°C auf 10 cm Polystyrol-Gewebekulturschalen (Greiner) angezogen. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen durch Abspülung mit dem Pipettenstrahl gelöst und in einem geeigneten Verhältnis auf neue Kulturschalen verteilt. Nachdem sich die Zellen wieder abgesetzt hatten, wurde das Medium abgesaugt und durch frisches, vorgewärmtes ersetzt.

Zur Gefrierlagerung wurden Zellen von einer 90 % konfluenten Platte gelöst und bei 500-1000 g abzentrifugiert und in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium (20 % FCS, 10 % DMSO, 70 % Medium) resuspendiert, für 2-3 h bei -20°C, dann über Nacht in -80°C eingefroren und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.3 Eukaryotische Zellen

Säugerzellen wurden auf Polystyrol-Gewebekulturschalen (Greiner) in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer 5 %igen Kohlendioxid-Atmosphäre kultiviert. RKO, JURKAT und H1299 wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS (2.1.2.3), alle anderen Zelllinien in DMEM (2.1.2.3) gehalten. Alle Zelllinien wurden nach Standardmethoden passagiert. Zur Gefrierlagerung wurden Zellen von einer 90 % konfluenten Platte mittels Trysin gelöst (gilt nicht für JURKAT-Zellen) und bei 500-1000 g abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium (20 % FCS, 70 % Medium, 10 % DMSO) resuspendiert. Nach Portionierung auf zwei Kryoröhrchen wurden die Zellen für 2-3 h bei -20°C, dann über Nacht in -80°C eingefroren und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2 Herstellung und Amplifikation von Baculoviren

Zur Herstellung eines Baculovirus wurden Baculogold Baculovirus DNA (Pharmingen) und Transfervektor, welcher die gewünschte Sequenz enthält kotransfiziert. Dazu wurden 10^6 Sf9-Zellen in einer 35 mm Kulturschale ausgesät und 2 h bei 27°C in Insektenzellmedium inkubiert. 3 µg Transfervektor und 0,5 µg Baculogold Baculovirus DNA (Pharmingen) wurden gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 100 µl Grace Insect Medium (Sigma) hinzugegeben und wiederum gemischt (Lösung A). In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 10 µl CellFectin Reagenz (Invitrogen) mit 100 µl Grace Insect Medium (Sigma) gemischt (Lösung B). Lösung A und B wurden vereinigt und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde die Mischung aus den Lösungen A und B mit 0,8 ml Grace Insect Medium aufgefüllt und auf die Sf9-Zellen, die vorher mit 2 ml Grace Insect Medium (Sigma) gewaschen wurden, gegeben. Es folgte eine Inkubation für 5 h bei 27°C, wonach die Transfektionslösung entfernt wurde und durch 2 ml normales Insektenzellmedium ersetzt wurde. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und zur Amplifikation des Virus eingesetzt.

Zur Virusamplifikation wurden ca. 10^6 Sf9-Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen (20 min bei 27°C) wurde das Medium mit den nicht abgesetzten Zellen und Zelltrümmern abgesaugt und durch frisches TNM-FH-Vollmedium (2.2.1.2) ersetzt. Pro Platte wurden 50 µl des entsprechenden Virusstocks

zugegeben. Die Infektion erfolgte über 3 Tage, dann wurde der virushaltige Überstand portioniert bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen wurden in einem Spektralphotometer (Bio-Rad Spektrophotometer 3000) bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) in Quarzküvetten bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht ca. 50 μg doppelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren dient der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, der zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte.

2.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

DNA-Minipräparationen wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt (Jones und Schofield, 1990). Die Anzucht erfolgte wie unter 2.2.1.1 beschrieben. Zur Gewinnung größerer Mengen wurde das Plasmid-Midi-Präparations-Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet, wobei die Durchführung nach Herstellerangaben erfolgte.

2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

DNA wurde mittels PCR (polymerase chain reaction) amplifiziert. Für PCR-Fragmente, die anschließend kloniert werden sollten, wurde die TripelMasterTaq-Polymerase der Firma Eppendorf verwendet. Ein 50 μl Ansatz enthielt 50 ng „template“-DNA, 2 μl pro Oligonukleotid (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 8 μl einer 1,25 mM dNTP-Lösung, sowie 1 μl der Polymerase und den vom Hersteller angegebenen Puffer.

Eine Mutagenese-PCR wurde nach dem Protokoll Quick Change, der Firma Stratagene durchgeführt. Ein 50 μl Ansatz erhielt 100 ng „template“-DNA, 2 μl Oligos 5 pmol/ μl (komplementäre, mutagenese Oligos), 5 μl Tuningbuffer (Eppendorf), 8 μl dNTPs 2,5 mM jeden dNTPs, 1 μl TripleMasterTaq-Polymerase (Eppendorf). Nach erfolgter PCR wurde zur Entfernung der „template“-DNA der Ansatz für 1 h bei 37°C mit 1 μl DpnI versetzt. Danach wurde ein Aliquot in kompetente *E. coli* transformiert (2.2.3.10).

2.2.3.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Restriktion erfolgte in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem (New England Biolabs oder Invitrogen). Die Ansätze enthielten 2-5 μg DNA in 30-50 μl

Reaktionsvolumen und wurden für 2-3 h im Wasserbad bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.2.3.5 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe in einem 0,8-2 %igen TAE-Agarosegel (2.1.1) mit einem Zusatz von 1 µg/ml Ethidiumbromid. Dazu wurden die zu analysierenden DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer (2.1.1) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Als DNA-Größenstandard wurde *Hind*III restingierte λ-DNA eingesetzt (2.1.8). In die DNA interkaliertes Ethidiumbromid wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter Gelelektrophorese (2.2.3.5) wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit QIAEX II der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten unter Verwendung von Reaktionspuffer und T4-DNA-Ligase der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers in 20 µl Ansätzen. Die Ligationsansätze wurden bei 14°C über Nacht oder 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.3.8 Präparation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine 10 ml über Nacht Kultur des gewünschten Bakterienstammes wurde in eine 200 ml Hauptkultur überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (4000 g, 15 min, 4°C) und das Pellet in 20 ml eiskaltem TSS-Puffer (2.1.1) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 500 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.9 Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 10 ml über Nacht Kultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und 24 h später in 1 l LB-Medium überimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 wurden die Zellen geerntet (4000 g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem, sterilem H₂O und in 20 ml steriler 10 %iger Glycerinlösung gewaschen. Danach wurde das Pellet in 2,5 ml 10 %

Glycerinlösung resuspendiert, in vorgekühlte Reaktionsgefäße (je 200 µl) aliquotiert und in -80°C eingefroren.

2.2.3.10 Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen

100 µl CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen (2.2.3.8) wurden mit 4 µl Ligationsansatz (2.2.3.7) oder 50 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 1 min bei 42°C. Auf Eis erfolgte eine Zugabe von 500 µl SOC-Medium (2.1.2.1). Danach wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C inkubiert, auf LB-Selektivagarplatten (2.1.2.1) ausplattiert und ca. 14 h bei 37°C kultiviert.

2.2.3.11 Transformation in elektrokompente *E. coli*-Zellen (Elektroporation)

Elektrokompente Zellen (50 µl) wurden mit 2 µl Ligationsansatz (2.2.3.7) versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm, BioRad) überführt. Der Stromimpuls erfolgte durch die Entladung einer Spannung von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium (2.1.2.1) aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektivagarplatten ausplattiert.

2.2.3.12 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten durch das Service-Labor des ZMMK (Zentrum für molekulare Medizin Köln, Universität Köln) auf einem ABI Prism 377 DNA-Sequencer der Firma Applied Biosystems mit der Taq FS *BigDye-terminator cycle sequencing* Methode. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte die Sequenzierung durch die Firma GATC, Konstanz.

2.2.3.13 Gesamtlängen-Herc2-Klonierung

Nicolls-Klone (Ji et al., 1999)	mit Schnittstellen versehene Klone
154 (bp 1-451)	5'- <i>SpeI</i> -HA- <i>Sall</i> -154-(1-513)- <i>XhoI</i> -3' Oligos: 5'UK33, 3'UK34
160 (bp 320-2630)	5' <i>Xho</i> -160-(513-1826)- <i>AflIII</i> -3' Oligos: 5'UK35, 3'UK36
122 (bp 1754-6482)	5' <i>NcoI</i> -122.1-(1826-2625)- <i>EcoRI</i> -3' 5' <i>EcoRI</i> -122.2(2625-6124)- <i>NruI</i> -3' Oligos: 5'UK60, 3'UK66 5'UK65, 3'UK49
162 (bp 6174-7569)	5' <i>NruI</i> -162(6124-7583)- <i>XbaI</i> -3' Oligos: 5'UK43, 3'UK44
169 (bp 7541-8427)	5' <i>NheI</i> -169(7583-8417)- <i>AhdI</i> -3' Oligos: 5'UK45, 3'UK46

Nicolls-Klone (Ji et al., 1999)	mit Schnittstellen versehene Klone
183 (bp 8302-15247)	5' <i>AhdI</i> -183.1(8417-10433)- <i>NheI</i> -3' 5' <i>NheI</i> -183.2(10433-14582)- <i>NotI</i> -3' Oligos: 5'UK59, 3'UK70 5'UK71, 3'UK51

Es lagen die oben beschriebenen Klone vor (linke Spalte), Vektoren oder verwendete Schnittstellen waren unbekannt. Zur Klonierung des N-Terminus von *Herc2* wurde das nicht in der *Herc2*-Gesamtsequenz schneidende Enzym *SpeI* gewählt. Nach der *SpeI*-Schnittstelle folgte eine für den HA-„tag“-kodierende Sequenz und wiederum darauf wurde eine *SalI*-Schnittstelle eingesetzt, somit sollte es möglich sein den „tag“ entfernen zu können (Oligo UK33). Die Sequenz des Klons 154 sollte an die des Klons 160 fusioniert werden. Jedoch konnte in der überlappenden Sequenz (bp 320-451) keine geeignete Schnittstelle gefunden oder durch stille Mutation generiert werden. Somit wurde ein langes Oligo konstruiert, welches bei bp 513 die *XhoI*-Schnittstelle einschloss (Oligo UK34). Eine weitere *XhoI*-Schnittstelle lag erst wieder bei bp 14038. Das 3'Ende des Klons 160 sollte an den 5'Anfang des Klons 122 ligiert werden. Durch Mutation zweier Basenpaare wurden an Position 1826 eine *AflIII*-Schnittstelle aus der vorliegenden *NcoI*-Schnittstelle erzeugt (Oligo UK36). Somit war es möglich den Klon 160 an 122 über die *AflIII*-Schnittstelle an die interne *NcoI*-Schnittstelle auf 122 zu fusionieren. Eine Klonierung direkt über die *NcoI*-Schnittstelle war nicht möglich, da *NcoI* bereits im Klon 160 schneidet. Es muss beachtet werden, dass *NcoI* insgesamt neunmal in der *Herc2*-Sequenz schneidet. Somit war es notwendig das Fragment des Klons 122 mit *NcoI* zu verdauen, bevor weitere Sequenzen dazu kloniert wurden. Allerdings war es nicht möglich ein PCR-Produkt, das sich über die komplette 122-er Sequenz erstreckte, zu erzeugen, was vermutlich auf einen GC-reichen Sequenzbereich zurückzuführen ist. Somit wurde die Sequenz in zwei Stücke über eine singuläre *EcoRI*-Schnittstelle kloniert. 122.1 wurde also mit den Schnittstellen 5'*NcoI* und 3'*EcoRI* versehen und 122.2 mit den Schnittstellen 5'*EcoRI* und 3'*NruI*. Mit der *NruI* Schnittstelle sollte an die Sequenz des Klons 162 anfusioniert werden. Die *NruI*-Schnittstelle wurde bei bp 6124 in der Sequenz von 122 durch den Austausch von drei Basenpaaren erzeugt, die jedoch keinen Aminosäureaustausch verursachten. *NruI* schneidet normalweiser nicht in der *Herc2*-Sequenz. Zusätzlich wurde hinter dieser Schnittstelle ein Stoppkodon eingebaut, so dass eine Expression der N-terminalen Hälfte (Klon 154+160+122) von *Herc2* möglich war (Oligo Uk 49). Die erzeugte *NruI*-Schnittstelle lag außerhalb des überlappenden Bereichs zu Klon 162, so dass wieder ein langes Oligo verwendet wurde, um die Schnittstelle zu

erreichen (UK43). 3' wurde bei bp 7583 eine *XbaI*-Schnittstelle erzeugt (UK44). Die Sequenz war nicht im „template“ vorhanden (nur bis 7569), wurde aber durch ein überhängendes Oligo erzeugt. Zum zusammen Klonieren wurde an der 5' Sequenz von 169 dagegen eine *NheI*-Schnittstelle erzeugt. Eine Klonierung über 5' und 3' *XbaI* bzw. *NheI* hätte zu einem Aminosäuren-Austausch geführt, der durch die Kombination 5' *XbaI* und 3' *NheI* verhindert wurde. Es war notwendig die Klone 162 und 169 zuerst zu kombinieren, da es in der Herc2-Gesamtsequenz weitere Schnittstellen für *NheI* und *XbaI* gab. Beide sollten an die im Klon 183 vorhandene Sequenz fusioniert werden. Jedoch konnte auf dem „template“ 183 kein PCR-Produkt ausreichend für eine Klonierung erzeugt werden. Somit wurden zwei Fragmente erzeugt und über eine interne *NheI*-Schnittstelle bei bp 10433 kloniert. Das 5' Ende von 183 enthält bei 8417 bp eine singuläre *AhdI*-Schnittstelle über die an den Klon 169 anfusioniert wurde (Oligo UK59). Als 3' Restriktionsschnittstelle wurde *NotI* gewählt, welches in der gesamten Herc2-Sequenz nicht schneidet (Oligo UK51). Die Fusionen aus 154+160+122 wurden an 162+169+183 über die oben beschriebene *NruI*-Schnittstelle zum Gesamtlängen-Herc2-Konstrukt kloniert.

Der erste Fehler wurde bei bp 4542 TCA zu TAA gefunden. Durch Mutagenese-PCR mit den Oligos UK80 und UK81 wurde diese Mutation rückgängig gemacht und dabei durch stille Mutation eine Schnittstelle für *PacI*, welches sonst nicht in der Herc2-Sequenz schneidet, eingefügt. Die zweite Mutation wurde bei bp 8233 gefunden. An dieser Stelle fehlen zwei Basenpaare, entweder AG oder GA. Die zur Behebung dieses Fehlers synthetisierten Oligonukleotide sind UK82 und UK83. Zur Überprüfung, ob die Mutagenese erfolgreich war, wurde eine *XbaI*-Schnittstelle eingefügt, die nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führt.

2.2.4 Proteinexpression

2.2.4.1 Expression in *E. coli*

Die Expression von GST-Fusionsproteinen (pGEX-Konstrukte 2.1.6.1) erfolgte in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) oder BL21-RIL. Es wurde eine über Nacht Kultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und für 16 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Daraus wurde eine 100-500 ml Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ 0,1 angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Kulturen mit 0,4 mM IPTG induziert und

für weitere 3-4 h inkubiert. Danach wurden die Bakterien geerntet (4000 g, 10 min, 4°C), in PBS/1 % TritonX100 resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (Sonifier W-250 Branson, 3 x 20 Pulse) unter Eiskühlung aufgebrochen. Unaufgebrochene Zellen und unlösliche Proteine wurden bei 15.000 g im SS34-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt eingesetzt oder wie unter 2.2.5.1 beschrieben aufgereinigt.

Die Expression von Proteinen, welche auf das pET-Expressionssystem beruhten, erfolgte analog. Diese Lysate wurden meistens direkt ohne weitere Aufreinigung verwendet. Eine Ausnahme bildet die Expression von Ubiquitin, welches 10 min bei 75°C erhitzt wurde, 10 min auf Eis gekühlt und schließlich 10 min bei 13.000 g zentrifugiert wurde. Der Überstand enthält Ubiquitin.

2.2.4.2 *In vitro* Translation

Die Proteinsynthese *in vitro* wurde in RRL (Kaninchen-Retikulozytenlysat) oder in WG (Weizenkeimlysat) mit dem TNT-*in vitro* Translationskit der Firma Promega in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin für 2 h bei 30°C gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.4.3 Expression in Insektenzellen

Proteine im Baculovirussystem wurden in High Five-Zellen exprimiert (2.2.1.2). Auf zehn 10 cm Kulturschalen wurden je ca. 10⁶-Zellen ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und durch Frisches ersetzt. Anschließend wurden pro Platte 200 µl einer Virusstocklösung (Virus-Titer ca. 10⁸ Partikel/ml) zugeführt. Die Zellen wurden für 48 h bei 27°C infiziert. Zur Lyse wurden die Zellen mit dem Pipettenstrahl von der Platte abgespült. Die präzipitierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 200 µl/Platte TNN-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (2.1.1) für 1 h auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation (15.000 g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand, welcher das überexprimierte Protein enthielt, entweder über Anionenaustausch-Chromatographie (2.2.5.3) oder über Affinitätschromatographie (2.2.5.2) aufgereinigt.

2.2.5 Aufreinigung von Proteinen

2.2.5.1 Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden nach 2.2.4.1 exprimiert und lysiert. Der 15.000 g Überstand (12,5 ml) wurden mit 100 µl Glutathion-Sepharose 4B (Amersahm Bioscience), welche in

PBS/1 % TritonX-100 voräquilibriert wurde, inkubiert. Die Inkubation erfolgte meist 1 h bei Raumtemperatur, in seltenen Fällen auch über Nacht bei 4°C im Rotationsschüttler. Anschließend wurde die Sepharose bei 500-1000 g präzipitiert und 4 mal mit je 10 ml PBS/1 % TritonX-100 gewaschen. Die gewaschene Sepharose wurde entweder direkt für GST-Kopräzipitationsassays (2.2.8.1) eingesetzt oder das GST-Fusionsprotein von der Sepharose eluiert. Zur Elution wurde die Sepharose zunächst in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 umgepuffert und dann mit einem 10 mM Glutathion-Puffer (in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; reduziertes Glutathion von der Firma Sigma) für 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. In den meisten Fällen wurde 4 mal je 100 µl eluiert und die Hauptfraktionen vereinigt.

2.2.5.2 Affinitätsreinigung von His-Fusionsproteinen

Ein Proteinlysat von His-Fusionsprotein wurde nach 2.2.4.3 aus Insektenzellen hergestellt. Ni-NTA-Agarose (Qiagen) wurde in TNN-Puffer voräquilibriert und zu dem Lysat gegeben. Die Anbindung erfolgte 30-60 min bei Raumtemperatur. Die Waschschriffe erfolgten 4 mal mit je 1 ml in 20 mM Imidazol in PBS. Die Elution erfolgte nach Herstellerangaben entweder in 200 mM EDTA-Lösung oder in 200-500 mM Imidazolpuffer.

2.2.5.3 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde in dieser Arbeit hauptsächlich für die Aufreinigung von überexprimierten Proteinen im Baculovirussystem verwendet (2.2.4.3). Als Säulenmaterial wurde Q-Sepharose Fast Flow der Firma Pharmacia verwendet. Für einen Ansatz bei dem aus 10 Kulturschalen Lysat hergestellt wurde, bestand das Säulenvolumen aus 1 ml. Die Säule wurde gegossen und mit 10 Säulenvolumina (10 ml) T₂₅N₄₀₀ (Puffer mit 25 mM Tris und 400 mM NaCl, pH 7,6, vgl. 2.1.1) gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule mit 10x Säulenvolumen T₂₅N₁₂₅, pH 7,6 äquilibriert. Dann wurde das zu reinigende Lysat auf die Säule gegeben. Anschließend wurde im Falle einer E6-AP-Präparation mit dem 1,5-fachen Säulenvolumen T₂₅N₁₂₅ und danach mit dem einfachen Säulenvolumen T₂₅N₃₀₀ gewaschen. Die Elution erfolgte schrittweise (1 ml) mit T₂₅N₄₀₀ wobei die ersten 500 µl verworfen wurden. Im Falle einer E1-Präparation wurde nur mit T₂₅N₁₂₅ gewaschen und mit T₂₅N₃₀₀ eluiert. Für die His-Herc2(2960-4836)-aufreinigung wurde mit einfachen Säulenvolumen T₂₅N₁₂₅ gewaschen, gefolgt von 0,5-fachen Säulenvolumen T₂₅N₃₀₀. Die Elution erfolgte in T₂₅N₅₀₀. Allen Elutionspuffern

waren die Proteaseinhibitoren Aprotinin/Leupeptin (1 µg/ml), 5 mM β-Glycerophosphat, Pepstain A, 1 mM PefaBloc und 1 mM DTT zugefügt worden.

2.2.6 Analyse von Proteinen

2.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970). Je nach molarer Masse der aufzutrennenden Proteine wurde die Prozentigkeit des Trenngels (von 5 bis 15 % oder als Gradient von 3- 15 %) variiert. Die Prozentigkeit des Sammelgels lag stets bei 5 %. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in SDS-Probenpuffer nach Laemmli für 5-10 min bei 100°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Laufpuffer bei konstanten 44 mA für 200 min, wobei die Spannung auf 250 V begrenzt wurde. Die Zusammensetzung aller hier genannten Puffer ist unter 2.1.1 angegeben. Die aufgetrennten Proteine konnten im Folgenden durch Coomassiefärbung (2.2.6.2) oder Fluorographie (2.2.6.3) sichtbar gemacht oder auf PVDF-Membran „geblottet“ (2.2.6.4) werden.

2.2.6.2 Coomassie Blau Färbung von Proteinen

Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Brilliant Blue-Lösung (Serva, Heidelberg; 2.1.1) für 1-2 h oder mit einer kolloidalen Coomassiefärbelösung der Firma Roth, Karlsruhe über Nacht nach Herstellerangaben. Die Entfärbung des mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbten Gels erfolgte in Entfärberlösung (2.1.1). Eine Entfärbung des kolloidal gefärbten Gels ist nicht notwendig.

2.2.6.3 Fluorographie

Nach Auftrennung von [³⁵S]-markierten Proteinproben in der SDS-PAGE wurde das Gel für 15 min in Fixierlösung (2.1.1) und anschließend für 15 min in Amplify-Lösung (Amersham, Biosciences) inkubiert. Die Gele wurden bei 80°C für 2 h unter Vakuum getrocknet. Die Fluorographie erfolgte entweder anhand von Kodak X-OMAT AR Röntgenfilmen in Kodak X-Omatic Filmkassetten für 4-72 h bei -80°C oder durch Exposition von PhosphorImagerplatten (FUJI) für 2-24 h und Auslesung durch Verwendung des PhosphorImagers (FUJI BAS 2500) und der AIDA-Software 4.06 (Ray-Test).

2.2.6.4 Western-Blot und Immunodetektion

Der Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) erfolgte unter Verwendung einer Blottkammer der Firma Biorad Laboratories GmbH, München. In Abhängigkeit von den nachzuweisenden Proteinen betrug die Blottdauer 150 min bei 50 V (20-200 kDa) oder 34 Volt für über 1000 min (50-500 kDa) bei 4°C in Transferpuffer (2.1.1). Anschließend wurde die Membran für 1 h in 5 %igem Magermilchpulver in TNE-T (2.1.1) zum Blockieren unspezifischer Bindungen unter Schwenken inkubiert. Die danach folgende Inkubation des Primärantikörpers (vgl. 2.1.7) erfolgte in TNE-T für 1 h bei Raumtemperatur. Nach Waschen der Membran mit TNE-T erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase gekoppelt) (vgl. 2.1.7) für 1 h. Nach weiterem Waschen mit TNE-T wurde nach Herstellerangaben (Amersham Bioscience) eine ECL-Reaktion (enhanced chemiluminescence) durchgeführt. Entweder erfolgte das Sichtbar machen der Banden durch Exposition eines Kodak X-OMAT AR Röntgenfilms oder durch Verwendung des Imagersystems FUJI LAS 3000.

2.2.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen wurden mit Hilfe des BioRad Protein-Assays nach Herstellerangaben bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektralphotometer (SmartSpec 3000) durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde BSA verwendet.

2.2.6.6 Massenspektrometrische Analysen

Coomassie gefärbte Banden (2.2.6.2) wurden aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die massenspektrometrischen Analysen („Peptide Mass Fingerprint“) erfolgten durch das Service-Labor des ZMMK (Zentrum für molekulare Medizin Köln, Universität Köln) an einem Bruker Reflex IV time of flight mass spectrometer (Bruker Daltonics).

2.2.7 Aufreinigung spezifischer Antikörper

Die Aufreinigung des polyklonalen Antiserums erfolgte durch Affinitätschromatographie nach Bar-Peled und Raikhel, 1996. GST-Herc2(2918-3606) wurden nach 2.2.4.1 angezogen und aufgereinigt. Danach wurde das gewaschene, an GSH-gebundene Protein mit 0,2 M Borat-Puffer (pH 8,6 mit NaOH) gewaschen. Zum „crosslinken“ wurde die präzipitierte Sepharose mit 2 ml einer frischen DMP-Lösung (20 mM DMP in 0,2 M

Triethanolamin, pH 8,3 mit HCl) versetzt und 30 min im Rotationsschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Termination erfolgte durch Inkubation von 60 min in 10 ml 0,2 mM Ethanolamin, pH 8,2 mit HCl. Im Folgenden wurde 2 x 5 min mit je 2 ml Glycin-Puffer (0,1 M, pH 2,5 mit HCl) sowie 2 x 5 min mit je 10 ml PBS gewaschen. Das „gecrosslinkte“ GST-Protein wurde mit dem polyklonalen Herc2-Antiserum in einer Verdünnung von 1:3 (1 ml Antiserum) versetzt und 4 h bei 4°C im Rotationsschüttler inkubiert. Zum Abtrennen der unspezifischen Antikörper wurde nach Präzipitation der Überstand verworfen und die Sepharose mit 5 x 10 ml PBS gewaschen. Die Elution erfolgte in 1 ml Glycin-Puffer (0,1 M Glycin, pH 2,5) für 2 x 5 min. Die Antikörperlösung wurde danach mit 1 M Tris (ohne pH) auf ca. pH 7 eingestellt. Zur Regeneration der GSH-Sepharose wurde diese 5 min in Phosphatpuffer (0,1 M, pH 12) geschwenkt und bei 4°C mit 0,02% Azid gelagert.

2.2.8 *In vitro* Assays

2.2.8.1 GST-Kopräzipitationsassays

GST-Kopräzipitationsassays wurden zum Nachweis von Proteininteraktionen *in vitro* durchgeführt. Hierzu wurden GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert (2.2.4.1) und über Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose aufgereinigt (2.2.5.1). Um vergleichbare Mengen von GST-Proteinen an der Sepharose zu haben, wurde meist das Kulturvolumen variiert, d.h. es wurden bei schlechter exprimierenden Proteinen eine größere Menge *E. coli* angezogen. Der Angleich erfolgte durch ein „Coomassie-Gel“. Zu 5-10 µl der mit GST-Fusionsprotein gekoppelten Sepharose wurden 10 µl [³⁵S]-markiertes *in vitro* Translatat (2.2.4.2) des putativen Bindungspartners hinzugegeben. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 200 µl. Der Bindepuffer setzte sich aus einer 4 + 1 Mischung von T₂₅N₅₀ und TNN-Lysepuffer (2.1.1) und 1 mM DTT zusammen. Die Ansätze wurden im Rotationsschüttler für 3-4 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose durch Zentrifugation abgesetzt und 4 mal mit je 1 ml TNN-Puffer mit 1 mM DTT gewaschen. Die gewaschenen Präzipitate wurden in 2x Laemmli-Probenpuffer bei 100°C für 5-10 min gekocht. Als Kontrolle wurden 2 µl *in vitro* Translatat (1/5 der für die Bindung eingesetzten Menge, in der vorliegenden Arbeit als Input bezeichnet) mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE (2.2.6.1) erfolgte der Nachweis des radioaktiv markierten Bindungspartners über Fluorographie (2.2.6.3).

2.2.8.2 *In vitro* Ubiquitinierungsassays

Für *in vitro* Ubiquitinierungsassays mit HECT-Ligasen wurden jeweils 1-2 μl vom *in vitro* Translatat (2.2.4.2) des Ubiquitinierungssubstrats in Gegenwart von 8 μg Ubiquitin, 50 ng aus Insektenzellen exprimiertem E1 (2.2.4.3), 200 ng bakteriell exprimiertem Ubc8 bzw. UbcH5 und UbcH7 (2.2.4.1) und gegebenenfalls mit 1 μg in Insektenzellen exprimiertes E6-AP oder E6-AP Δ E6 inkubiert. Zusätzlich enthielten die Ansätze 5 mM DTT, 2 mM Mg-ATP und 2 mM MgCl₂ und wurden mit T₂₅N₅₀ auf ein Volumen von 40 μl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für 2 h. Danach wurden die Proben in Laemmli-Probenpuffer aufgekocht elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.6.1) und mittels Fluorographie (2.2.6.3) sichtbar gemacht.

Für *in vitro* Ubiquitinierungsassays mit anschließender Coomassie-Färbung wurde der Ansatz verdreifacht (Gesamtvolumen 120 μl). Als Ubiquitinierungssubstrat wurden ausreichende Mengen (ca. 10 μg) eines GST-Fusionsproteins eingesetzt.

In vitro Ubiquitinierungsassays mit RING-Finger-Ligasen wurden analog durchgeführt, abweichend wurden jeweils 20 μg Ubiquitin, nur bakteriell exprimiertes UbcH5 als E2 (200 ng) und 1 mM DTT in einem Volumen von 40 μl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C.

2.2.8.3 Thioesterassays

Die Reaktion erfolgte in T₂₅N₅₀, pH 7,6 und enthielt ca. 50 ng E1, ca. 200 ng E2, 4 mM ATP, 10 mM MgCl₂ und 0,2 mM DTT, 1 μl *in vitro* Translatat bei einem Volumen von 40 μl . Außerdem wurde gereinigtes und eluiertes GST-Ubiquitin zugesetzt (2.2.5.1). Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze durch Zugabe von 2-fach Probenpuffer mit 4 M Harnstoff unter nicht reduzierenden Bedingungen gestoppt und für 15 min bei 30°C inkubiert, oder aber die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen mit Laemmli-Probenpuffer (mit 100 mM DTT) versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Die Reaktionsansätze wurden dann in der SDS-PAGE bei 4°C aufgetrennt, wobei die konstante Stromstärke bei 22 mA, die maximale Spannung bei 200V und die Anfangsspannung bei 50 V lag. Nach ca. 400 min konnte das Gel wie unter 2.2.6.3 weiter bearbeitet werden.

2.2.9 *In vitro* Zellkultur Methoden (*in vivo* Methoden)

2.2.9.1 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen mittels Lipofektion

Für transiente Transfektionen wurden H1299-Zellen in 6 cm Schalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90-95 % nach Herstellerangaben mittels Lipofektion (Lipofectamine 2000, Invitrogen) transfiziert. Die DNA und Lipofectamin wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt (1 µg DNA mit 1 µl Lipofectamine). Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 5-10 % der Gesamt-DNA-Menge eines für β-Galaktosidase kodierenden Expressionsplasmids transfiziert.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Spatel abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 3000 g in einer Minitisch-Zentrifuge (Eppendorf) geerntet und das Zellpellet in 150-200 µl TNN-Puffer mit Proteaseinhibitoren (2.1.1) für 30 min auf Eis lysiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 16.000 g für 30 min bei 4°C. Der dabei gewonnene Überstand wurde entweder für eine Koimmunpräzipitation (2.2.10) eingesetzt oder direkt mit Laemmlipuffer versetzt.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und zum Angleichen der einzelnen Proben untereinander wurden 5-10 µl des Lysats in Doppelbestimmungen eingesetzt, um die β-Galaktosidase-Aktivität zu bestimmen. Auf Eis wurden zu dem Lysat in einer 96-Loch-Mikrotiter-Platte jeweils 120 µl Puffer Z (2.1.1) und 5 µl ONPG (2.1.1) gegeben, gemischt und lichtgeschützt bei 37°C bis zu einer sichtbaren Gelbfärbung (15-30 min) inkubiert. Die Absorption wurde in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 410 nm gemessen. Als Nullwert diente das Lysat untransfizierter Zellen.

Für stabile Transfektionen wurden H1299-Zellen in 6 cm Kulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90-95 % nach Herstellerangaben mittels Lipofektion mit 2-5 µg DNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen auf 10 cm Schalen überführt. Wiederum nach 24 h erfolgte die Zugabe des Selektionsantibiotikums, welches dem Resistenzgen auf dem Expressionsplasmid entspricht. Nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle für eine effiziente Selektion. Im Falle eines Neomycin-Resistenz-Gens wurde mit 800 µg/ml Geneticin (G418) selektioniert, bei einer Puromycin-Resistenz wurde mit 4 µg/ml selektioniert.

2.2.9.2 Halbwertszeitmessungen mittels Cycloheximid

Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 % mit 50 µg/ml Cycloheximid-haltigem Medium (2.1.1; Sigma) versetzt. Die Kontrollplatten wurden mit dem entsprechenden Volumen Methanol behandelt. Nach 0, 3, 6, 9 und 12 h wurden die Zellen gewaschen und geerntet (2.2.9.1). Die Lyse erfolgte wie unter 2.2.9.1 beschrieben. Zum Angleich der Proteingehalte wurde die Proteinkonzentration (2.2.6.5) bestimmt.

2.2.9.3 Stabilisierung mittels MG132

Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 % mit proteasomalem Inhibitor-haltigem Medium (MG 132, Sigma, Stock 10 mM in DMSO) versetzt. Die Kontrollplatte wurde mit dem entsprechenden Volumen DMSO behandelt. Die Standardbedingungen waren dabei 10 µM MG132 für 4 h. Anschließend wurden Zellpellets gewonnen und nach 2.2.9.1 weiter aufgearbeitet.

2.2.9.4 RNA Interference

Zur Identifizierung der besten Zielsequenzen wurden die Programme der Firma Dharmacon (siRNA design center) und der Firma MWG-Biotech AG (siDesign tool) verwendet. Durch einen „BLAST Search“ (NCBI, „search for short nearly exact matches“) gegen alle humanen bzw. murinen Sequenzen der Genbank wurde ausgeschlossen, dass die identifizierten Sequenzen keiner anderen als der Zielsequenz ähneln. Die synthetischen, doppelsträngigen siRNAs wurden in bereits „annealter“ Form von der Firma MWG-Biotech AG, Deutschland bezogen. Die siRNAs bestanden aus 19 Nukleotiden der RNA-Duplex mit 2 Nukleotiden 3'-Überhang. Nach Herstellerangaben wurden die siRNAs auf 20 µM verdünnt und bei -20°C gelagert.

Zu transfizierende Zellen wurden auf 6 cm Kulturschalen oder auf „cover slips“ in 24-Loch-Kulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 30-50 % mit einer Endkonzentration siRNA von 100 nM transfiziert. Das Protokoll erfolgte nach Elbashir et al., 2001 sowie den Herstellerangaben von Invitrogen über die Verwendung von Oligofectamine. Für eine Transfektion von Zellen in einer 24-Loch-Kulturschale wurden 3 µl (60 pmol) des 20 µM siRNA-Stocks in 50 µl Opti-MEM I Medium (Gibco) verdünnt. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 3 µl Oligofectamine (Invitrogen) mit 12 µl Opti-MEM I Medium für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die verdünnte siRNA und das Oligofectamine gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit 500 µl Optimem I gewaschen und überschichtet. Die siRNA-

Oligofectamine Mischung wurde zu den Zellen gegeben und bei 37°C für 4 h inkubiert. Danach wurden 300 µl eines dreifach FCS-haltigen Mediums hinzugeführt und die Zellen nach 24-96 h aufgearbeitet. Zur Transfektion von Zellen in 6 cm Kulturschalen wurden alle Ansätze verzehnfacht.

2.2.10 Koimmunpräzipitation

Die für die kopräzipitierenden Proteine kodierenden Expressionsplasmide wurden in H1299-Zellen (je zwei 6 cm Schalen) transient transfiziert (2.2.9.1). Als Kontrolle wurde jeweils nur ein Expressionsplasmid mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Zelllyse in TNN-Lysepuffer (2.1.1) mit Proteaseinhibitoren für 30 min auf Eis. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation (16.000 g in einer Minitischzentrifuge) bei 4°C wurde der Überstand mit 30 µl in TNN-Puffer voräquilibrierter Protein A-Sepharose (CL4B, Pharmacia) versetzt und bei 4°C auf dem Rotationsschüttler inkubiert („Preclear“). Die Sepharose wurde nachfolgend präzipitiert und der Überstand mit 1-2 µg Antikörper für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Protein A-Sepharose hinzugeführt und über Nacht bei 4°C im Rotationsschüttler inkubiert. Dann wurde die Sepharose in den Ansätzen durch Zentrifugation präzipitiert und viermal mit jeweils 1 ml TNN-Puffer gewaschen, bevor sie mit Laemmlipuffer versetzt wurden. Es folgten SDS-PAGE (2.2.6.1) und Westernblot (2.2.6.4).

2.2.11 *In vivo* Ubiquitinierungsassays

Zur Transfektion für *in vivo* Ubiquitinierungsassays wurden pro Ansatz zwei 6 cm Platten verwendet. Pro Platte wurden jeweils 5 µg eines für His-Ubiquitin kodierenden Expressionsplasmids mittels Lipofectamine (2.2.9.1), sowie 3-4 µg des für das Ubiquitinierungssubstrat kodierende Protein und 500 ng eines β-Galaktosidasekonstruktes transfiziert. Sollte der Einfluss eines weiteren Proteins untersucht werden, wurden noch zusätzlich dessen Expressionskonstrukt oder zur Kontrolle der entsprechende Leervektor transfiziert. Es wurde jeweils 1 µg DNA mit 1 µl Lipofectamine verwendet. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und gewaschen (2.2.9.1). Das Pellet der Zellen von zwei 6 cm Platten wurde in 400 µl PBS resuspendiert und 40 µl davon in ein neues Reaktionsgefäß überführt und präzipitiert. Die Lyse erfolgte in 40 µl TNN-Puffer (2.1.1), die Transfektionseffizienz wurde über die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt und nach dieser

entsprechend die Volumina der restlichen in PBS resuspendierten Zellen angeglichen. Die so angeglichenen Zellmengen wurden pelletiert und in 500 µl Guanidin-Hydrochlorid-Lysepuffer (2.1.1) für 30 min auf Eis lysiert. Dann wurden 30 µl Protein A-Sepharose (in GuHCl-Puffer gewaschen) pro Ansatz hinzugegeben („Preclear“), wobei die Inkubation für 1 h auf dem Rotationsschüttler bei 4°C erfolgte. Die Sepharose und die restlichen Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (15.000 g, 5 min, 4°C, Eppendorf-Minitisch-Zentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl Nickel-NTA-Agarose (in GuHCl-Puffer gewaschen; Qiagen) versetzt und über Nacht bei 4°C im Rotationsschüttler inkubiert. Die Ansätze wurden abzentrifugiert (16.000 g, 5 min) und das Präzipitat zweimal mit je 1 ml GuHCl-Puffer gewaschen. Für weitere Waschschrte wurde der GuHCl-Puffer im Verhältnis 1:5 mit 50 mM Tris/HCl, pH 6,8, 20 mM Imidazol verdünnt. Es wurde wiederum zweimal mit je 1 ml gewaschen. Die letzten 2 Waschschrte erfolgten mit unverdünnten 50 mM Tris/HCl, pH 6,8, 20 mM Imidazol-Puffer. Schließlich wurden die Präzipitate mit zweifach Laemmli-Probenpuffer mit 200 mM Imidazol versetzt und 10 min bei 100°C aufgekocht. Die Proben wurden elektrophoretisch in der SDS-PAGE (2.2.6.1) aufgetrennt und im Westernblot (2.2.6.4) analysiert.

2.2.12 Immunfluoreszenz

Für eine Immunfluoreszenzmikroskopie wurden sterile „cover slips“ in 24-Loch-Platten gelegt und Zellen darauf ausgesät. Nach dem Anwachsen wurden sie gegebenenfalls mit siRNA transfiziert und wachsen gelassen (2.2.9.4). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und danach mit 4 % Paraformaldehyd, pH 6,5 für 1 h bei Raumtemperatur fixiert. Wieder wurde mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten nun entweder bei 4°C gelagert oder permeabilisiert werden. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen 2 min auf Eis mit einer frischen Lösung aus 0,1 % TritonX-100/0,1 % Natriumcitrat versetzt und wiederum mit PBS gewaschen. Die „cover slips“ wurden aus der 24-Loch-Platte auf einen mit Parafilm beschichteten Untergrund mit den Zellen nach oben gelegt. Es erfolgte ein Blockierschritt mit 1 % BSA/PBS für 5 min und eine Inkubation mit dem ersten Antikörper (Herc2 1:125 in 2 % FCS/PBS, 50 µl pro „cover slip“) für 1 h in einer feuchten Kammer. Danach wurde viermal mit 500 µl PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Alexa Fluor 568 goat anti-Maus IgG, Invitrogen, 1:1000 in PBS) erfolgte für 1 h im Dunkeln in einer feuchten Kammer.

Wiederum wurde mit PBS gewaschen, dann folgten Waschschrte mit H₂O sowie mit 100 % Ethanol. Nach dem die „cover slips“ getrocknet waren, wurden sie mit ca. 5 µl VECTASHIELD-Mounting Medium mit DAPI (4',6 diamidino-2-phenylindole; Vector laboratories) mit den Zellen nach unten auf einem Objektträger befestigt. Die Aushärtung erfolgte meist über Nacht. Die Zellen wurden dann in einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan 2 imaging) bei entsprechenden Wellenlängen untersucht.

2.2.13 Subzelluläre Fraktionierung

Zur Fraktionierung von HEK- (oder H1299) Zellen in Membran-, Kern- und Cytosol-Fractionen wurden diese zunächst gewaschen und von einer 6-10 cm Platte abgeschabt und bei 1000 g geerntet. Das Pellet wurde in 500 µl Aufschlusspuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 10 mM EDTA, 250 mM Sucrose und Proteaseinhibitoren) aufgenommen und durch eine Spritze (10 mal 27 gauge Kanüle) aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 500 g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet, welches die Zellkerne enthält und eventuell unaufgeschlossene Zellen, wurde wiederum in Aufschlusspuffer aufgenommen und für die SDS-PAGE mit SDS-Laemmli-Puffer versetzt. Der Überstand wurde 1 h bei 100.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und als cytosolische Fraktion markiert. Das Pellet, welches die Membranfraktion repräsentiert, wurde in Aufschlusspuffer resuspendiert und ebenfalls mit SDS-Probenpuffer nach Laemmli versetzt.

Zur Fraktionierung des Zellkerns wurden HeLa-Zellen einer 10 cm Kulturschale verwendet. Dazu wurden die Platten mit hypotonem-Puffer (2.1.1) gewaschen, abgescharbt und in 2,5 ml schwellen gelassen. Es folgte 20-faches „douncen“ mit einem Homogenisator auf Eis. Die Suspension wurden dann für 5 min bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als cytoplasmatische Fraktion markiert. Das Kernpellet wurde in 2,5 ml Hypotonem-Puffer sowie 125 µl 10 % NP-40 versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation, wurde bei 1.000 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Nucleosol und das Pellet, welches erneut in Puffer resuspendiert wurde, alle strukturegebundenen Proteine. Zur Ankonzentrierung wurden die Extrakte (nach Wessel-Flügge) gefällt. Dazu wurden 250 µl Extrakt mit 200 µl Methanol, sowie 50 µl Chloroform versetzt, 10 s gevortext, 5 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Die obere Phase

wurde verworfen und die untere mit 250 μ l Methanol versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Proteine getrocknet und mit SDS-Probenpuffer (2.1.1) versetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Bindung zwischen Herc2 und E6-AP *in vitro*

Vor Beginn dieser Arbeit war bereits ein „Yeast Two Hybrid Screen“ zur Identifizierung von Bindungspartnern bzw. möglichen Substraten von E6-AP durchgeführt worden. „Gescreen“ wurde hierbei mit katalytisch inaktivem E6-AP, bei welchem das aktive Cystein (C820) der HECT-Domäne durch ein Alanin ersetzt worden war, da bei katalytisch aktivem E6-AP die Möglichkeit bestand, dass es in der Hefe seine potentiellen Substrate ubiquitiniert und sie so für den Abbau markiert. Dabei konnte Herc2 aus einer cDNA-Bibliothek von humanem fötalen Gehirngewebe als Interaktionspartner von inaktivem E6-AP isoliert werden. Allen untersuchten Herc2 Klonen waren cDNA-Sequenzen gemeinsam, die für die zweite der insgesamt drei RCC1-ähnlichen Domänen kodieren.

3.1.1 Bindung von Herc2 an E6-AP *in vitro*

Die im „Yeast Two Hybrid“ beobachtete Interaktion von E6-AP und Herc2 wurde zunächst *in vitro* in GST-Kopräzipitationsassays überprüft. Es wurde die Herc2-Deletionsmutante, welche für die Interaktion im „Yeast Two Hybrid“ ausreichend war und die Aminosäuren 2918-3606 umfasste (Abb. 8A), in Kaninchen-Retikulozytenlysate in Anwesenheit von radioaktiv markiertem [³⁵S]-Methionin translatiert. Das Translatat wurde mit an Glutathion-Sepharose gebundenem GST-E6-AP inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend präzipitiert, gewaschen und das kopräzipitierte Protein nach Auftrennung in der SDS-PAGE durch Fluorographie sichtbar gemacht (Abb. 8B).

Herc2(2918-3606) wurde *in vitro* sehr effizient von GST-E6-AP gebunden (Abb. 8B). Im Folgenden wurde das Experiment in umgekehrter Richtung wiederholt. Hierbei zeigte sich, dass auch *in vitro* translatiertes E6-AP durch GST-Herc2(2918-3606) präzipitiert werden konnte (Abb. 8C), was die im „Two Hybrid“ gefundene Interaktion bestätigte.

Zur Generierung von größeren humanen Herc2-Fragmenten waren keine menschlichen cDNA-Sequenzen verfügbar. Jedoch stellte R. D. Nicolls (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) freundlicherweise eine Maus-Herc2-cDNA zur Verfügung, die sich aus sechs überlappenden Sequenzen zusammensetzt (vgl. 3.4.3 und Ji et al., 1999).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, weisen das Herc2 der Maus und des Menschen in der Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit von 99 % auf und sind zu 95 % identisch (Ji et al., 1999). Da auch E6-AP von Maus zu Mensch stark konserviert vorliegt, sollte für die Untersuchung der Interaktion beider Proteine die geringe Aminosäurenabweichung keinen störenden Einfluss haben.

Zur Überprüfung, ob auch eine längere Form von Herc2 mit E6-AP *in vitro* interagieren kann, wurde eine Herc2-Deletionsmutante erstellt, welche die Aminosäuren 2960 bis 4836 umfasst (Abb. 8A). Diese N-terminal verkürzte Form, die mit der RCC1b-Domäne beginnt, aber das natürliche C-terminale Ende enthält, wurde *in vitro* translatiert und mit an Glutathion-(GSH)-Sephrose gebundenem GST-E6-AP inkubiert. Auch hier konnte eine Bindung festgestellt werden (Abb. 8D).

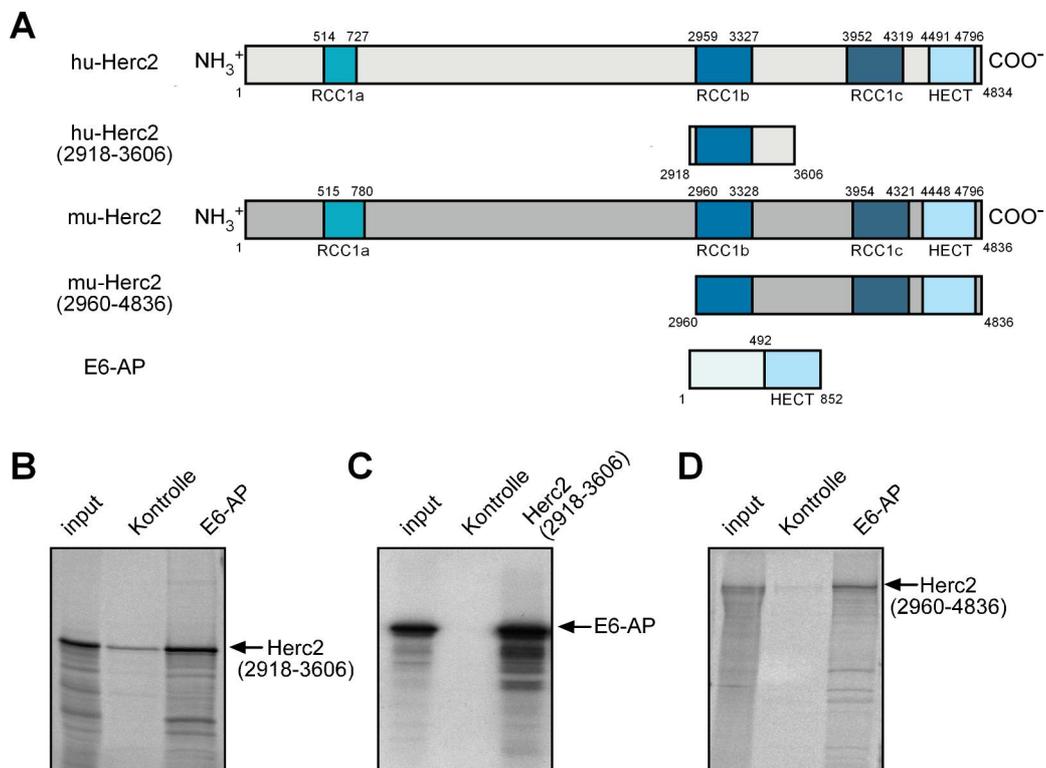


Abb. 8: Herc2 bindet *in vitro* an E6-AP.

(A) Schematische Übersicht über humanes und murines Herc2 mit deren verwendeten Deletionsmutanten und E6-AP. (B) GST-E6-AP bzw. GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Herc2(2918-3606) 4 h inkubiert und danach mit GSH-Sephrose präzipitiert (2.2.8.1). Nach Waschen wurden die kopräzipitierten Proteine in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.6.1). Die Visualisierung der radioaktiv markierten Proteine erfolgte durch Fluorographie (2.2.6.3). Input, entspricht 20 % der eingesetzten Translatat-Menge. (C) GST-Herc2(2918-3606) bzw. GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem E6-AP und (D) GST-E6-AP bzw. GST wurden mit *in vitro* translatiertem Herc2(2960-4836) inkubiert, präzipitiert und analysiert (8 %ige SDS-PAGE), wie in (B) beschrieben.

3.1.2 Minimaler Bindebereich auf Herc2 für die Bindung an E6-AP

Die im „Yeast Two Hybrid“ isolierte Herc2-Sequenz umfasst die RCC1b-Domäne von Herc2, sowie weitere 320 Aminosäuren C-terminal der RCC1b-Domäne. Es stellte sich die Frage, ob die RCC1b-Domäne (Abb. 9A) oder der nicht weiter charakterisierte Bereich ausreichend für die Bindung an E6-AP sei. Daher wurde die humane RCC1b-Domäne von Herc2 *in vitro* translatiert und auf eine Bindung mit GST-E6-AP getestet. Umgekehrt wurde GST-RCC1b erzeugt und mit *in vitro* translatiertem E6-AP auf Kopräzipitation überprüft. In beide Richtungen konnte Bindung detektiert werden (Abb. 9B und C). Somit konnte gezeigt werden, dass die RCC1b-Domäne von Herc2 für eine Bindung an E6-AP *in vitro* ausreichend ist. Zur weiteren Kontrolle, dass kein Unterschied in der Bindung zwischen humanem und murinem Herc2 besteht, wurde ebenfalls die murine RCC1b-Domäne *in vitro* translatiert und mit GST-E6-AP inkubiert, präzipitiert und analysiert. Es konnte kein Unterschied in der Bindung von murinem oder humanem RCC1b/Herc2 mit E6-AP festgestellt werden (Abb. 9D). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird daher nicht weiter zwischen humanem und murinem Herc2 unterschieden.

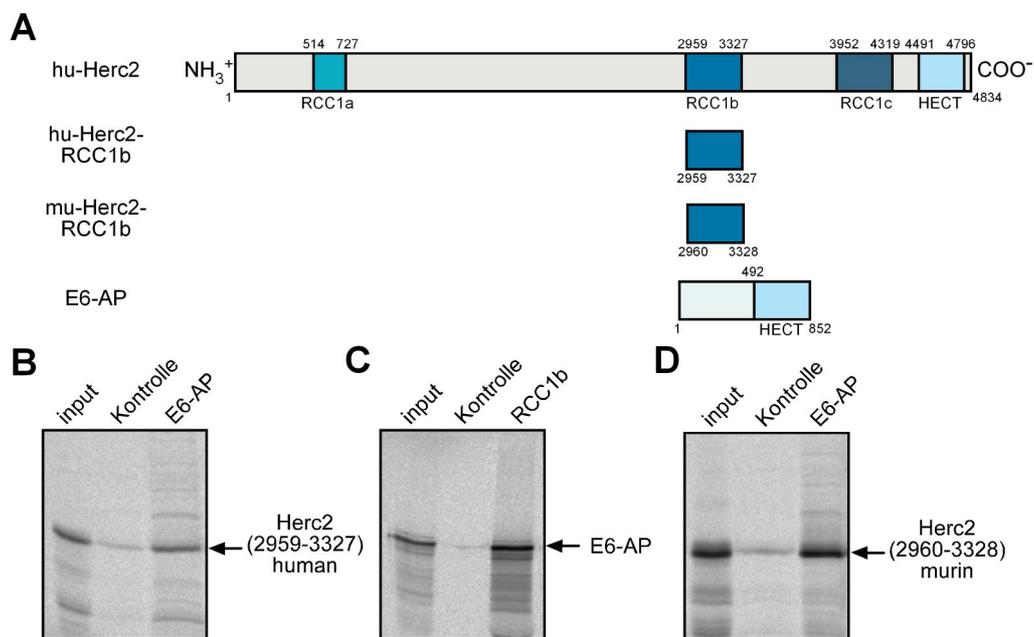


Abb. 9: Herc2 interagiert über seine RCC1b-Domäne mit E6-AP.

(A) Schematische Darstellung von humanem Herc2, der RCC1b-Domänen von Maus und Mensch als verwendete Deletionsmutanten, sowie E6-AP. (B) GST-E6-AP und GST als Kontrolle wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem humanem RCC1b 4 h inkubiert, präzipitiert und gewaschen. Die Auftrennung erfolgte in einer 12 %igen SDS-PAGE, der Nachweis durch Fluorographie. (C) GST-RCC1b und GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem E6-AP inkubiert und dann präzipitiert (2.2.8.1). Die Präzipitationsansätze wurden gewaschen, in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht (2.2.6.1, 2.2.6.3). (D) wie (B), mit der Ausnahme, dass *in vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes murines RCC1b verwendet wurde. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten *in vitro*-Translatats.

3.1.3 Spezifität der Bindung von E6-AP an die RCC1b-Domäne von Herc2

Zur Überprüfung, ob RCC1-ähnliche Domänen ein allgemeines Erkennungsmotiv von E6-AP darstellen, wurden GST-Fusionsproteine mit den zwei anderen RCC1-ähnlichen Domänen von Herc2 erstellt (RCC1a und RCC1c), sowie der zweiten RCC1-ähnlichen Domäne von Herc1 (RLD2) (Abb. 10A). Die RLD2-Domäne des Proteins Herc1 weist im Aminosäuresequenzabgleich mit der RCC1b-Domäne von Herc2 eine große Ähnlichkeit auf. Nach einem Aminosäureabgleich der RCC1b-Domäne mit RCC1-ähnlichen Domänen sind nur RCC1a und RCC1c von Herc2 zu RCC1b ähnlicher als die RLD2-Domäne von Herc1.

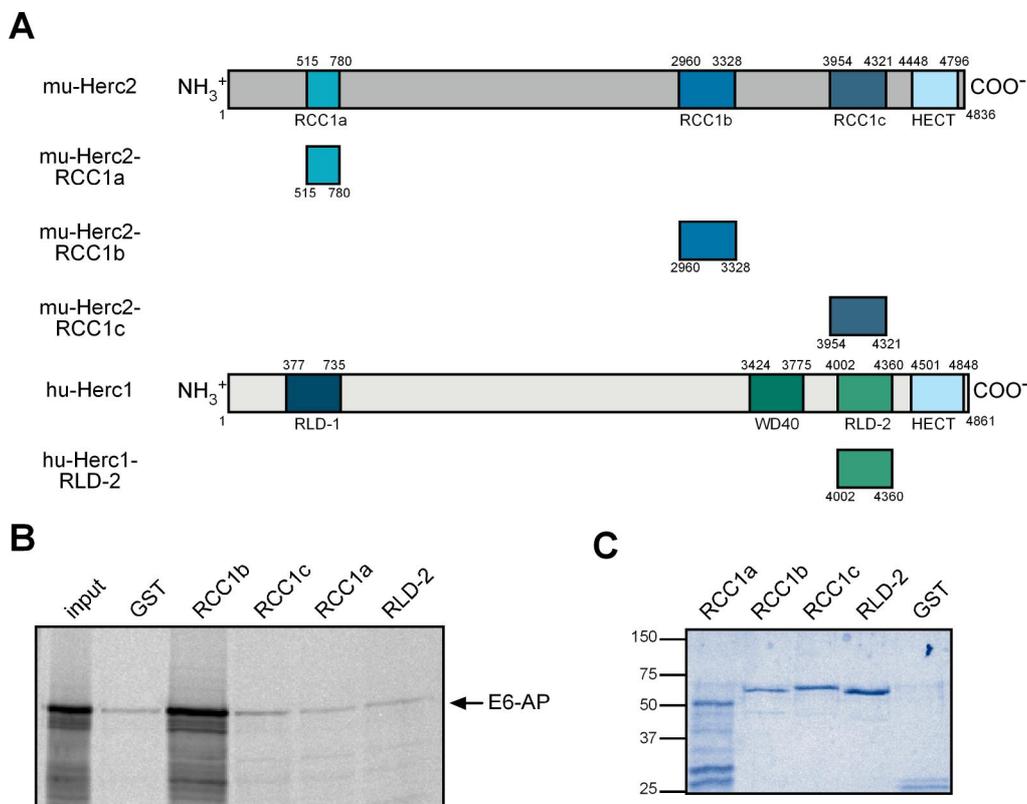


Abb. 10: Die Bindung zwischen der RCC1b-Domäne und E6-AP ist spezifisch.

(A) Schematische Darstellung von humanem Herc2 und Herc1 und deren verwendeten Deletionsmutanten. (B) GST-Fusionsproteine von RCC1a, RCC1b, RCC1c und RLD2, sowie GST als Kontrolle wurden mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem E6-AP inkubiert, präzipitiert und gewaschen. Die Auftrennung erfolgte in einer 8 %igen SDS-PAGE. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten *in vitro*-Translatats. (C) ca. 10 % der unter (B) eingesetzten GST-Fusionsproteine wurden in einer 12,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt (2.2.6.2).

Es konnte jedoch nur eine Bindung mit der RCC1b-Domäne von Herc2 beobachtet werden (Abb. 10B). Somit scheinen RCC1-ähnliche Domänen keine generellen Erkennungsmotive von E6-AP zu sein. Die Bindung von E6-AP an die RCC1b-Domäne von Herc2 kann folglich als spezifisch angenommen werden.

3.1.4 Bindung zwischen gereinigtem E6-AP und der RCC1b-Domäne von Herc2

Alle bisherigen Versuche wurden in Anwesenheit von Retikulozytenlysat durchgeführt. Somit konnte die Möglichkeit bestehen, dass die Bindung der beiden Proteine nicht direkt verläuft, sondern von einem oder mehreren Proteinen aus dem Lysat vermittelt würde. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde GST-RCC1b aus *E. coli* gewonnen und mit E6-AP, welches im Baculovirussystem exprimiert und anschließend über Anionenaustauschchromatographie gereinigt wurde, inkubiert. Es folgten Präzipitation, Waschschriffe, sowie eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung.

Auch unter diesen Bedingungen konnte eine Bindung nachgewiesen werden (Abb. 11). Es kann daher nahezu ausgeschlossen werden, dass ein weiterer Faktor an der Bindung beteiligt ist. Die Bindung zwischen E6-AP und der RCC1b-Domäne ist somit unabhängig von anderen Bindungspartnern.

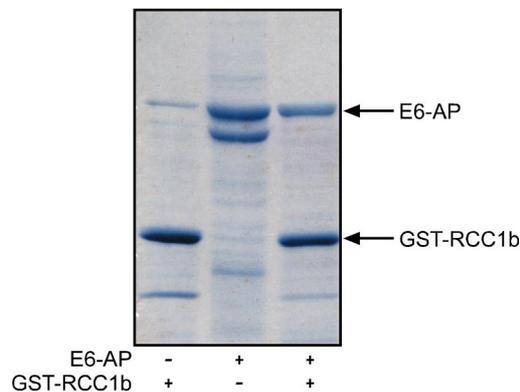


Abb. 11: Die Bindung zwischen RCC1b und E6-AP ist von anderen Bindungspartnern unabhängig.

GST-RCC1b wurde mit im Baculovirussystem exprimiertem E6-AP inkubiert und dann gewaschen. Das Präzipitat wurde in einem 10 %igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt (2.2.6.1, 2.2.6.2).

3.1.5 Minimaler Bindebereich auf E6-AP für die Bindung an Herc2

Nachdem der Bindebereich von Herc2 auf die RCC1b-Domäne eingegrenzt werden konnte, war nun von Interesse den Bindebereich auf E6-AP einzuschränken. Anhand von Daten über den Bindebereich auf E6-AP, könnten erste Schlüsse über die Funktion der Bindung gezogen werden. So hätte z. B. eine Bindung an die Bindestelle des viralen E6-Proteins des humanen Papillomvirus oder an die HECT-Domäne zu sehr interessanten Spekulationen führen können.

Aus früheren Untersuchungen standen schon eine Reihe von E6-AP-Deletionsmutanten zur Verfügung. Zur vollständigen Einschränkung des Bindebereiches mussten aber weitere Mutanten konstruiert werden. So zeigten erste Bindungsstudien, dass die Bindung von E6-AP an RCC1b unabhängig von der katalytisch aktiven HECT-Domäne war. Schließlich konnte der N-Terminus auf die Aminosäuren 150 bis 200 von E6-AP als kleinster notwendiger Bereich eingeschränkt werden (Abb. 12A und B).

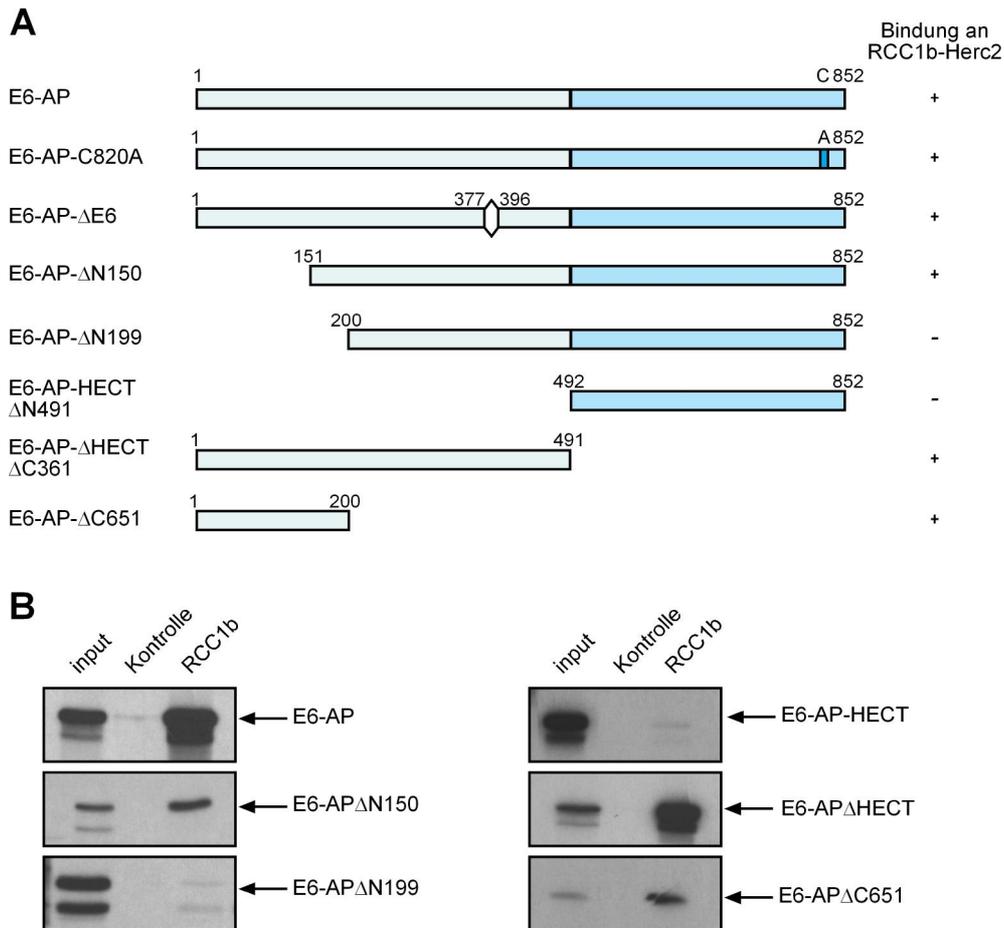


Abb. 12: Zur Bindung an Herc2 werden die Aminosäuren 150-200 von E6-AP benötigt.

(A) Schematische Übersicht über die verwendeten E6-AP-Deletionsmutanten zur Einschränkung des Bindebereiches. Die Fähigkeit der einzelnen Mutanten an GST-RCC1b binden zu können ist angegeben: +, Bindung wurde beobachtet; -, es konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Die Nummerierung der Aminosäurepositionen erfolgte entsprechend der E6-AP-Isoform 1 (Yamamoto et al., 1997). (B) Die angegebenen E6-AP-Formen wurden *in vitro* in Retikulozytenlysat in Gegenwart von [³⁵S]-markiertem Methionin translatiert und mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-RCC1b oder GST (Kontrolle) inkubiert. Die kopräzipitierten, [³⁵S]-markierten Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten *in vitro*-Translatats.

Über diesen Bereich von E6-AP war bisher nichts bekannt. Es wurde in den Datenbanken mit den 50 Aminosäuren nach Proteinen gesucht, die eine Ähnlichkeit mit diesen aufweisen. Dies hätte zur Identifizierung von weiteren möglichen Interaktionspartnern von

Herc2 führen können. Jedoch war die Ähnlichkeit zu anderen Proteinen so gering, dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

3.2 Charakterisierung der Bindung zwischen Herc2 und E6-AP *in vivo*

In dieser Arbeit werden alle Versuche, die mittels Zellkultur durchgeführt wurden, als „*in vivo*“ bezeichnet.

3.2.1 Bindung von Herc2 an E6-AP unter Überexpressionsbedingungen

Nachdem gezeigt worden war, dass E6-AP an die RCC1b-Domäne von Herc2 *in vitro* binden konnte, wurde überprüft, ob eine Interaktion auch in humanen Zellen vorliegt.

Zunächst wurden Koimmunpräzipitationsexperimente mit überexprimiertem E6-AP und dem humanen Herc2-Fragment (Aminosäuren 2918 bis 3606) durchgeführt. Dazu wurde die humane Bronchialkarzinom-Zelllinie H1299 mit für HA-E6-AP- und FLAG-Herc2(2918-3606)-kodierenden Expressionsvektoren transient kotransfiziert. Als Kontrolle für eine spezifische Immunpräzipitation wurde jeweils nur der eine Expressionsvektor mit dem entsprechenden Leervektor kotransfiziert. 24 h später wurden die Zellen aufgeschlossen und das FLAG-markierte Herc2(2918-3606) durch einen monoklonalen FLAG-Antikörper, welcher an Protein A-Sepharose gekoppelt war, immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte ein Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HA. HA-E6-AP konnte detektiert werden, wenn es mit FLAG-Herc2(2918-3606) kotransfiziert worden war. Die Kontrollen mit nur einem Expressionskonstrukt waren dagegen negativ. Dass FLAG-Herc2(2918-3606) exprimiert wurde und durch den FLAG-Antikörper gefällt werden konnte, wurde mit dem FLAG-Antikörper im Westernblot überprüft (Abb. 13A).

Um nachzuweisen, ob die Bindung auch in die andere Richtung stattfinden kann, wurden für FLAG-E6-AP- und HA-Herc2(2918-3606)-kodierende Expressionskonstrukte kotransfiziert. FLAG-E6-AP wurde mit dem FLAG-Antikörper gefällt und die Koimmunpräzipitation von HA-Herc2(2918-3606) im anschließenden Westernblot nachgewiesen (Abb. 13B).

Im Folgenden war zu zeigen, ob auch die Herc2(2960-4836)-Deletionsmutante, die das natürliche C-terminale Ende von Herc2 umfasst, eine Bindung mit E6-AP eingehen kann. Es konnte die Möglichkeit bestehen, dass diese Mutante in der Zelle anders gefaltet wird

als *in vitro* und somit die E6-AP-Bindestelle auf Herc2 nicht zugänglich wäre. Es wurden erfolgreich HA- und FLAG-markierte Fusionsexpressionskonstrukte von Herc2(2960-4836) erstellt. Jedoch wurde das HA-Herc2(2960-4836) schon ohne weitere Koexpression eines FLAG-Konstruktes vom FLAG-Antikörper präzipitiert oder band unspezifisch an die Protein A-Sepharose. Deshalb war es mit diesem Konstrukt im Koimmunpräzipitationsexperiment nur möglich den HA-Antikörper an die Protein A-Sepharose zu koppeln und im Westernblot den FLAG-Antikörper einzusetzen. Tatsächlich konnte unter diesen Bedingungen eine Bindung von koexprimiertem FLAG-E6-AP an HA-Herc2(2960-4836) nachgewiesen werden (Abb. 13C).

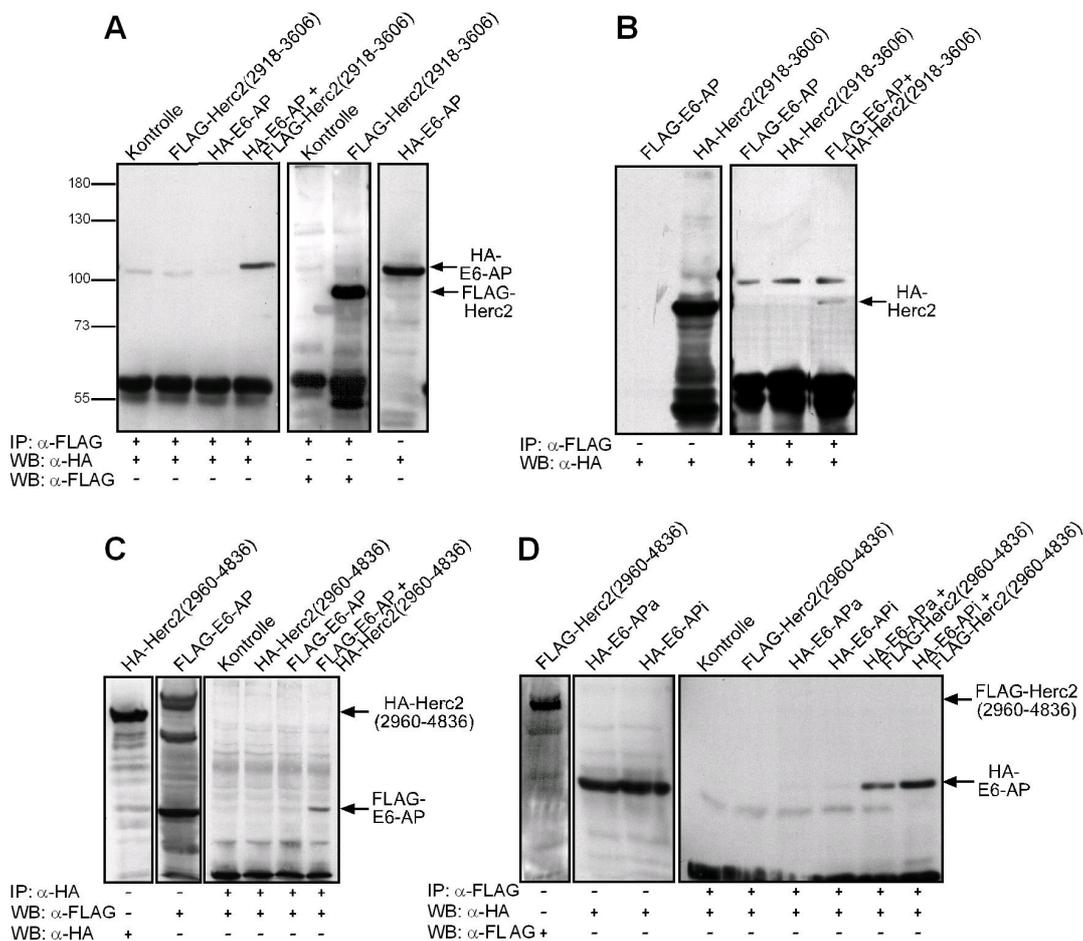


Abb. 13: Herc2(2918-3606) und Herc2(2960-4836) interagieren mit E6-AP *in vivo*.

(A) und (B) FLAG-Herc2(2918-3606)- und HA-E6-AP- (A) bzw. HA-Herc2(2918-3606)- und FLAG-E6-AP- (B) kodierende Expressionsplasmide wurden in H1299-Zellen, sowie zur Kontrolle einzeln mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert (2.2.9.1). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Die Immunpräzipitation (2.2.10) erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das FLAG-Epitop. Die gewaschenen Präzipitate wurden in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und im anschließenden Westernblot mit dem monoklonalen HA-Antikörper nachgewiesen (2.2.6.4). Expressionskontrollen erfolgten mit den angegebenen Antikörpern. (C) Analog zu (B) wurde ein größeres Herc2-Konstrukt verwendet (HA-Herc2(2960-4836)), die Immunpräzipitation erfolgte mit dem monoklonalen HA-Antikörper und der Nachweis im Westernblot mit dem monoklonalen FLAG-Antikörper. (D) Analog zu (A) mit der Ausnahme, dass es sich bei dem FLAG-Herc2-Expressionskonstrukt von Herc2 um FLAG-Herc2(2960-4836) handelte, HA-E6-APa/i, aktives/inaktives E6-AP. Expressionskontrollen entsprechen 50 % der für die Immunpräzipitation eingesetzten Menge. IP, Immunpräzipitation; WB, Westernblot.

Für die Überprüfung in anderer Richtung wurde FLAG-Herc2(2960-4836) mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers präzipitiert. Die Koimmunpräzipitation wurde im anschließenden Westernblot gezeigt (Abb. 13D). Dabei fiel auf, dass die inaktive E6-AP-Mutante, dessen katalytisches Cystein durch ein Alanin ersetzt worden war, Herc2(2960-4836) effizienter fällen konnte als katalytisch aktives E6-AP. Beide Proteine wurden in gleicher Menge exprimiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Bindung von Herc2 und E6-AP auch in humanen Zellen möglich ist, und dass vermutlich auch das Gesamtlängen-Herc2-Protein mit E6-AP interagieren kann.

3.2.2 Nachweis von endogenem Herc2 mittels poly- und monoklonaler Antikörper

Um weitere Erkenntnisse über die physiologische Relevanz der Bindung zwischen Herc2 und E6-AP zu erhalten, war es notwendig, auch das Gesamtlängen-Herc2-Protein nachweisen zu können.

Da, wie in der Einleitung beschrieben, Herc2 eine kalkulierte molekulare Masse von 528 kDa hat, wurde zunächst davon abgesehen, ein Gesamtlängen-Expressionskonstrukt zu generieren. Es wurde angenommen, dass sowohl in unserem angewandten *in vitro*-System als auch in transienten Transfektionsassays mit Proteinen dieser Größe nicht effektiv zu arbeiten sei.

So stellte ein spezifischer Herc2-Antikörper, mit dem endogenes Herc2 in Zellen nachweisbar oder aus Zelllysaten immunpräzipitierbar wäre, ein unerlässliches Mittel dar. Bereits vor Beginn dieser Arbeit wurden spezifische Antiseren gegen Herc2 erstellt. Zu diesem Zeitpunkt lagen noch keine weiteren Herc2-cDNA-Sequenzen zur Generierung von größeren Expressionskonstrukten vor, so dass sich bei der Auswahl des Immunogens auf den Sequenzbereich des im „Two Hybrid“ gefundenen Herc2(2918-3606)-Fragmentes beschränkt wurde. Da auf die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen Maus und Mensch geachtet wurde, sollte mit Hilfe dieses Antikörpers sowohl humanes als auch murines Herc2 detektierbar sein. Es wurde mit einem 16 Aminosäuren langen Peptid (H₂N-CVTELEDVATDSQSGR-COOH), welches den Maus-Herc2-Aminosäuren 3593-3608 und im Humanen den Aminosäuren 3591-3606 entspricht, immunisiert.

Wie oben erwähnt, lagen die Seren (nach der Nomenklatur von Eurogentec als #910 und #1024 bezeichnet) von zwei immunisierten Kaninchen bereits zu Beginn dieser Arbeit vor und wurden zunächst charakterisiert.

Zum Nachweis der Sensitivität wurden GST-Fusionsproteine von Herc2(2918-3606) bzw. Herc2(2960-3327) mittels GSH-Sepharose aufgereinigt und eluiert. Nach erfolgter Proteinbestimmung wurden verschiedene Mengen (50 ng, 250 ng und 500 ng) elektrophoretisch in der SDS-PAGE aufgetrennt und im anschließenden Westernblot analysiert. Als negativ Kontrolle diente GST-Herc2(2960-3327), welches die Antigensequenz nicht enthält. Dort konnten mit den polyklonalen Herc2-Antikörpern keine Banden detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurden mit den Präimmunsereen keine spezifischen Banden auf der erwarteten Laufhöhe von GST-Herc2(2918-3606) erkannt (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der Antiseren zeigte, dass das Serum #1024 sensitiver war als #910 (Abb. 14A). Während das Serum #1024 bei 50 ng GST-Herc2(2918-3606) ein starkes Signal ergab, zeigte das Serum #910 ein sehr Schwaches bei hohem Hintergrund. Als am besten geeignet erwies sich eine Verdünnung von 1:1000 (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurde ausschließlich mit dem Antiserum #1024 gearbeitet.

Zur Überprüfung, ob die Antikörper auch in humanen Zellen exprimiertes Herc2 erkennen, wurden verschiedene Mengen (100 ng, 200 ng, 400 ng, 800 ng und 1600 ng DNA) des HA-Herc2(2918-3606)-Expressionskonstruktes in H1299 Zellen transient transfiziert. Nach 24 h folgte die Zellyse, sowie die Auftrennung in der SDS-PAGE. Anhand des nachfolgenden Westernblots, konnte die Eignung des Antiserums für die Westernblotanalyse von Zelllysaten belegt werden (Daten nicht gezeigt). Da das Serum eine hohe Hintergrundaktivität aufwies, wurde es im Folgenden aufgereinigt. Es wurde als Methode die Affinitätsaufreinigung gewählt (2.2.7, Bar-Peled und Raikhel, 1996). Dabei wurde GST-Herc2(2918-3606) an GSH-Sepharose „gecrosslinkt“ und mit dem Antiserum inkubiert. Die nach Waschen eluierten Antikörper wurden in der Westernblotanalyse getestet. Dazu wurden, wie oben beschrieben, H1299-Zellen mit dem für HA-Herc2(2918-3606)-kodierenden Expressionskonstrukt transfiziert. Es zeigte sich, dass die Aufreinigung funktioniert hat und HA-Herc2(2918-3606) nahezu hintergrundsfrei nachgewiesen werden konnte (Abb. 14B). Allerdings erwies sich der gereinigte Antikörper nur über einen sehr geringen Zeitraum als stabil.

Im Prinzip schien es also möglich, mit Hilfe des gereinigten oder ungereinigten Antiserums, endogenes Herc2 aus Zelllysaten nachweisen zu können. Jedoch gelang es, auch nach ausgiebigen Testen (z. B. verschiedener Blotmethoden, Transferzeiten oder Membranen sowie Zelllysaten verschiedener Zelllinien oder Blot mit und ohne

Immunpräzipitation) nicht, eine spezifische Bande, die mit der Größe von Herc2 übereinstimmen könnte, im Westernblot zu detektieren. Die Immunpräzipitationsversuche sollten der Anreicherung von endogenem Herc2 dienen. Wahrscheinlich war der Antikörper nicht sensitiv genug oder das Antikörperepitop für den Antikörper nach der Denaturierung nicht zugänglich oder erkennbar. Auch bestand zu diesem Zeitpunkt der Arbeit die Möglichkeit, dass Herc2 unter normalen Bedingungen in der Zelle nicht oder nur sehr gering exprimiert vorlag.

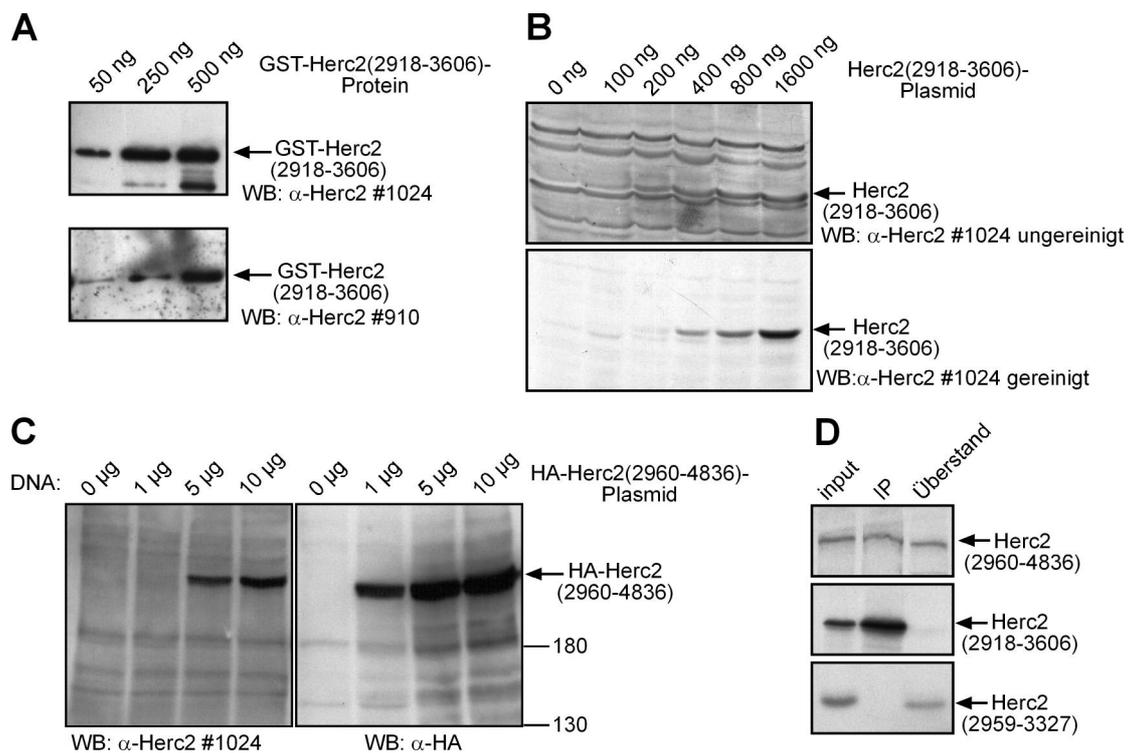


Abb. 14: Charakterisierung der polyklonalen anti-Herc2-Seren

(A) In *E. coli* exprimiertes GST-Herc2(2918-3606) wurde über GSH-Sepharose aufgereinigt und eluiert (2.2.5.1). Verschiedene Proteinmengen (50-500 ng) wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert, welche nachfolgend mit den polyklonalen anti-Herc2-Seren #910 und #1024 in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert wurde. (B) In H1299 Zellen wurden verschiedene Mengen (100-1600 ng) eines für HA-Herc2(2918-3606)-kodierenden Expressionsplasmids transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h aufgeschlossen und die Lysate in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Westernblotanalyse wurden das gereinigte bzw. das ungereinigte #1024-Herc2-Antiserum eingesetzt. (C) H1299 Zellen wurden mit einem für HA-Herc2(2960-4836)-kodierenden Expressionsplasmid transfiziert (1-10 µg). Für den Westernblot wurden das ungereinigte #1024 Herc2-Antiserum sowie der monoklonale HA-Antikörper verwendet. (D) *In vitro*-Translatate von Herc2(2959-3327), (2918-3606) bzw. (2960-4836) wurden mit jeweils 4 µl polyklonalem #1024-Herc2-Antiserum, sowie Protein A-Sepharose inkubiert. Die Präzipitate wurden gewaschen und in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte durch Fluorographie. Input und Überstand betragen 20 % des für die IP eingesetzten *in vitro*-Translatats. IP, Immunpräzipitation; WB, Westernblot.

Als Beleg, dass die Sensitivität zur Detektion von endogenem Herc2 nicht hoch genug war, konnte ein Vergleich zwischen dem polyklonalen Herc2-Antikörper und dem monoklonalen HA-Antikörper dienen. Dazu wurden in H1299 Zellen verschiedene

Mengen (1-10 µg DNA) HA-Herc2(2960-4836) exprimiert und die Westernblotmembran mit dem HA-Antikörper oder dem Herc2-#1024-Antikörper dekoriert (Abb. 14C). Es zeigte sich, dass der monoklonale HA-Antikörper HA-Herc2(2960-4836) besser erkennt als der gegen Herc2 gerichtete Antikörper.

Zur Untersuchung, warum eine Anreicherung von endogenem Herc2 aus Zelllysaten durch Immunpräzipitation eventuell nicht möglich wäre, wurden die in Abbildung 14D angegebenen Herc2-Expressionskonstrukte *in vitro* translatiert und mit dem polyklonalen Herc2-Antikörper präzipitiert. Während die negativ Kontrolle Herc2(2959-3327) nicht vom Antikörper gefällt wurde, konnte Herc2(2918-3606) quantitativ und das längere Herc2(2960-4836) zu weniger als ein Fünftel gefällt werden (Abb. 14D). Dieses Ergebnis deutet an, dass das endogene Herc2 wahrscheinlich noch schlechter präzipitiert werden konnte und somit eine Anreicherung nicht möglich war. Zur Detektion im Westernblot war vermutlich die Sensitivität zu gering.

Zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit konnte ein monoklonaler Herc2-Antikörper kommerziell erworben werden. Die Firma BD Bioscience wählte dabei als Immunogen ein Peptid, welches sich über die Aminosäuren 1781 bis 1974 erstreckte. Es gelang mit diesem Antikörper in allen getesteten Zelllysaten eine Bande weit über der letzten Markerbande (180 kDa) nachzuweisen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Herc2 zugeordnet werden kann (Abb. 15; siehe auch 3.3.4).

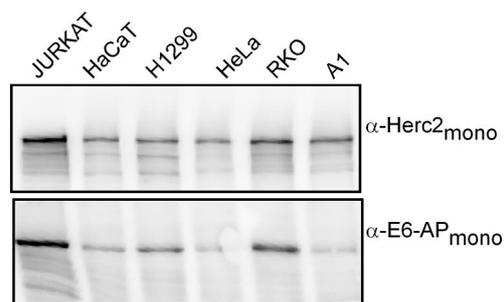


Abb. 15: Nachweis von endogenem Herc2

Zellen der angegebenen Zelllinien wurden aufgeschlossen und die Lysate über Proteinbestimmung angeglichen. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 3-15 %igen Stufengradientengel, wurden die Proteine auf PVDF-Membran (33 Volt, 1000 min) transferiert. Die Westernblotanalyse erfolgte mit einem monoklonalen Herc2- bzw. E6-AP-Antikörper.

3.2.3 Bindung von endogenem Herc2 an E6-AP

Zur Überprüfung, ob auch endogenes Herc2 an E6-AP binden kann, wurden GST-Fusionsexpressionskonstrukte von E6-AP, einer C-terminalen Deletionsmutante von E6-AP (GST-E6-AP(1-500)) und einer N-terminalen Deletionsmutante von E6-AP, die nur die HECT-Domäne von E6-AP umfasste (GST-E6-AP(HECT)), in *E. coli* exprimiert und anhand des GST-Anteils aufgereinigt. Die gewaschene Sepharose wurde mit Zelllysate aus Jurkatzellen (T-Zelllyphoma), die beschrieben sind, einen hohen Herc2-mRNA Gehalt zu haben (Scarafia et al., 2000) und bei denen auch im Westernblot das Herc2-Protein gut nachgewiesen werden konnte (Abb. 15), inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Sepharose erneut gewaschen und mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach Auftrennung in einem 3-15 %igen Gradientengel folgte ein Transfer auf PVDF-Membran. Die Westernblotanalyse erfolgte mit dem monoklonalen Herc2-Antikörper. Endogenes Herc2 konnte mit dem vollständigen E6-AP und mit der C-terminalen E6-AP-Deletionsmutante präzipitiert werden. Die Kontrollen GST sowie die HECT-Domäne banden nicht an Herc2 (Abb. 16). Es konnte somit gezeigt werden, dass endogenes Herc2 an E6-AP binden kann.

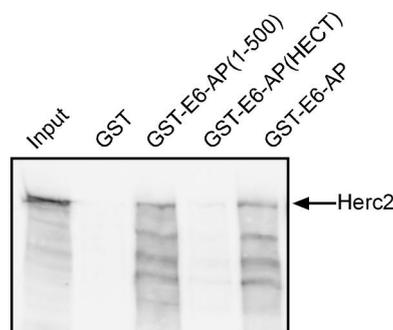


Abb. 16: Endogenes Herc2 bindet an E6-AP.

GST-Fusionsproteine von E6-AP, E6-AP(1-500) und E6-AP(HECT) sowie GST als Kontrolle wurden in *E. coli* exprimiert und über GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die gewaschene Sepharose wurde mit Zelllysate aus Jurkatzellen über Nacht inkubiert, wiederum gewaschen und in der SDS-PAGE (Gradientengel 3-15 %) aufgetrennt. Der Nachweis im angeschlossenen Westernblot erfolgte mit einem monoklonalen Herc2-Antikörper. Input, 25 % des Gesamtzelllysats, welches für die Präzipitation verwendet wurde.

3.2.4 Bindung von endogenem E6-AP an die RCC1b-Domäne von Herc2

Für die Beantwortung der Frage, ob auch endogenes E6-AP an Herc2 bindet, wurden Zelllysate aus Mausfibroblasten, die aus homozygoten E6-AP „knock out“ Mäusen gewonnen wurden (E6-AP^{-/-}MEFs), im Vergleich zu E6-AP^{+/+}MEFs mit der gereinigten

GST-RCC1b-Domäne von Herc2 inkubiert und anschließend gewaschen. In der Westernblotanalyse konnte E6-AP mit dem monoklonalen E6-AP-Antikörper an der RCC1b-Domäne von Herc2 nachgewiesen werden (Abb. 17).

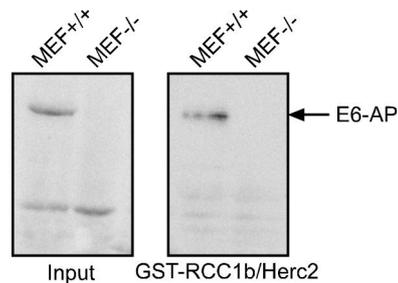


Abb. 17: Endogenes E6-AP bindet an GST-RCC1b.

Eine GST-Fusion der RCC1b-Domäne von Herc2 wurde in *E. coli* exprimiert, mit GSH-Sepharose aufgereinigt und mit Zelllysaten aus Mausfibroblasten inkubiert, die aus homozygoten E6-AP „knock out“ Mäusen (E6-AP^{-/-}-MEFs) oder aus den Kontrollmäusen (E6-AP^{+/+}-MEFs) gewonnen wurden. Nach Präzipitation wurden die Ansätze gewaschen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte im Westernblot mittels eines E6-AP-Antikörpers. Input, 10 % des für die Präzipitation verwendeten Zelllysats.

3.2.5 Bindung von endogenem Herc2 an endogenes E6-AP

Für den Nachweis, ob auch endogenes E6-AP an endogenes Herc2 binden kann, wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Endogenes E6-AP wurde mit dem an Protein A-Sepharose gekoppelten monoklonalen E6-AP-Antikörper gefällt. Nach Waschen des Präzipitats konnte im folgenden Westernblot mit Hilfe des monoklonalen Herc2-Antikörpers Herc2 als schwache Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle der Immunpräzipitation diente der monoklonale HA-Antikörper, welcher ebenso wie der E6-AP-Antikörper ein IgG1-Antikörper ist. In diesem Ansatz konnte kein Herc2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um sicherzustellen, dass der E6-AP-Antikörper nicht direkt an Herc2 bindet, wurde der Versuch mit Zelllysaten aus den E6-AP^{-/-}-MEFs und ^{+/+}MEFs wiederholt. Jedoch konnte nach der SDS-PAGE und dem angeschlossenen Westernblot auch ohne die Anwesenheit von E6-AP Herc2 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings war der Hintergrund im Gegensatz zu den E6-AP^{+/+}-MEF sehr viel stärker, so dass die Vermutung nahe lag, dass das gesamte E6-AP^{-/-}-MEF-Zelllysat unspezifisch band. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der E6-AP-Antikörper Herc2 direkt präzipitierte, wurde dieser Versuchsansatz nicht weiterverfolgt.

Für eine Analyse in umgekehrter Richtung konnten mit dem monoklonalen Herc2-Antikörper keine hinreichenden Mengen Herc2 gefällt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung, ob Herc2 und E6-AP auch endogen als Bindungspartner nachzuweisen sind, ergab sich aus der Tatsache, dass der Bindebereich von Herc2 nicht mit der Bindestelle des viralen Onkoproteins E6 überlappt. Mit E6 als einer Art Affinitätsmatrix, sollte es möglich sein, endogenes E6-AP aus Zelllysat zu präzipitieren und eine Bindung von Herc2 an E6-AP nachzuweisen (Abb. 18A).

Ob ein ternärer Komplex, bestehend aus E6, E6-AP und Herc2, prinzipiell möglich ist, wurde zunächst *in vitro* überprüft. *In vitro* translatiertes Herc2(2918-3606) sowie (2960-4836) wurden mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-E6/16 (HPV Typ 16) inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit und ohne Zugabe von E6-AP, welches aus dem Baculovirussystem gereinigt wurde. Es zeigte sich, dass die verwendeten Herc2-Deletionsmutanten in Anwesenheit von E6-AP an GST-E6/16 binden können (Abb. 18B). Die schwache Bindung von Herc2(2960-4836) an GST-E6/16 ohne zusätzliches E6-AP könnte auf die Anwesenheit des im Retikulozytenlysat vorhandenen Kaninchen-Homolog von E6-AP (Scheffner et al., 1993) zurückzuführen sein.

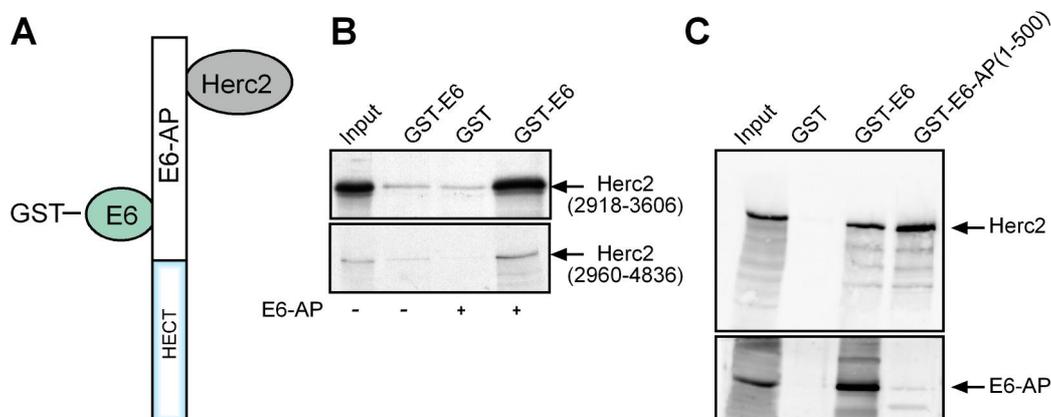


Abb. 18: Endogenes Herc2 bindet an endogenes E6-AP *in vivo*.

(A) Schematische Darstellung eines ternären Komplexes aus E6, E6-AP und Herc2. (B) In *E. coli* exprimiertes GST-E6 vom HPV Typ 16 sowie GST wurden an GSH-Sepharose gekoppelt und gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit *in vitro* translatiertem Herc2(2918-3606) bzw. (2960-4836) mit und ohne Zugabe von im Baculovirussystem exprimierten und gereinigten E6-AP. Die gewaschenen Präzipitationsansätze wurden in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und die [³⁵S]-markierten Proteine durch Fluorographie sichtbar gemacht. Input, 20 % des in der Präzipitation eingesetzten *in vitro*-Translatats. (C) Zelllysat aus Jurkatzellen wurde mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-E6, GST-E6-AP(1-500) und GST inkubiert, präzipitiert, gewaschen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse erfolgte im Westernblot mit einem monoklonalen Herc2- oder E6-AP-Antikörper. Input, 25 % des Gesamtzelllysats, welches für die Präzipitation eingesetzt wurde.

Da gezeigt werden konnte, dass Herc2, E6 und E6-AP prinzipiell einen ternären Komplex *in vitro* eingehen können, wurde im Folgenden GST-E6/16 mit Zelllysate aus Jurkatzellen inkubiert, gewaschen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im angeschlossenen Westernblot analysiert. Mit Hilfe von GST-E6/16 konnte E6-AP aus dem Lysat gebunden werden, nicht aber durch GST alleine (Abb. 18C). Ebenso gelang es nur endogenes Herc2 in dem Ansatz nachzuweisen, in welchem mit GST-E6/16 präzipitiert wurde. Als positiv Kontrolle diente der N-Terminus von E6-AP als GST-Fusion.

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Herc2 und E6-AP Bindungspartner in der Zelle sind.

3.3 Charakterisierung von Herc2 als Ligase, Effektor und Substrat

3.3.1 Herc2 als HECT-Ligase

Wie in der Einleitung beschrieben, besitzt Herc2 am C-Terminus eine HECT-Domäne. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob Herc2 tatsächlich eine Ligase-Funktion aufweist.

3.3.1.1 Thioesterbildung von Herc2

Ein Charakteristikum für aktive HECT-E3-Ligasen ist die Fähigkeit einen Thioester mit Ubiquitin einzugehen. Die Thioesterbindung wird zwischen dem katalytisch aktiven Cysteinrest der HECT-Domäne und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitinmoleküls in Anwesenheit von E1 und E2 gebildet. Sie ist nur unter nicht-reduzierenden Bedingungen stabil. Desweiteren ist die HECT-Domäne für die Bildung des Thioesters notwendig und ausreichend (Schwarz et al., 1998). Da Herc2(2960-4836) in der *in vitro* Translation für einen Thioesterassay (2.2.8.2) nicht ausreichend gut exprimiert wird und auch durch die Größe eine Auflösung der modifizierten und der unmodifizierten Form schwierig ist, wurde eine Deletionsmutante von Herc2 generiert, welche nur die HECT-Domäne umfasst. Beim Aminosäure-Sequenzabgleich mit anderen HECT-Domänen-haltigen Proteinen fällt auf, dass Herc2 im Gegensatz zu anderen HECT-Proteinen eine C-terminale Verlängerung besitzt. Für den Fall, dass sich diese störend auf die Bildung eines Thioesters auswirkt, wurde eine C-terminale Verkürzung der HECT-Domäne

(Herc2-HECT Δ C44) von Herc2 kloniert und ebenfalls auf die Fähigkeit einen Thioester zu bilden getestet.

Unter den gewählten Bedingungen konnte mit der HECT-Domäne von Herc2 kein Thioester nachgewiesen werden (Abb. 19). Dass der Thioesterassay prinzipiell funktioniert, wurde am Beispiel der HECT-Domäne von E6-AP gezeigt. Anhand des Laufverhaltens von E6-AP-HECT ist erkennbar, dass es zum Teil schon während der *in vitro* Translation als Thioester vorlag.

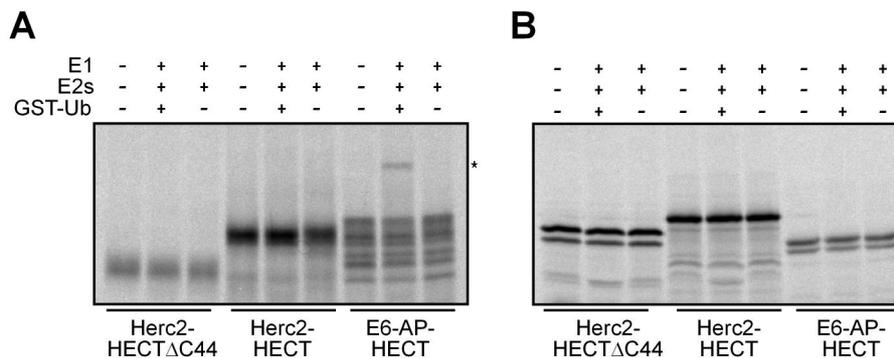


Abb. 19: Die Hect-Domäne von Herc2 bildet keinen Thioester mit Ubiquitin.

Herc2-HECT Δ C44, Herc2-HECT und die HECT-Domäne von E6-AP wurden *in vitro* translatiert mit E1 und den E2s UbcH7 und UbcH5 sowie mit und ohne GST-Ubiquitin inkubiert. Nach 5 min bei RT wurden die Ansätze entweder in Abwesenheit (**A**) oder in Gegenwart (**B**) von DTT gestoppt (2.2.8.3) durch 12 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch nachgewiesen. *, Thioesterform mit GST-Ubiquitin.

3.3.1.2 Autoubiquitinierung von Herc2

Ein anderes Merkmal von katalytisch aktiven HECT-Ligasen ist, dass sie sich selber ubiquitinieren und damit ihren eigenen Abbau fördern (Nuber et al., 1998). Um Herc2 auf diese Fähigkeit zu überprüfen, wurden Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Herc2(2960-4836) in Gegenwart von rekombinantem E1, UbcH5, UbcH7 unter Standardbedingungen durchgeführt (2.2.8.2). Nach Abstoppen der Ubiquitinierungsreaktionen wurden diese in der SDS-PAGE aufgetrennt und das radioaktiv markierte Protein durch Fluorographie sichtbar gemacht. Ubiquitinierte Proteine sind durch ihr verändertes Laufverhalten von nicht modifizierten Proteinen zu unterscheiden, da ihre molekulare Masse durch das gebundene Ubiquitin zunimmt. Der Zusatz von E1 und Ubiquitin reichte aus, um Herc2(2960-4836) zu ubiquitinieren (Abb. 20A). Durch zusätzliches E2 wurde die Reaktion schwach verstärkt. Es ist anzunehmen,

dass die im Retikulozytenlysat vorhandenen E2s (Blumenfeld et al., 1994; Huibregtse et al., 1995; Scheffner et al., 1993) bereits für eine schwache Reaktion ausreichend sind.

Zur Unterscheidung, ob es sich hierbei um eine Autoubiquitinierung handelt oder ob andere im Retikulozytenlysat vorhandene Ligasen Herc2(2960-4836) als Substrat verwenden, wurde das katalytische Cystein der HECT-Domäne von Herc2 in Alanin mutiert. Die Analyse des anschließenden Ubiquitinierungsassays zeigte, dass die inaktive Mutante mit deutlich schwächerer Intensität ubiquitiniert wird (Abb. 20B). Dies deutet daraufhin, dass Herc2(2960-4836) nicht nur eine aktive E3 Ligase ist, sondern auch als Substrat verwendet wird (vgl. dazu 3.3.5).

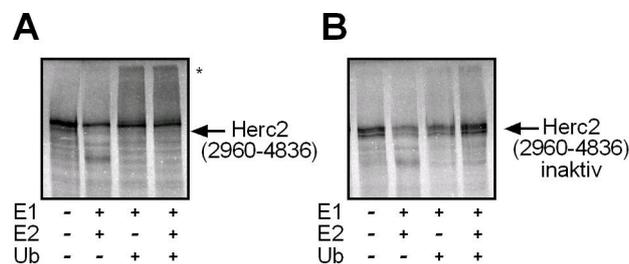


Abb. 20: Herc2(2960-4836) ubiquitiniert sich selbst.

(A) Ubiquitinierungsassays wurden unter Standardbedingungen (2.2.8.2) mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Herc2(2960-4836) in An- und Abwesenheit von rekombinantem E1, E2 (UbcH5 und UbcH7) und Ubiquitin (Ub) durchgeführt. Die Ubiquitinierungsansätze wurden 2 h bei 25°C inkubiert, mit 2x Laemmli-Probenpuffer abgestoppt und in einer 7 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden fluorographisch sichtbar gemacht. (B) Ubiquitinierungsassay analog zu (A) mit der Ausnahme, dass eine inaktive Herc2(2960-4836)-Form verwendet wurde. *, ubiquitinierte Proteine.

Für E6-AP konnte eine effizientere Autoubiquitinierung nachgewiesen werden, wenn zusätzliches im Baculovirussystem exprimiertes E6-AP zugesetzt wurde (Nuber et al., 1998). Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass der Ubiquitintransfer von einem E6-AP-Protein auf ein anderes und nicht in einem intramolekularen Schritt innerhalb eines Proteins verläuft (Nuber et al., 1998). Um auch für Herc2(2960-4836) eine effizientere Ubiquitinierung nachweisen zu können, wurde Herc2(2960-4836) in einen Baculovirus-Expressionsvektor mit N-terminalem His₆-„tag“ kloniert. Das erzeugte rekombinante Baculovirus wurde zur Infektion von High Five-Zellen verwendet (2.2.4.3). Die Aufreinigung des Proteins erfolgte entweder über den His-„tag“ oder über Anionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose-Säulen (2.2.5.2 und 2.2.5.3). In Abbildung 21A ist ein Beispiel einer Anionenaustauschchromatographie-Aufreinigung gezeigt, woraus ersichtlich wird, dass His₆-Herc2(2960-4836) als Protein im Baculovirussystem exprimiert werden kann. Die exprimierten Mengen waren jedoch sehr

gering und bei den Aufreinigungen gelang es nicht, His₆-Herc2(2960-4836) optimal an eine Matrix zu binden. Im Falle der Anionenaustauschchromatographie wurde vermutet, dass möglicherweise ein gewisser Prozentsatz His₆-Herc2(2960-4836) modifiziert vorlag und somit einen anderen pI-Wert aufwies. Im Falle der Ni-NTA-Aufreinigung wurde spekuliert, dass sich eventuell nur ein Teil der Proteine so faltet, dass der His₆-„tag“ für die Bindung zugänglich ist. Ein weiteres Problem bestand darin, dass His₆-Herc2(2960-4836) nach der Lyse der Insektenzellen sehr instabil war und schon nach kürzester Zeit trotz Proteaseinhibitoren kein Gesamtlängenprotein mehr zu detektieren war. Bei Zusatz von im Baculovirussystem exprimiertem und aufgereinigtem His₆-Herc2(2960-4836) zu den Autoubiquitinierungsassays konnte kein Effekt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies wäre allerdings auch nur unter der Voraussetzung möglich gewesen, dass der Ubiquitintransfer von einem Herc2 auf ein anderes Herc2, also intermolekular, verläuft. Ob His₆-Herc2(2960-4836) als Ligase überhaupt aktiv war, wurde in einem Ubiquitinierungsassay mit anschließender Coomassiefärbung überprüft. Dazu wurde aus dem Baculovirussystem frisch präpariertes und über Ni-NTA aufgereinigtes His₆-Herc2(2960-4836) mit rekombinanten E1, UbcH5, UbcH7 und Ubiquitin inkubiert. Es konnte eine Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Abb. 21B).

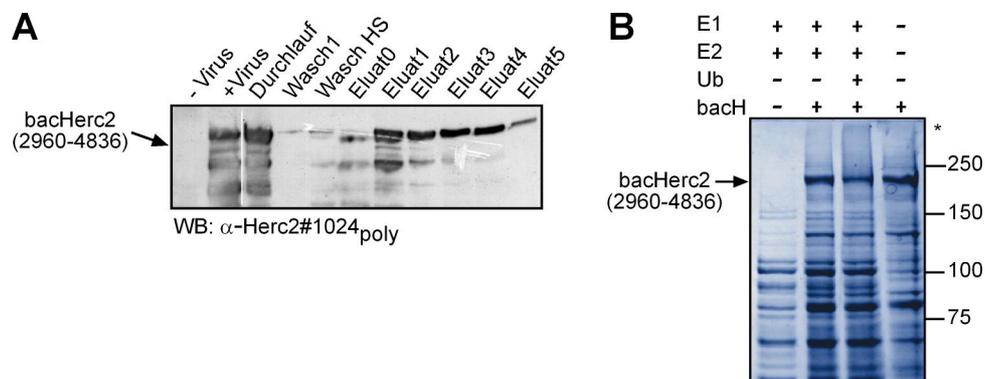


Abb. 21: Expression, Aufreinigung und Ubiquitinierung von im Baculovirussystem erzeugtem His₆-Herc2(2960-4836)

(A) High Five-Zellen wurden mit dem generierten His₆-Herc2(2960-4836)-Baculovirus infiziert und 48 h bei 27°C inkubiert. Nach Aufschluss der Zellen wurde das Lysat auf eine Anionenaustauschchromatographiesäule aufgetragen. Nach den Waschschritten erfolgte die Elution. Die Aufreinigungsschritte wurden in der Westernblotanalyse mit dem polyklonalen Herc2-#1024-Antiserum überprüft. Wasch HS, Hochsalz-Waschschritt, Durchlauf entspricht 50 % des Inputs. (B) Über Ni-NTA aufgereinigtes His₆-Herc2(2960-4836) wurde an der Sepharose gebunden im Standardubiquitinierungsassay (2.2.8.2) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel und die Detektion in einer Coomassiefärbung. *, ubiquitiniertes His₆-Herc2(2960-4836).

Ein Beleg für eine erfolgte Autoubiquitinierung war, dass die nicht modifizierte Menge an His₆-Herc2(2960-4836) in Anwesenheit von Ubiquitin abnahm. Es konnte keine Aussage getroffen werden, ob es sich hierbei um einen intra- oder intermolekularen Ubiquitintransfer handelt. Weiterhin war es möglich, dass nicht ausschließlich Herc2, sondern auch *E. coli*-Proteine aus der E2-Präparation ubiquitiniert wurden. Dennoch ist die Ubiquitinierungsbande am oberen Rand des Gels ein Indiz dafür, dass Herc2 eine aktive Ligase ist. Es muss jedoch erwähnt werden, dass nicht in jeder Proteinpräparation diese Aktivität wiederholt gezeigt werden konnte. Gründe hierfür sind nicht bekannt.

3.3.2 Ubiquitinkettenbildung *in vitro*

Ubiquitinketten unterscheiden sich in ihren Funktionen in der Zelle, je nachdem welches Lysin im Ubiquitin zur Kettenbildung benutzt wird (vgl. 1.3). Deshalb ist es von Interesse zu bestimmen, welche Lysine eine Ligase zur Kettenbildung benutzt.

Zur Bestimmung von Ubiquitinkettenarten werden derzeit zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Zum Beispiel können verschiedene Kettentypen mit Ubiquitinmutanten bestimmt werden. Bei diesen werden ein oder mehrere Lysine, die für die Kettenverknüpfung in Frage kommen, durch Arginin ausgetauscht. Die Mutanten haben den Nachteil, dass nicht unterschieden werden kann, ob nicht durch die Ersetzung eines hochkonservierten Restes, Protein-Protein Interaktionen, Enzymaktivitäten oder die Polyubiquitinkettenbildung bereits beeinflusst werden. Massenspektrometrische Analysen stellen eine neuere, mutantenunabhängige Untersuchungsmethode dar.

Zur Vorbereitung für eine massenspektrometrische Analyse werden Polyubiquitinketten aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut, wobei 11 verschiedene Fragmente entstehen können. Ist eines der Lysine mit einem weiteren Ubiquitinmolekül modifiziert, kann Trypsin nicht spalten. Das modifizierende Ubiquitin wird aber nach den beiden C-terminalen Glycinresten verdaut (Abb. 22). Durch die dabei entstehende Massendifferenz von zwei Glycinresten kann berechnet werden, ob ein Ubiquitinfragment modifiziert vorliegt. Dies gibt Aufschluss darüber, mit welchen Lysin eine Ubiquitinkette verknüpft werden kann.

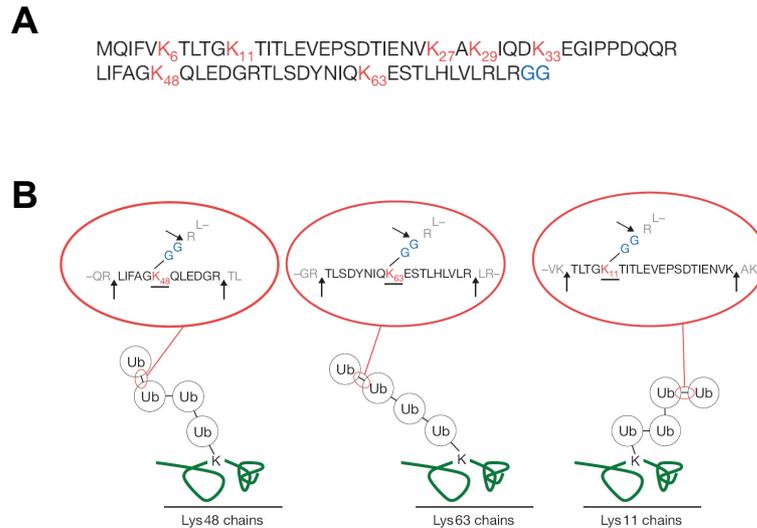


Abb. 22: Schematische Darstellung über die Bestimmung der Ubiquitinkettenverknüpfung (entnommen und modifiziert nach Kirkpatrick et al., 2005)

(A) Aminosäuresequenz von humanem Ubiquitin. Eine Kette wird durch eine Isopeptidbindung mit einer ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes (rot) und dem C-terminalen Glycin eines Ubiquitinmoleküls verknüpft. Ubiquitin hat 7 Lysinreste. (B) Darstellung des Trypsinverdaus einer Polyubiquitinkette. Trypsin spaltet hinter Lysin und Arginin (anhand von Pfeilen dargestellt) sowohl im primären Ubiquitinmolekül als auch in dem für die Verzweigung benutzten. Das nach dem Trypsinverdaus entstehende Peptid weist am Lysin eine -GG Modifikation auf, wenn es für die Ubiquitinkette benutzt wird. Es wird angenommen, dass Trypsin an verzweigten Lysinen nicht schneidet. So besteht die Datenbanksuche nach modifizierten Ubiquitinpeptiden aus einem internen Lysin, hinter dem Trypsin nicht geschnitten hat, mit einer zusätzlichen Masse von 114,04 Da für -GG.

3.3.2.1 Ubiquitinketten-Katalyse von Herc2

Zur Untersuchung, welche Lysine von Herc2 zur Ubiquitinkettenbildung benutzt werden, wurde die nach der Autoubiquitinierung von His₆-Herc2(2960-4836) entstandene hochmolekulare Bande (Abb. 21B) aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Dabei konnte Ubiquitin nachgewiesen werden. Herc2 wurde allerdings nicht detektiert, was vermutlich auf eine größere Menge an Ubiquitinfragmenten als an Herc2-Fragmenten zurückzuführen ist. Abbildung 23 zeigt die Ubiquitinfragmente, die nach dem Trypsinverdaus nachgewiesen wurden. Die Berechnungen ergaben, dass vier verschiedene Lysinreste für die Kettenformation benutzt wurden. Es sind die Lysine 6 (K6), 11 (K11), 48 (K48) und 63 (K63). Außerdem wurde entweder der N-Terminus von Ubiquitin oder nochmals K11 als modifiziert gefunden, wobei dann Trypsin hinter dem modifizierten Lysin geschnitten hätte (vgl. 4.2.2). Aus den Ergebnissen kann nicht geschlossen werden, ob Herc2 gemischte Ketten aus z. B. K48 und K63 bildet oder ob nur jeweils ein Lysin in einer Kette benutzt wird. Zusammenfassend kann festgestellt werden: Herc2 verhält sich *in vitro* wie eine aktive

Ubiquitinligase und ist fähig verschiedene Lysine von Ubiquitin zur Ubiquitinkettenbildung zu benutzen.

Peptid	Sequenz	ubiquitiniertes Lysin	beobachtete Masse	erwartete Masse
1-11	MQIFV K TLTG K +GG, +GG	K6 und (N-Term. oder K11)	1493.78	1492.77
7-27	TLTG K TITLEVEPSDTIENVK +GG	K11	2402.32	2401.32
12-27	TITLEVEPSDTIENVK		1787.96	1786.96
30-42	IQDKEGIPPDQQR		1523.83	1522.82
34-42	EGIPPDQQR		1039.55	1038.54
43-54	LIFAG K QLEDGR +GG	K48	1460.83	1459.82
55-63	TLSDYNIQK		1081.59	1080.58
55-72	TLSDYNIQK E STLHLVLR		2130.13	2129.12
55-72	TLSDYNIQ K ESTLHLVLR +GG	K63	2244.20	2243.19
64-72	ESTLHLVLR		1067.65	1066.64

Abb. 23: Massenspektrometrische Auswertung von polyubiquitiniertem His₆-Herc2(2960-4836)

Dargestellt sind die Sequenzen der identifizierten Peptide von Ubiquitin, sowie ihre erwartete bzw. beobachtete Masse. Mit Ubiquitin modifizierte Ubiquitinpeptide wurden durch eine Massenzunahme von 114 Da identifiziert, welches den nach dem Trypsinverdau kovalent gebundenen C-terminalen Glycinresten entspricht.

3.3.2.2 Ubiquitinketten-Katalyse von E6-AP und anderen Ligasen

Im Folgenden stellte sich die Frage, ob diese Ergebnisse nur für Herc2 gelten oder auch auf andere E3-Ligasen zutreffen. Für die Analyse, welche Ubiquitinketten von anderen Ligasen gebildet werden können, wurde zunächst E6-AP verwendet, welches in großen Mengen im Baculovirussystem exprimiert und aufgereinigt werden konnte. E6-AP wurde im Standard-Ubiquitinierungsassay inkubiert, elektrophoretisch in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Es konnte eine hochmolekulare Bande am oberen Rand des Trenngels beobachtet werden, wenn E1, E2s und Ubiquitin im Ansatz vorhanden waren (Abb. 24A). Die Bande wurde ausgeschnitten und analysiert. Es konnten nur K48 und K11-Ketten nachgewiesen werden (Abb. 24B). Die HectH9-Ligase wurde in Kooperation mit M. Eilers (Universität Marburg) auf ihre Kettenbildung hin untersucht. Hierfür wurde eine N-terminale Deletionsmutante (HectH9(3328-4374)) als GST-Fusion in *E. coli* exprimiert, mittels GSH-Sepharose aufgereinigt, mit Glutathion eluiert und im Ubiquitinierungsassay eingesetzt (Abb. 24C). Die anschließende massenspektrometrische Untersuchung ergab, dass die Lysine K6, K11, K48 und K63 zur Ubiquitinkettenbildung verwendet wurden (Abb. 24D) (Adhikary et al., 2005).

Im Zusammenhang weiterer Kooperationen (W. Krek, ETH, Zürich; K. Butz, DKFZ, Heidelberg) wurden die RING-Finger-Ligasen Ro52 und Livin α auf ihre Aktivität untersucht. Alle konnten effizient autoubiquitiniert werden (Abb. 24E und G) und die

massenspektrometrische Auswertung ergab, dass beide die Lysine K11, K48 und K63 für ihre Kettenbildung verwendeten (Abb. 24F und H).

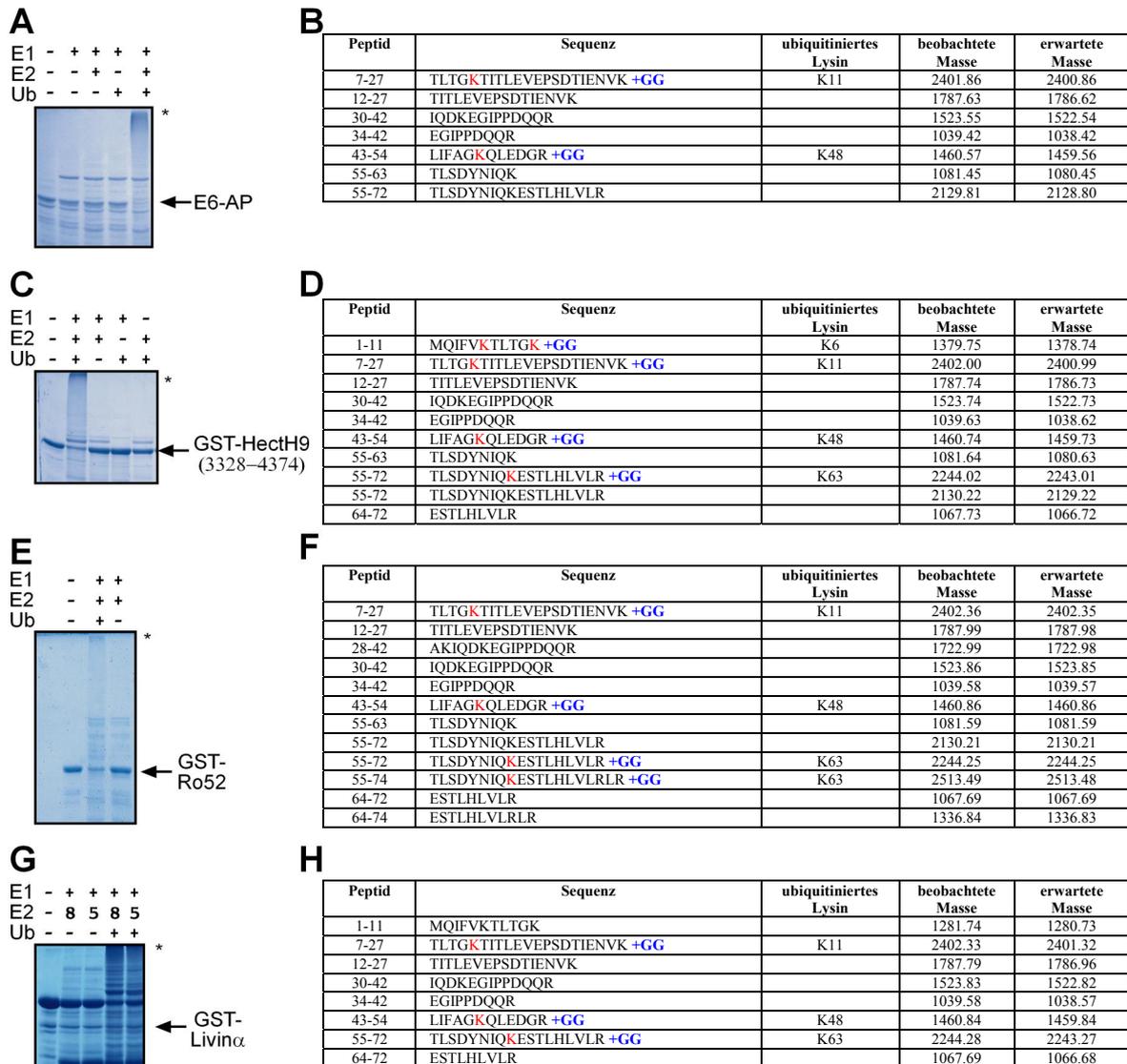


Abb. 24: Autoubiquitinierung verschiedener E3-Ligasen und deren massenspektrometrische Bestimmung der Kettenverknüpfung

(A), (C), (E) und (G) Die E3-Ligasen E6-AP, HectH9, Ro52 und Livin α wurden unter Standardbedingungen autoubiquitiniert (2.2.8.2). Die Auftrennung erfolgte in der SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung. Die Polyubiquitinbanden (*) wurden ausgeschnitten, trypsinisiert und massenspektrometrisch analysiert. (B), (D), (F) und (H) zeigen tabellarisch die dabei identifizierten Peptide. Peptide, die ubiquitiniert vorliegen, weisen eine um 114 Da höhere Masse auf. Dies entspricht der Masse von zwei Glycinresten, die nach dem tryptischen Verdau am modifizierten Lysin kovalent gebunden bleiben.

3.3.2.3 Einfluss von Herc2 auf die Kettenbildung von E6-AP

Der Nachweis, dass E6-AP Ubiquitinketten mit Lysin 48 und 11 verlinkt, führte zu der Frage, ob die Bindung von Herc2 die Kettenart verändern könnte. Hierzu wurden

Ubiquitinierungsassays mit verschiedenen Ubiquitinmutanten durchgeführt. Da die massenspektrometrische Auswertung nicht quantitativ ist, wurde sich erhofft, mit den Ubiquitinmutanten auch leichte Veränderungen in der Kettenverknüpfung sichtbar zu machen. Die Mutante, bei der alle Lysine, ausgenommen Lysin 48, durch Arginin ersetzt wurden, wird hierbei als K48-Mutante bezeichnet. Die Mutante, bei der nur das Lysin 48 zu Arginin mutiert wurde, wird R48 genannt. Analog bedeutet die Bezeichnung K0, dass alle Lysine mutiert wurden. Im Autoubiquitinierungsassay mit E6-AP konnte nur mit der K48-Mutante ein wildtyp-ähnliches Ubiquitinierungsbild erzielt werden (Abb. 25). Allerdings ist zu erkennen, dass die Mutante ineffizienter als Wildtyp-Ubiquitin benutzt wurde.

Als Kontrolle wurde das E6-Onkoprotein vom humanen Papillomvirus Typ 16 als gereinigtes GST-Fusionsprotein hinzugegeben. Vom HPV16 E6 ist bekannt, dass es die Autoubiquitinierung von E6-AP fördert und so seinen Abbau durch das Proteasom einleitet (Kao et al., 2000). Durch die Zugabe von GST-E6 wurde daher erwartet, dass die K48-Ubiquitinkettenbildung auf E6-AP gefördert wird. Es zeigte sich, dass E6 allgemein die Ubiquitinierung verstärkte (Abb. 25). Es konnte auch mehr Ubiquitinierung mit der Mutante K0 induziert werden. Dennoch schienen die K48-Ketten bevorzugt zu entstehen. Der Zusatz von in *E. coli* exprimiertem und gereinigtem GST-RCC1b/Herc2 führte nicht zu einer Änderung der Kettenverknüpfung. Es entstanden auch mit RCC1b bevorzugt K48-verknüpfte Ketten. Analog zu E6 schien GST-RCC1b ebenfalls die Autoubiquitinierung von E6-AP zu verstärken.

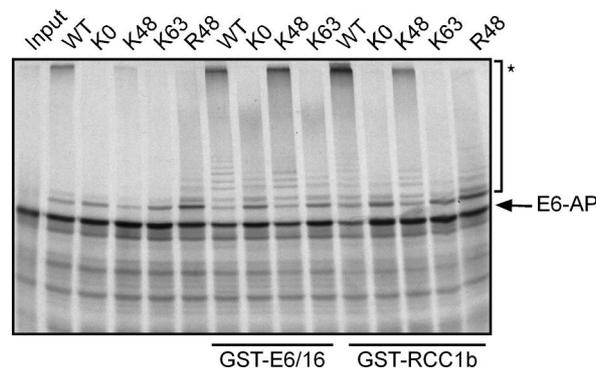


Abb. 25: Herc2 verändert nicht die Ubiquitinkettenverknüpfung auf E6-AP.

In vitro translatiertes E6-AP wurde im Ubiquitinierungsassay mit rekombinanten E1 und E2s unter Zusatz von Wildtyp-Ubiquitin oder den angegebenen bakteriell exprimierten Ubiquitinmutanten eingesetzt. Zusätzlich erfolgte die Inkubation mit den aufgereinigten und eluierten Fusionsproteinen GST-E6 bzw. GST-RCC1b. Die Ansätze wurden in einer 8 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. *, polyubiquitiniertes E6-AP.

3.3.3 Einfluss von Herc2 und E6 auf die Autoubiquitinierung von E6-AP *in vitro*

Nachdem im vorherigen Versuch gezeigt wurde, dass GST-RCC1b, wie auch GST-E6, die Autoubiquitinierung von E6-AP zu verstärken scheinen, wurde dieser Effekt im Folgenden genauer untersucht. Teilweise war jedoch die Autoubiquitinierung von E6-AP auch ohne Zusatz von GST-E6/16 oder GST-RCC1b schon so effizient, dass es nicht möglich war, eine weitere Verstärkung sichtbar zu machen (Abb. 26B). Dieser Effekt kann auf die Verwendung von unterschiedlichem Retikulozytenlysate zurückgeführt werden, welches je nach erworbener Charge unterschiedliche Aktivität aufweist. Aus diesem Grund wurde zunächst eine inaktive E6-AP-Mutante getestet. Diese Mutante kann nur von dem im Retikulozytenlysate vorhandenen oder durch zusätzliches zugesetztes aktives E6-AP ubiquitiniert werden (Nuber et al., 1998). Dadurch sollte eine Verstärkung der Ubiquitinierung besser dargestellt werden können.

Der Versuch zeigte, dass GST-RCC1b/Herc2 die Ubiquitinierung der inaktiven E6-AP-Mutante verstärkt (Abb. 26C). Auffallend war jedoch, dass die Zugabe von GST-E6/16 einen gegenteiligen Effekt hatte. Dieses Ergebnis deutet an, dass der Ubiquitinierungsmechanismus mit RCC1b und E6 unterschiedlich verläuft (vgl. 4.3.2).

Ein ähnliches Experiment mit in Weizenkeimlysate translatiertem E6-AP(C:A) zeigte, dass aktives E6-AP für die Ubiquitinierung notwendig ist, da keine Effekte von RCC1b/Herc2 beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Weizenkeimlysate enthält im Gegensatz zu Retikulozytenlysate keine E6-AP-Homologe (Scheffner et al., 1993). Zur näheren Charakterisierung der RCC1b- bzw. E6-Effekte wurden weitere E6-AP-Mutanten untersucht.

Der Bereich von E6-AP, welcher noch als Substrat für eine E6-AP-abhängige Ubiquitinierung dienen kann, wurde auf die Aminosäuren 200-768 eingeschränkt (Nuber et al., 1998). Somit sollten Mutanten, die Deletionen in diesem Bereich aufweisen, nicht mehr von E6-AP ubiquitiniert werden. Allerdings konnte hier, entgegen der publizierten Daten, in den untersuchten E6-AP-Mutanten $\Delta C170$ und $\Delta N309$ Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Abb. 26H und F), wenn auch nicht sehr effizient. Gründe dafür blieben unklar. Bei der Ubiquitinierung von E6-AP $\Delta N309$ konnte kein Einfluss von RCC1b oder E6 festgestellt werden. Bei E6-AP $\Delta C170$ verstärkte der Zusatz von RCC1b oder E6 jedoch die E6-AP-abhängige Ubiquitinierung. Bei der N-terminalen Deletionsmutante $\Delta N199$, welche von E6-AP noch schwach als Substrat erkannt wird, konnte wiederum kein wesentlicher Effekt von RCC1b oder E6 beobachtet werden. Als

interessante Mutante erwies sich E6-AP Δ C84. Sie wurde effizient von E6-AP als Substrat erkannt. Aber dies führte nicht zur Entstehung einer Polyubiquitinkette von hoher molekularer Masse, vielmehr scheint es sich um eine Kette von definierter Länge oder um mehrere Ubiquitine an verschiedenen Lysinen (Multiubiquitinierung) zu handeln. Die Zugabe von RCC1b verstärkte die Ubiquitinierung, während E6 diese hingegen fast vollständig blockierte (Abb. 26G). Die E6-AP-Mutante, bei welcher die E6-Bindestelle deletiert wurde, wird ebenfalls von E6-AP als Substrat erkannt (Nuber et al., 1998). Der Zusatz von RCC1b und E6 verstärkte die Autoubiquitinierung (Abb. 26D).

Zur näheren Untersuchung des E6-Effektes wurde außerdem im Baculovirussystem exprimiertes E6-AP Δ E6 zugesetzt, welches bei gleicher Proteinmenge eine schwächere Aktivität als Wildtyp-E6-AP hat. Es zeigte sich, dass sich E6-AP Δ E6, bis auf die schwächere Aktivität, prinzipiell wie Wildtyp-E6-AP verhält (Abb. 26C, D, E). Nur der Zusatz von GST-E6 zur Ubiquitinierung von E6-AP mit deletierter E6-Bindestelle blieb ohne Effekt (Abb. 26D).

Zusammengefasst führte der Zusatz von RCC1b zu einer Verstärkung der Ubiquitinierung bei E6-AP(C:A), E6-AP Δ E6, Δ C84 und Δ C170 und zu keinem Effekt bei Δ N199 und Δ N309. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit dem Bindebereich von GST-RCC1b auf E6-AP (vgl. 3.1.5). Es wurde kein Effekt festgestellt, wenn GST-RCC1b nicht an E6-AP binden konnte. Die Kontrolle RCC1c/Herc2 verhielt sich wie die reine Pufferkontrolle. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Bindung von RCC1b an E6-AP im Zusammenhang mit dem beobachteten Effekt steht.

Bei E6 hingegen konnte eine Verstärkung der E6-AP Wildtyp-, der Δ E6- und Δ C170-Ubiquitinierung festgestellt werden. Eine zusätzliche Schwächung der Ubiquitinierung durch E6 wurde bei den Mutanten E6-AP(C:A) und Δ C84 beobachtet. Kein Einfluss von E6 war bei den Mutanten Δ N199 und Δ N309 zu sehen. Alle Mutanten, ausgenommen E6-AP Δ E6, enthielten die Bindestelle für E6. Es ist aber bekannt, dass der Bindebereich, um eine Aktivität von E6 nachweisen zu können, größer sein muss. So ist die E6-AP Δ N309-Mutante inaktiv in Bezug auf die E6-abhängige Ubiquitinierung von p53. Ebenso findet keine E6-abhängige p53 Ubiquitinierung ohne die C-terminalen 84 Aminosäuren von E6-AP statt (Huibregtse et al., 1993b).

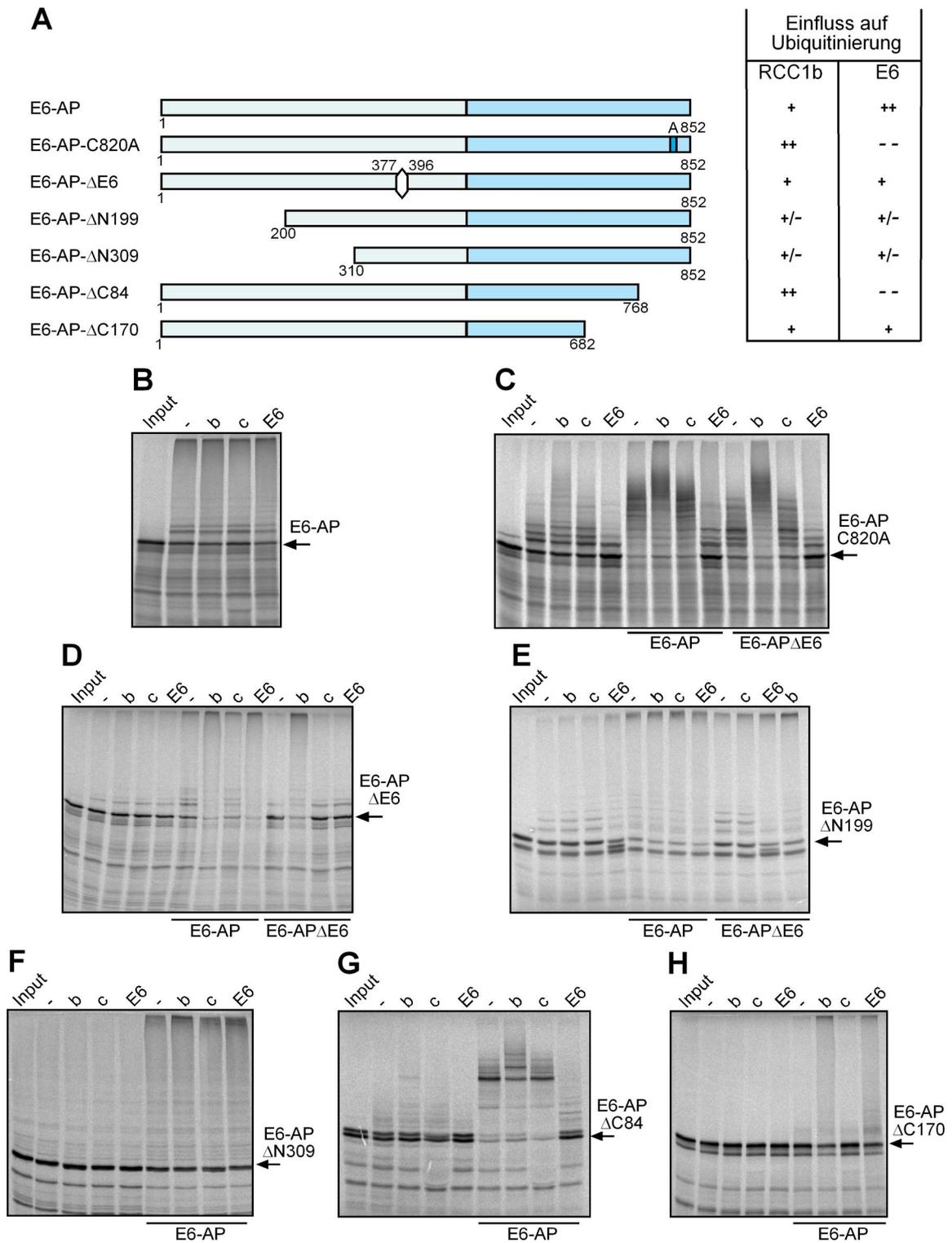


Abb. 26: Einfluss von Herc2 und E6 auf die Ubiquitinierung von E6-AP-Mutanten *in vitro*

(A) Schematische Darstellung der verwendeten E6-AP-Mutanten. Der Einfluss von RCC1b/Herc2 und E6 ist angegeben. +, verstärkt die Ubiquitinierung der jeweiligen Mutante; +/- Zugabe von RCC1b oder E6 hat keinen Einfluss auf Ubiquitinierung; -, Ubiquitinierung wird weniger. Das katalytische Cystein ist markiert. Die Nummerierung der Aminosäurepositionen erfolgte entsprechend der E6-AP-Isoform 1 (Yamamoto et al., 1997). (B) Die angegebenen E6-AP-Formen wurden *in vitro* translatiert und unter Standardbedingungen mit und ohne Zugabe von bakteriell exprimierten GST-RCC1b oder GST-E6/16 ubiquitiniert. Der Nachweis der radioaktiven Proteine erfolgte durch Fluorographie. Die Laufposition der unmodifizierten Formen der E6-AP-Mutanten ist angegeben.

Ob GST-Herc2(2918-3606) den gleichen Effekt, wie GST-RCC1b(2959-3327) hat, konnte nicht überprüft werden, da GST-Herc2(2918-3606) nicht in ausreichend konzentrierter Form eluiert werden konnte.

3.3.4 Einfluss von Herc2 auf E6-AP *in vivo*

Zur Untersuchung, ob Herc2 ebenfalls einen Einfluss auf E6-AP *in vivo* hat, wurden zunächst steigende Konzentrationen an HA-Herc2(2918-3606) und HA-Herc2(2960-4836) kodierendem Expressionsplasmid zu einer konstanten HA-E6-AP-Konzentration in H1299 Zellen transfiziert. Sollte Herc2 auch *in vivo* die Autoubiquitinierung von E6-AP verstärken, würde bei Überexpression ein Abbau von E6-AP erwartet werden. Die Analyse erfolgte im Westernblot mittels eines monoklonalen HA-Antikörpers und zeigte keinen Einfluss von HA-Herc2(2918-3606) oder HA-Herc2(2960-4836) auf E6-AP (Daten nicht gezeigt).

Es bestand die Möglichkeit, dass die Herc2-Fragmente in der Zelle nicht ausreichten, um einen Effekt auf E6-AP zu erzielen, wie es *in vitro* mit der RCC1b-Domäne alleine gezeigt werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt stand jedoch kein Expressionsplasmid, welches für Gesamtlängen-Herc2 kodierte, zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden für einen umgekehrten Ansatz siRNAs gegen Herc2 generiert. Dies sind kleine doppelsträngige RNAs, die komplementär zu einer bestimmten mRNA sind. Die siRNAs bilden mit einem Proteinkomplex den sogenannten „RNA-induced Silencing Complex“ (RISC). Dieser bindet an die komplementäre mRNA und baut sie ab. Der mRNA-Abbau führt zu einem „gene silencing“ auf posttranskriptioneller Ebene. Es wurden drei verschiedene siRNAs gegen Herc2 generiert, die mit unterschiedlichen Bereichen von Herc2 korrespondieren (Abb. 27A). Alle drei siRNAs (siRNA-H2-9, -10, -11) führten zu einem effizienten „knock down“ von Herc2, welcher auf Proteinebene im Westernblot visualisiert wurde (Abb. 27B). Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit konnte die Expression von Herc2 noch effektiver blockiert werden (Abb. 27B). Der „knock down“ konnte in allen getesteten Zelllinien beobachtet werden (Abb. 27B, C und D). Bei der Untersuchung des korrespondierenden E6-AP-Level wurde festgestellt, dass die siRNA H2-11, nicht aber die beiden anderen siRNAs, auch diesen nach unten regulierte. Ein allgemeiner Effekt von siRNA H2-11 konnte jedoch anhand des gleichbleibenden Aktin-Proteinlevels widerlegt werden. Die Spezifität des E6-AP-„knock downs“ durch siRNA-H2-11 wurde in der HPV positiven Zelllinie HeLa gezeigt, wo der Verlust von E6-AP mit

der „Hochregulation“ von p53 korrelierte (Abb. 27C, vgl. 1.8). Die anderen gegen Herc2 gerichteten siRNAs veränderten sowohl in HPV-positiven als auch in HPV-negativen Zelllinien die Proteinmenge an p53 nicht. Warum sich die siRNAs unterschiedlich im Hinblick auf E6-AP verhalten, konnte nicht geklärt werden (vgl. 4.6.1).

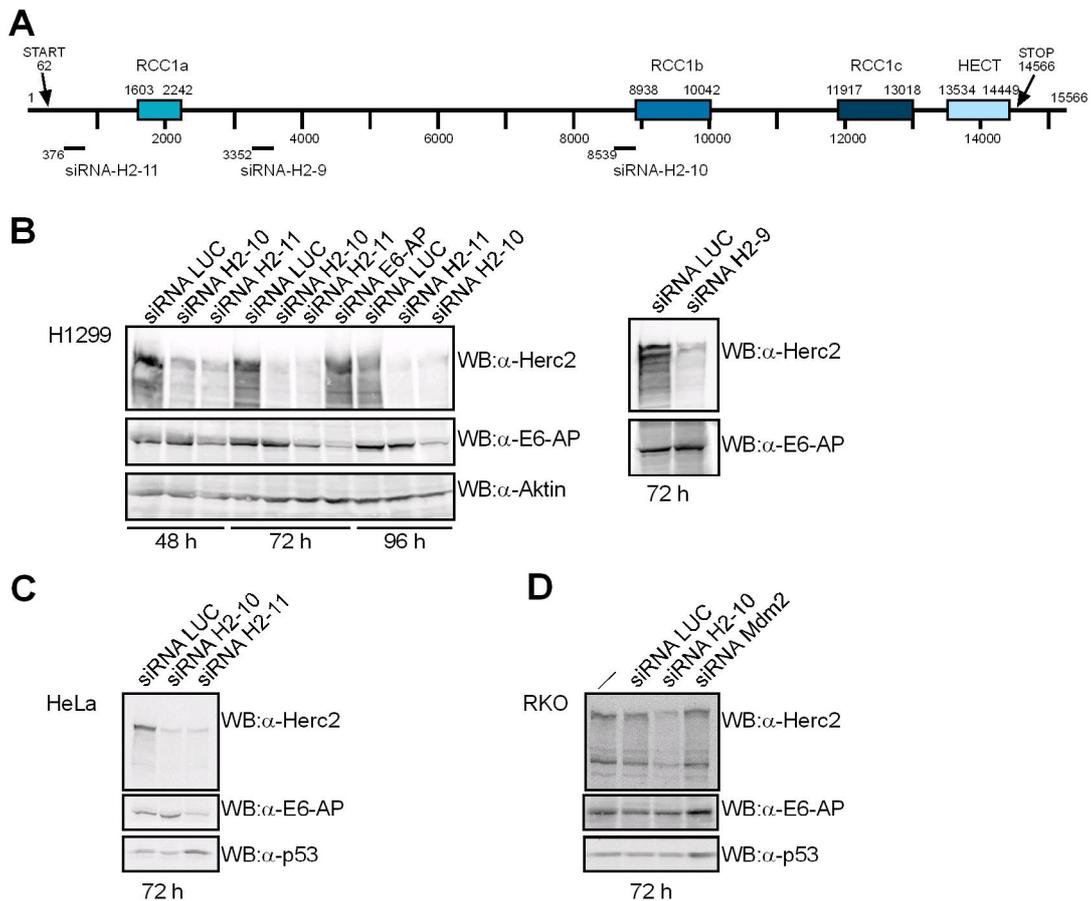


Abb. 27: Einfluss von Herc2 auf E6-AP *in vivo*

(A) Schematische Übersicht über das humane Herc2 Transkript. Pfeile zeigen den Translationsstart bzw. den -stop an. Durch blaue Boxen wurden wichtige Domänen kenntlich gemacht. Striche zeigen die korrespondierenden Positionen der siRNAs an. (B) H1299 Zellen wurden bei 30 %iger Konfluenz mit synthetischer, doppelsträngiger siRNA transfiziert, wie angegeben (2.2.9.4). Die Sequenz der Kontroll siRNA war gegen Luziferase gerichtet. Nach 48, 72 und 96 h wurden die Zellen aufgeschlossen, die Lysate über Proteinbestimmung angeglichen und in einem 3-15 %igen Gradientengel aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte im Westernblot mit den angegebenen Antikörpern. (C) wie (B), es wurden HeLa Zellen für 72 h transfiziert. (D) wie (B), es wurden RKO Zellen für 72 h transfiziert.

Nach dem Sequenzabgleich zur Folge sollten keine weiteren zellulären RNAs durch die drei siRNAs gegen Herc2 angegriffen werden. Da nach den *in vitro* Experimenten (3.3.3) eine erhöhte Ubiquitinierung von E6-AP nach der Zugabe von Herc2(2959-3327) erfolgte, die vermutlich zu einem erhöhten Abbau durch das Proteasom führt, war die Annahme, dass der „knock out“ von Herc2 *in vivo* zu einer Stabilisierung von E6-AP führen sollte.

Daraus wurde geschlossen, dass siRNA-H2-11 unspezifische Effekte auf E6-AP hervorruft. Die beiden anderen siRNAs (H2-9 und H2-10) zeigten keine Effekte auf E6-AP. Somit konnte in diesen Versuchsansätzen kein Einfluss von Herc2 auf E6-AP beobachtet werden.

3.3.5 Herc2 als Substrat von E6-AP *in vitro*

Nachdem gezeigt worden war, dass E6-AP und Herc2 interagieren, stellte sich die Frage, ob Herc2 ein mögliches Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP darstellt. Daher wurden Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Herc2(2918-3606) in Gegenwart von rekombinanten E1, UbcH5, UbcH7 mit und ohne Zusatz von E6-AP unter Standardbedingungen durchgeführt (2.2.8.2). Es konnte in diesem Versuchsansatz eine E6-AP-abhängige Ubiquitinierung festgestellt werden (Abb. 28A). Der Zusatz von Ubiquitin, E1- und E2- Enzymen reichte nicht aus, um Herc2(2918-3606) effizient zu ubiquitinieren. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um Polyubiquitinierung, da hochmolekulare Proteinaggregate am oberen Rand des Trenngels zu finden sind. Herc2(2918-3606) scheint also *in vitro* ein Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP zu sein.

Um zu überprüfen, ob auch Herc2(2960-4836) ein Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP darstellt, wurde analog zum obigen Experiment Herc2(2960-4836) *in vitro* translatiert und unter Standardubiquitinierungsbedingungen inkubiert. Herc2(2960-4836) wurde auch E6-AP unabhängig ubiquitiniert (vgl. 3.3.1.2). Durch den Zusatz von rekombinatem E6-AP wurde die Ubiquitinierung jedoch verstärkt (Abb. 28B). Um zu zeigen, dass Herc2(2960-4836) ein Substrat von E6-AP ist und nicht eventuell die Autoubiquitinierung von Herc2 fördert, wurde das gleiche Experiment mit der inaktiven Herc2-Mutante wiederholt, bei welcher das aktive Cystein durch Alanin ausgetauscht wurde. Auch Herc2(C:A-2960-4836) stellte ein Substrat von E6-AP *in vitro* dar (Abb. 28C). In den Reaktionen war die Ubiquitinierung von E6-AP so effizient, dass ebenfalls ubiquitinierte Proteine im Sammelgel beobachtet wurden.

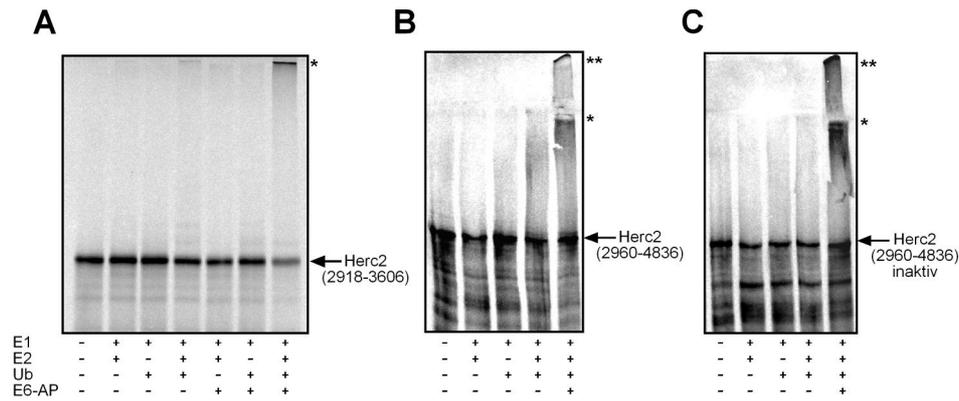


Abb. 28: Herc 2 ist ein Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP *in vitro*.

(A) Ubiquitinierungsassay mit *in vitro* translatiertem Herc2(2918-3606) wurde in An- und Abwesenheit von rekombinanten E1, UbcH5, UbcH7, E6-AP sowie Ubiquitin, wie angegeben, durchgeführt (2.2.8.2). Die Ansätze wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie visualisiert. (B) wie (A) mit Herc2(2960-4836), (C) wie (A) mit Herc2(2960-4836)-inaktiv. *, ubiquitinierte Proteine. **, ubiquitinierte Proteine mit Sammelgel.

3.3.6 Ubiquitinierung von Herc2 *in vivo*

Im Folgenden wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob Herc2 *in vivo* ubiquitiniert werden kann. Für einen *in vivo* Ubiquitinierungsassay wurde ein 6-fach-Histidin (His₆) markiertes Ubiquitin in Zellen koexprimiert. Anhand der hohen Bindungsaffinität der Histidinreste zu an eine Matrix gebundenem Ni²⁺ konnten alle Proteine, die in der Zelle mit His₆-Ubiquitin markiert worden sind, aufgereinigt werden. Die Lyse der Zellen erfolgte dabei in denaturierendem Guanidin-Hydrochloridpuffer. Dies sollte die Abspaltung der Ubiquitine durch Ubiquitin-spezifische Isopeptidasen verhindern (vgl. 1.4).

Es wurden Expressionsvektoren, die für HA-Herc2(2918-3606) oder für HA-Herc2(2960-4836) kodieren, in An- und Abwesenheit His₆-Ubiquitin transfiziert. Eine zusätzliche Kotransfektion von FLAG-E6-AP sollte zeigen, ob E6-AP bei der Reaktion die Ligase darstellt. Zur Expressionskontrolle (Gesamtzelllysat) erfolgte die Lyse in nicht-denaturierendem Puffer.

Sowohl für HA-Herc2(2918-3606) als auch für HA-Herc2(2960-4836) konnte *in vivo* eine Ubiquitinierung beobachtet werden (Abb. 29A und C). Im Vergleich zur detektierten Gesamtzelllysatbande wiesen die Ni-NTA-His₆-Ubiquitin-Präzipitate ein höheres Laufverhalten aufgrund der Modifikation auf. Die prominenteste Bande weist auf eine Monoubiquitinierung hin. Dies mag auf die Verwendung des His₆-Ubiquitins zurückzuführen sein, welches auch *in vitro* nicht so effizient Ketten bildet (Daten nicht

gezeigt). Ein Einfluss von E6-AP auf die Ubiquitinierung von Herc2(2918-3606) ist nicht eindeutig nachzuweisen. Eine diffuse Bande höheren Molekulargewichts könnte eine leichte Verstärkung der Ubiquitinierung andeuten (Abb. 29A). Zur Untersuchung, warum bei Herc2(2918-3606) kein deutlicher E6-AP-Effekt beobachtet werden konnte, wurde das Experiment in E6-AP⁻-MEFs wiederholt. Es bestand die Möglichkeit, dass das endogene E6-AP schon für die Ubiquitinierung ausreichte und deshalb bei Überexpression kein Effekt beobachtet werden konnte. Bereits ohne Koexpression von FLAG-E6-AP konnte eine Ubiquitinierung von Herc2(2918-3606) gefunden werden (Abb. 29B). Dies weist darauf hin, dass E6-AP zumindest nicht die einzige Ligase für Herc2 ist. Bei Koexpression von E6-AP konnte eine leichte Verstärkung der Ubiquitinierung festgestellt werden, wodurch gezeigt wurde, dass Herc2(2918-3606) auch *in vivo* von E6-AP ubiquitiniert werden kann (Abb. 29B).

Die Bande, die bei HA-Herc2(2960-4836) schon ohne die Kotransfektion von His₆-Ubiquitin detektiert wird, ist die unmodifizierte Form, welche leicht unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose bindet (Abb. 29C). Bei einer zusätzlichen Kotransfektion von E6-AP zu Herc2(2960-4836), war dagegen eine Abnahme der ubiquitinierten Form zu erkennen (Abb. 29C). Das könnte auf einen schnellen Abbau nach der Ubiquitinierung hindeuten.

Zur weiteren Kontrolle, ob die Abnahme der Ubiquitinierungsbande mit der Kotransfektion von E6-AP in Zusammenhang stand, wurde mit Hilfe der vektorbasierenden RNAi eine von den H1299-Zellen abgeleitete stabile Zelllinie generiert, welche die siRNA gegen E6-AP stabil exprimiert (H1299-K3; Petric Kuballa, unveröffentlichte Daten). In den H1299-K3 Zellen ist im Westernblot kein E6-AP mehr nachweisbar (vgl. Abb. 30D). Es wurde HA-Herc2(2960-4836) in An- und Abwesenheit von His₆-Ubiquitin sowohl in H1299-Zellen als auch in H1299-K3 Zellen transfiziert. Die angeglichenen Proben wurden im Westernblot analysiert. Beim Vergleich der Gesamtzelllysate wurde ersichtlich, dass die Expression von HA-Herc2(2960-4836) in den E6-AP⁻ „knock down“-Zellen etwas ausgeprägter war (Abb. 29D). Analog zu dieser Beobachtung konnte auch eine stärkere Ubiquitinierungsbande festgestellt werden. Somit scheint die Ubiquitinierung auch unabhängig von E6-AP zu verlaufen bzw. die von E6-AP unabhängige Ubiquitinierung scheint stabiler zu sein (vgl. 4.4.2). Zum Nachweis, ob es sich bei der detektierten Ubiquitinierung um die Autoubiquitinierung von HA-Herc2(2960-4836) handelt, wurde zusätzlich eine Mutante transfiziert, die eine Mutation vor dem aktiven Cystein in der HECT-Domäne enthält, welche zu einem vorzeitigen

Translationsstop führt und somit in Bezug auf die Ligasefähigkeit inaktiv sein sollte (HA-Herc2-HECT-MUT). Da diese Mutante ebenso effizient wie HA-Herc2(2960-4836) ubiquitiniert wurde, scheint es sich nicht um eine Autoubiquitinierung von Herc2 zu handeln (Abb. 29D).

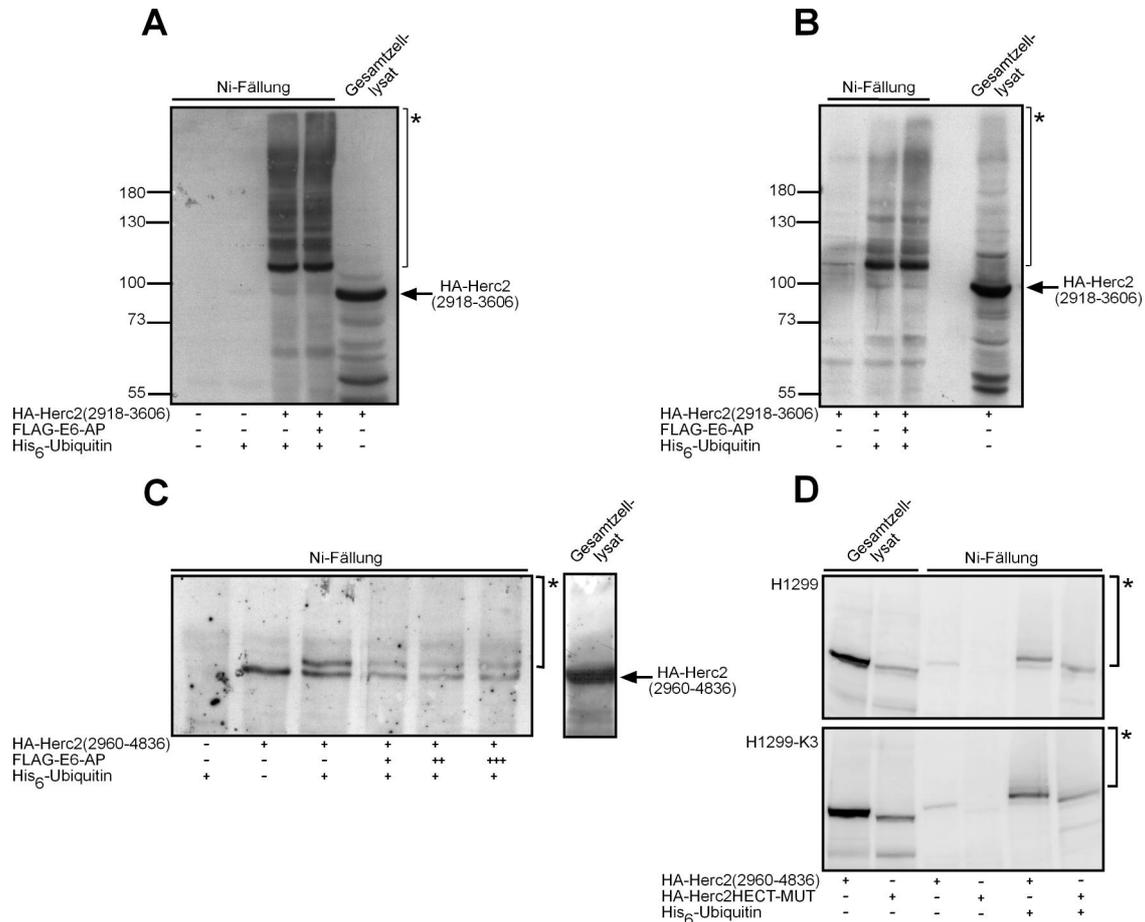


Abb. 29: Herc2 ist ein Ubiquitinierungssubstrat *in vivo*.

(A) H1299 wurden mit Expressionskonstrukten, welche für HA-Herc2(2918-3606) und His₆-Ubiquitin kodieren transient transfiziert. Wurde kein zusätzliches Plasmid, welches für E6-AP kodiert, transfiziert, wurde stattdessen Leervektor transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Lyse der Zellen in denaturierendem Guanidin-Hydrochloridpuffer (2.2.11). Ubiquitinierte Proteine wurden mit Ni-NTA-Agarose präzipitiert und gewaschen. Die Auftrennung erfolgte in einer SDS-PAGE und der Nachweis im angeschlossenen Westernblot mittels eines monoklonalen HA-Antikörpers. Aufgetragene Gesamtzelllysate wurden in TNN-Lysepuffer (2.1.1) aufgeschlossen. Zum Angleich der Proben wurden vor der Lyse in denaturierendem Puffer gleiche Zellmengen in TNN-Lysepuffer lysiert und mittels eines kotransfizierten Expressionskonstruktes für β -Galaktosidase angeglichen (2.2.9.1). (B) wie (A), aber in E6-AP^{-/-}MEFs. (C) wie (A), nur mit HA-Herc2(2960-4836). (D) wie (A), die transfizierten Konstrukte waren jedoch HA-Herc2(2960-4836) und HA-Herc2-HECT-MUT und die Zellen H1299 sowie H1299-K3.

Gesamtzelllysate entsprechen ca. 25 % der für die Präzipitation eingesetzten Menge. *, ubiquitinierte Formen des jeweiligen exprimierten Proteins.

3.3.7 Abbau von Herc2 *in vivo*

Zur näheren Charakterisierung des Effektes von E6-AP auf Herc2(2960-4836) wurden transiente Koexpressionsanalysen durchgeführt, wobei eine konstante Menge des für HA-Herc2(2960-4836) kodierenden mit einer ansteigenden Menge des für HA-E6-AP kodierenden Expressionsvektors transfiziert wurde. Eine Kotransfektion eines für β -Galaktosidase kodierenden Expressionsvektors ermöglichte den Angleich der Lysate über die Transfektionseffizienz (2.2.9.1). Mit steigenden Mengen an E6-AP konnte eine Verringerung von Herc2(2960-4836) festgestellt werden (Abb. 30A). Dies weist auf einen konzentrationsabhängigen Abbau von Herc2(2960-4836) durch E6-AP hin.

Um zu überprüfen, ob dazu die katalytisch-aktive Form von E6-AP benötigt wird, wurde eine ähnliche Titration mit der katalytisch-inaktiven Form von E6-AP durchgeführt. Nur in Anwesenheit von katalytisch-aktivem E6-AP wurde Herc2(2960-4836) abgebaut (Abb. 30B).

Um weitere Hinweise auf die Spezifität des Effekts von E6-AP zu erhalten, wurde der Expressionslevel von E6-AP mittels vektorbasierender RNAi herunterreguliert. Dazu wurden H1299 Zellen mit dem Vektor pRetroSuper-siE6-AP transfiziert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit pRetroSuper-siLuc, welcher für siRNA gegen Luciferase kodiert. Der pRetroSuper-Vektor enthält das Puromycin-Resistenzgen, wodurch die transfizierten Zellen von den untransfizierten durch die Zugabe von Puromycin selektioniert werden konnten. Zusätzlich wurden die Zellen mit für HA-E6-AP- (aktive und inaktive Form) und HA-Herc2(2960-4836)-kodierenden Expressionsvektoren, wie im vorherigen Versuch, transfiziert. Diese Vektoren enthalten das Neomycin-Resistenzgen. 48 h nach Transfektion erfolgte eine Selektion mit Puromycin und Neomycin für weitere 72 h. Durch die Selektion konnten die Zellen akkumuliert werden, die beide Plasmide aufgenommen hatten. Der Angleich der Lysate erfolgte über eine Proteinkonzentrationsbestimmung. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf PVDF-Membran transferiert. Für den Nachweis wurde ein monoklonaler HA-Antikörper verwendet. Der „knock down“ von E6-AP führte zu einer Zunahme des HA-Herc2(2960-4836)-Levels (Abb. 30C, Spur 2 und 4 gegen Spur 1). Ein leichter Anstieg der Menge von HA-Herc2(2960-4836) (Spur 2 im Vergleich zu Spur 1) kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass der Basislevel von endogenem E6-AP ebenfalls vermindert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass der „knock down“ von

überexprimiertem, aktivem E6-AP wieder zum ursprünglichen Herc2-Expressionslevel führt (Abb. 30C, Spur 3 und 4).

Zur Untersuchung, ob endogenes Herc2 auch stabilisiert wird, wenn E6-AP nicht exprimiert wird, wurde die stabile Zelllinie von H1299-Zellen verwendet, welche die siRNA gegen E6-AP stabil exprimiert (H1299-K3, Petric Kuballa, unveröffentlichte Daten). Der Nachweis, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden, erfolgte durch eine Quantifizierung der Aktinbande im Westernblot. Es konnte eine leichte Stabilisierung von Herc2 in den E6-AP-„knock down“-Lysaten beobachtet werden (Abb. 30D), wobei die Quantifizierung der Herc2-Menge im Vergleich zur Aktinmenge einen ca. 20 % höheren Herc2-Level zeigte.

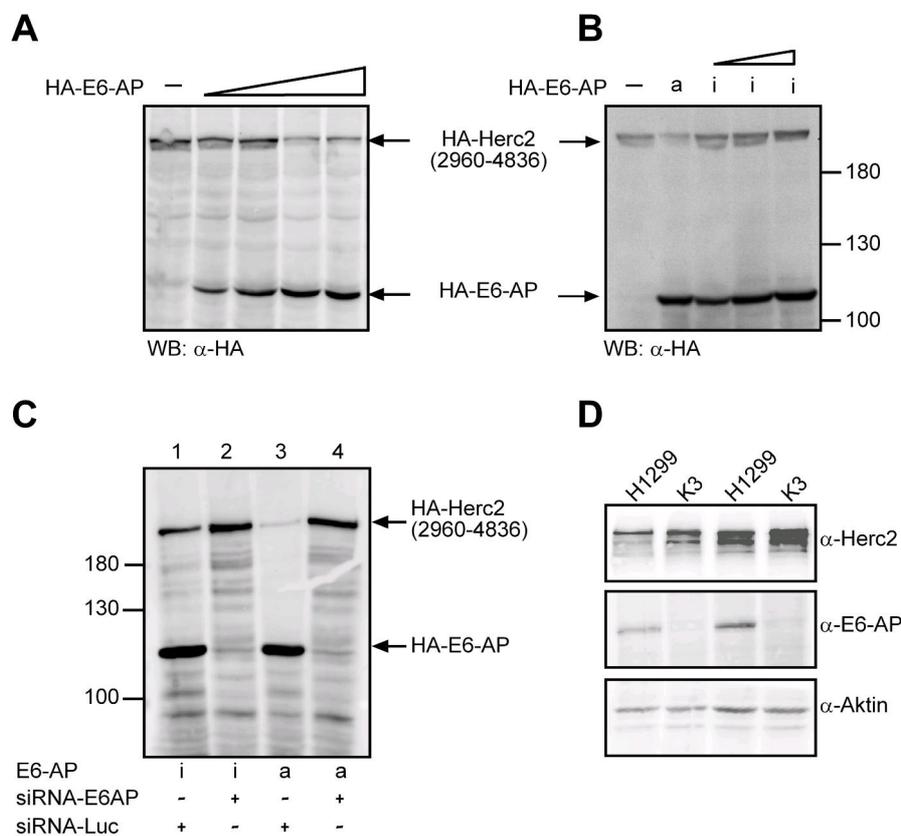


Abb. 30: Aktives E6-AP führt zum Abbau von Herc2.

(A) Ein für HA-Herc2(2960-4836)-kodierendes Expressionsplasmid wurde mit einer ansteigenden Menge eines für HA-E6-AP-kodierenden Konstruktes kotransfiziert. Der Angleich der Transfektionseffizienz erfolgte über die Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase, welche von einem kotransfizierten β -Galaktosidase-kodierenden Vektor exprimiert wird (2.2.9.1). Die Auswertung erfolgte im Westernblot mit einem Antikörper gegen HA. (B) wie (A), jedoch wurden steigende Mengen eines für katalytisch-inaktives E6-AP kodierendes Expressionskonstrukts kotransfiziert. (C) Zu HA-Herc2(2960-4836) wurden für entweder aktives oder inaktives E6-AP kodierende Expressionskonstrukte mit und ohne vektorbasierende siRNA-Konstrukte gegen E6-AP kotransfiziert. Die Zellen wurden 72 h selektiert und das Lysat mittels Westernblot analysiert. (D) Lysate von H1299 Wildtyp Zellen und von stabilen E6-AP-„knock down“-Zellen (H1299-siRNA-E6-AP-K3) wurden durch Proteinbestimmung angeglichen und im Westernblot mit einem monoklonalen Herc2- und E6-AP-Antikörper, sowie einem polyklonalen Aktin-Antikörper untersucht.

Durch Überexpression von E6-AP konnte dagegen kein Abbau von endogenem Herc2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist möglicherweise auf eine zu geringe Expression von E6-AP zurückzuführen.

Da, wie bereits beschrieben, ein Abbau von Herc2(2960-4836) durch Überexpression von E6-AP beobachtet wurde, lag die Vermutung nahe, dass E6-AP als Ligase die Polyubiquitinierung von Herc2(2960-4836) vermittelt und es dem proteasomalen Abbau zuführt. Eine Behandlung der Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 führte jedoch nicht zu einer Anreicherung von HA-Herc2(2960-4836). Zur Optimierung wurden verschiedenen Konzentrationen (Abb. 31A) und verschiedene Inkubationszeiten mit MG132 ausgetestet (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle, dass das MG132 funktionsfähig war, wurde p53 mit E6-AP und dem viralen Onkoprotein E6 vom HPV Typ 16 kotransfiziert. Der Abbau von p53, nicht aber von Herc2(2960-4836), konnte mit Hilfe des Proteasominhibitors MG132 blockiert werden (Abb. 31B).

Eine andere Überlegung war, dass E6-AP Herc2 so modifiziert, dass es unlöslich wird und somit nicht im Überstand nach der Zelllyse vorkommt. Um dies zu überprüfen, wurde nach der Zelllyse auch das Pellet mit Laemmli-Probenpuffer versetzt oder die Zellen komplett in diesem Puffer lysiert (Abb. 31C). Herc2(2960-4836) konnte mit kotransfiziertem E6-AP nicht in unlöslicher Form nachgewiesen werden. Durch die direkte Behandlung des Zellpellets mit SDS-Probenpuffer nach Laemmli konnten auch eventuelle postlytische Artefakte ausgeschlossen werden.

Zur Überprüfung, ob Herc2 durch die zusätzliche Koexpression von E6-AP ein kurzlebiges Protein wird, wurden Halbwertszeitmessungen durchgeführt. Dazu wurden stabile Klone erzeugt, die HA-Herc2(2960-4836) exprimieren. Für die folgende Stabilitätsuntersuchung wurde die Proteinbiosynthese durch den Inhibitor Cycloheximid gehemmt. Es wurde bereits exprimiertes HA-Herc2(2960-4836) in An- und Abwesenheit von transient überexprimiertem E6-AP über einen Zeitraum von 8 h untersucht. Nach 0, 2, 4 und 8 h wurden Zellextrakte über Proteinbestimmung angeglichen und analysiert. Der Abbau von Herc2(2960-4836) durch E6-AP erfolgte bereits zur Stunde 0, auch nach Blockierung der Neusynthese von Herc2 erfolgte kein weiterer Abbau (Abb. 31D), obwohl E6-AP über den Zeitraum von 8 h stabil war (Daten nicht gezeigt). Es besteht die Möglichkeit, dass auch andere Proteine an einem Abbau von Herc2 beteiligt sind. Wären diese kurzlebig, könnte anschließend kein weiterer Abbau erfolgen.

Untersucht wurden die HPV18 positiven Zervixkarzinomzelllinien HeLa, sowie HeLa-A1 und die humanen HPV-negativen Zelllinien, Retale Colonkarzinom-Zelllinie (RKO), sowie die Keratinozytenzelllinie HaCaT. Da in HeLa-Zellen E6-AP mit dem viralen E6-Onkoprotein assoziiert vorliegen kann und in diesem Komplex die Eigenschaft als Ubiquitin-Protein-Ligase für p53 übernimmt, könnte die Möglichkeit bestehen, das Herc2 in diesen Zellen anders reguliert wird. Auch könnte sich eine Untersuchung von HeLa-A1 Zellen in diesem Zusammenhang als interessant erweisen. In HeLa-A1 wurde die Bildung von p53 durch ein stabil integriertes p53-RNAi-Plasmid unterdrückt (Hengstermann et al., 2005). Die Zellen wurden ausgesät, das Medium bei einer Konfluenz von 90 % mit Cycloheximid versetzt und über einen Zeitraum von 12 h untersucht. Nach 3, 6, 9 und 12 h wurden Zellextrakte gewonnen, über Gesamtproteinbestimmung angeglichen, elektrophoretisch auf einem 3-15 %igen Gradientengel aufgetrennt und im Westernblot ausgewertet. Herc2 ist in allen untersuchten Zelllinien ein relativ stabiles Protein (Abb. 32A). Zum Vergleich ist p53 gezeigt. E6-AP ist, wie Herc2, über den Zeitraum von 12 h stabil (Daten nicht gezeigt). Auch beim Vergleich verschieden konfluenter Zellen konnte kein Unterschied in der Stabilität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

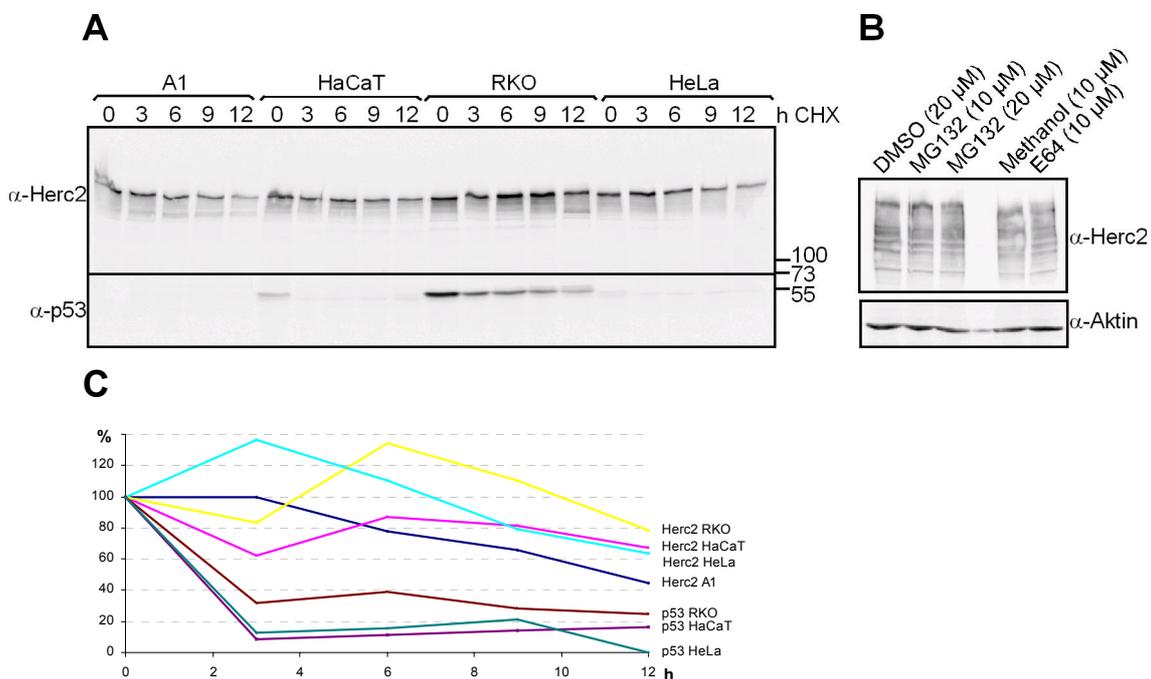


Abb. 32 Stabilität von endogenem Herc2

(A) Das Medium der angegebenen Zelllinien wurde für 0, 3, 6, 9 und 12 h mit Cycloheximid versetzt (2.2.9.2). Die Gesamtzelllysate wurden durch Proteinbestimmung angeglichen und im Westernblot mit einem monoklonalen Herc2- und p53-Antikörper ausgewertet. (B) Dem Medium von H1299 Zellen wurde entweder 10 μM MG132 oder E644 zugegeben. Nach 4 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate im Westernblot mit einem monoklonalen Herc2-Antikörper oder einem polyklonalen Aktin-Antiserum analysiert. (C) Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung von (A).

Zur weiteren Stabilitätsuntersuchung von Herc2 wurden H1299 Zellen mit MG132 bzw. mit E64d-haltigem Medium unter Standardbedingungen inkubiert. Es zeigte sich weder mit dem proteasomalen (MG132) noch mit dem lysosomalen (E64d) Inhibitor eine Stabilisierung von endogenem Herc2 (Abb. 32B).

3.4.2 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Herc2

Herc2 enthält keine bekannten Motive, die auf eine bestimmte intrazelluläre Lokalisation in der Zelle hinweisen. Zur Untersuchung, wo sich Herc2 in der Zelle befindet, wurden durch differentielle Zentrifugation Kern-, Membran- und cytosolische Fraktionen aus HEK-Zellen erzeugt (2.2.13). Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden in einem 3-15 %igen Gradientengel aufgetrennt und im Westernblot mit einem Herc2-Antikörper analysiert. Herc2 konnte in der Kern- und in der Membranfraktion gefunden werden, jedoch nicht in der cytosolhaltigen Fraktion (Abb. 33A). Zur Überprüfung der subzellulären Fraktionierung wurde der Blot mit Antikörpern gegen Aldolase und DEK inkubiert. Aldolase ist überwiegend im Cytosol der Zelle zu finden und DEK ist, als ein chromatinassoziiertes Protein, im Zellkern lokalisiert (Denison et al., 1986; Kappes et al., 2001). Beide Proteine sind nach der Fraktionierung in der entsprechenden Fraktion zu finden (Abb. 33A).

Zur weiteren Untersuchung wurden aus HeLa-Zellen die Kerne isoliert und in eine Kernstruktur- und Nukleosolfraktion separiert (2.2.13). Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden einer Westernblotanalyse unterzogen, wobei Herc2 in der cytoplasmatischen und in der Kernstrukturen-Fraktion detektiert wurde (Abb. 33B). Zum Vergleich wurde der Blot mit α -p53 und α -E6-AP-Antikörpern untersucht. Von p53 ist bekannt, dass es zwischen Cytosol und Nukleus „shutteln“ kann (Tao und Levine, 1999). Es wurde in allen Fraktionen detektiert (Abb. 33B). Bekannte Daten über die Lokalisation von E6-AP beziehen sich ausschließlich auf Immunfluoreszenzmikroskopieuntersuchungen (Daniels et al., 1998). In diesen Studien liegt E6-AP hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert vor. In der gezeigten biochemischen Lokalisationsanalyse konnte E6-AP im Cytoplasma und im Nukleosol nachgewiesen werden. Ob die vom Antikörper detektierte Bande in der Kernstrukturen-Fraktion E6-AP darstellt oder einem unspezifischen Hintergrund zuzuordnen ist, konnte nicht geklärt werden.

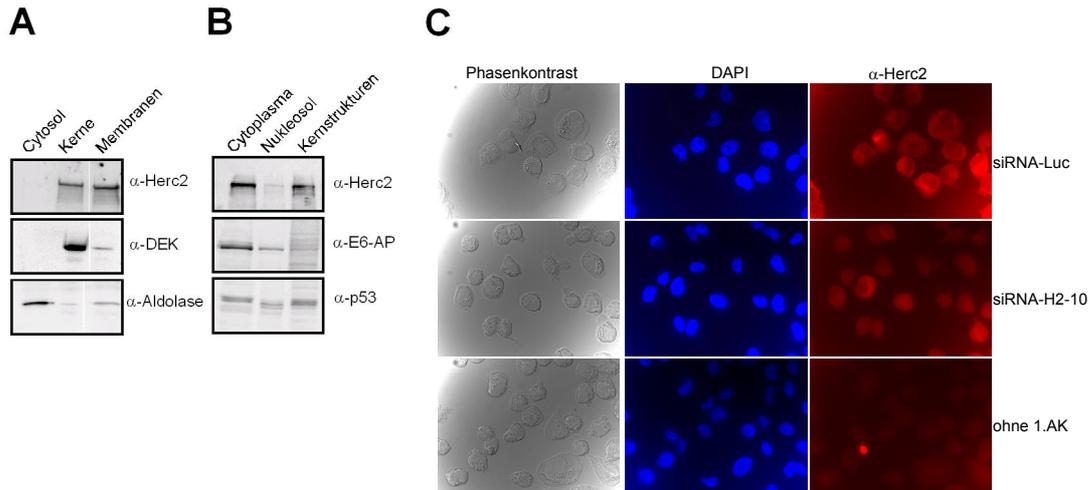


Abb. 33: Subzelluläre Lokalisation von Herc2

(A) Westernblot einer subzellulären Fraktionierung von HEK-Zellen mit einem monoklonalen Herc2-, DEK- und Aldolase-Antikörper (2.2.13). (B) Westernblotanalyse einer Kernfraktionierung von HeLa-Zellen mit einem monoklonalen Herc2-, E6-AP- und p53-Antikörper (2.2.13). (C) H1299-Zellen wurden mit siRNA gegen Herc2 (siRNA-H2-10) und siRNA gegen Luciferase (siRNA-Luc) transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und für Immunfluoreszenzaufnahmen präpariert (2.2.12).

Um die Lokalisation von Herc2 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in der Zelle zu untersuchen, wurden H1299 Zellen entweder mit siRNA gegen Herc2 oder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen fixiert und die Proteine mit einem monoklonalen Herc2-Antikörper in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, wiesen ohne Ausnahme eine cytoplasmatische Färbung mit einer höheren Intensität am Rande des Zellkerns auf. In der Mehrzahl der mit der siRNA gegen Herc2 transfizierten Zellen konnte dagegen diese Färbung nicht nachgewiesen werden (Abb. 33C). Zusammengenommen mit den Ergebnissen aus der Zellfraktionierung folgt daraus, dass Herc2 wahrscheinlich außerhalb des Zellkerns mit der Kernmembran und anderen Membranen, wie dem Golgi-Apparat oder dem endoplasmatischen Retikulum, assoziiert vorliegt.

3.4.3 Klonierung von Gesamtlängen-Herc2

Zur näheren Charakterisierung von Herc2 war es unerlässlich für weitere Versuche ein Gesamtlängenkonstrukt, mit welchem Herc2 in Zellen exprimiert werden kann, zu klonieren. Als Ausgangsbasis für die Klonierung standen 6 überlappende Sequenzen der murinen Herc2 cDNA, welche freundlicherweise von R. D. Nicolls (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA, Ji et al., 1999) bereitgestellt wurden, zur Verfügung.

Die Nukleotidsequenzbereiche, die die einzelnen Klone umfassen, wurden in Abbildung 34 dargestellt. Nur in einem Überlappungsbereich war eine singuläre Restriktionsschnittstelle vorhanden, die direkt verwendet werden konnte (Überlappung Klon 169 und 183, *AhdI*, vgl. 2.2.3.13). Die restlichen Schnittstellen wurden entweder durch stille Mutationen eingefügt oder der Überlappungsbereich durch überhängende Oligonukleotide ausreichend verlängert. Zunächst wurden die einzelnen Klone mit den passenden Schnittstellen jeweils einzeln in Vektoren kloniert. Allerdings war es nicht möglich mit dem Klon 122 (vgl. Abb. 34 und 2.2.3.13) als „template“ ein PCR-Produkt zu generieren, welches die gesamte Nukleotidsequenz umfasste. Dies ist wahrscheinlich auf einen stark GC-reichen Sequenzbereich zurückzuführen. Aus diesem Grund wurden zwei Klone generiert. Ebenso musste auch die Sequenz des „template“ 183 in zwei Stücken kloniert werden. Schließlich konnte die *Herc2*-Sequenz in acht Klonen dargestellt werden. Diese Klone wurden durch N- und C-terminale Ansequenzierungen verifiziert. Unter Berücksichtigung, dass zuerst die Schnittstellen, die in der *Herc2*-Sequenz mehrfach schneiden, ligiert wurden, konnte ein Gesamtlängen *Herc2*-Konstrukt in einem Expressionsvektor erstellt werden.

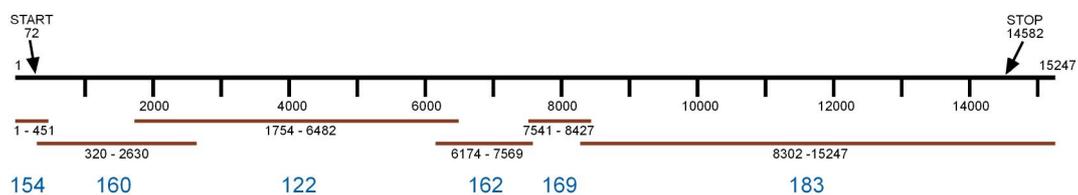


Abb. 34: Schematische Darstellung der Klonierung von Gesamtlängen *Herc2*

(A) Das Gesamttranskript von murinem *Herc2* wurde als schwarze Linie dargestellt. Translationsstart und -stop sind angegeben. Die von R. D. Nicolls zur Verfügung gestellten Klone sind als braune Striche dargestellt. Die Nummern repräsentieren den umfassenden Nukleotidsequenzbereich. In blau angegeben sind die von R. D. Nicolls verwendeten Namen der einzelnen Klone, die weiterhin übernommen wurden. Eine detaillierte Klonierungsstrategie ist unter 2.2.3.13 beschrieben.

Nach Erstellung des Gesamtlängenkonstruktes wurde die Expression getestet. Es konnte sowohl in der *in vitro* Translation als auch in der Expression nach transients Transfektion nur ein Produkt von ca. 180 kDa erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Durch Sequenzierung in dem der Größe entsprechenden Bereich wurde eine Mutation gefunden, die ein Stopkodon erzeugte. Durch Mutagenese-PCR wurde dieser Fehler behoben. Jedoch entsprach das exprimierte Produkt wiederum nicht der erwarteten Gesamtlängengröße, sondern nur ca. 300 kDa. Eine erneute Sequenzierung deckte das Fehlen zweier

benachbarter Basenpaare auf. Dies führte zu einem „frame shift“ und einem vorzeitigen Translationsstop. Der Verlust dieser beiden Basenpaare wurde versucht in einer weiteren Mutagenese-PCR rückgängig zu machen. Jedoch gelang es aus ungeklärten Gründen nicht, nach der Transformation des PCR-Produktes in kompetente Bakterien, Klone zu bekommen. Es konnte verifiziert werden, dass beide Mutageneseprimer unabhängig voneinander in Kombination mit anderen Primern funktionierten, dabei konnte auch gezeigt werden, dass das „template“ geeignet war. Sollte die Mutagenese-PCR nicht gelingen, muss die Mutation durch konventionelle PCR auf dem Einzelklon behoben werden und Herc2 wiederholt aus den Einzelklonen zusammen fusioniert werden. Für einen neuen Klonierungsansatz wäre es vernünftig, alle Einzelklone mit Start- und Stopkodon zu versehen und erst die Expression der Teilstücke zu testen, bevor das Gesamtlängenkonstrukt kloniert wird.

3.5 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von Herc2

Da weder über die physiologische Rolle noch über weitere Bindungspartner von Herc2 Erkenntnisse vorliegen, wurde sich erhofft, über die Identifikation neuer Interaktionspartner auf eine Rolle von Herc2 in der Zelle schließen zu können. Interessant erschien zunächst der Bereich von Herc2, der mit E6-AP interagiert. Weitere Bindungspartner an diesen Bereich könnten Aufschluss über eine eventuelle Regulation der Bindestelle geben.

3.5.1 Identifizierung potentieller Bindungspartner der RCC1b-Domäne von Herc2

Zur Isolierung von Bindungspartnern der RCC1b-Domäne von Herc2 wurde GST-RCC1b in *E. coli* exprimiert und an GSH-Sepharose gekoppelt. Es folgte eine Inkubation mit unbehandeltem Retikulozytenlysat aus Kaninchen. Als Kontrollen dienten an Sepharose gebundenes GST und GST-RCC1c. Nach 4 h wurden die an GST-RCC1b, GST-RCC1c oder GST gebundenen Proteine präzipitiert und gewaschen. Die Auftrennung erfolgte über SDS-PAGE und die Färbung mit Coomassie. Prominente Banden, die ausschließlich in dem GST-RCC1b-Ansatz, nicht aber in den Kontrollansätzen, detektiert wurden, wurden ausgeschnitten und ihre Identität über Massenspektrometrie bestimmt (Abb. 35).

Es konnten sämtliche Komponenten des Translationsinitiations-Komplexes gefunden werden.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob diese Proteine nur aus Retikulozytenlysat gewonnen werden können oder auch aus anderen Zelllysaten. Der Versuch wurde mit Lysat aus RKO-Zellen wiederholt. Das Gesamtbandenmuster unterschied sich von dem Präzipitationsexperiment mit dem Retikulozytenlysat. Unter der Berücksichtigung, dass Kaninchen und menschliche Proteine nicht exakt auf der gleiche Höhe mit SDS-Gel laufen müssen, wurde eine Bande aus dem Gel ausgeschnitten, die der Zuordnung von eIF-2 γ entsprechen könnte. Tatsächlich konnte auch aus dem RKO-Lysat diese Komponente des Translationsinitiationskomplexes identifiziert werden. Weitere Banden wurden nicht getestet.

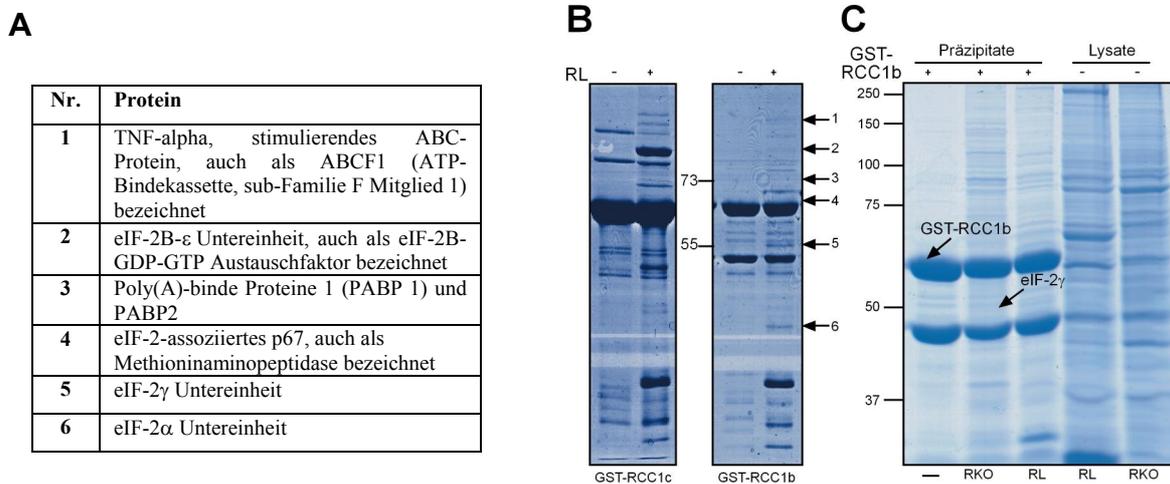


Abb. 35: Identifizierung potentieller Bindungspartner von RCC1b/Herc2

(A) Tabellarische Darstellung der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine. (B) Aus *E. coli* gereinigtes, an GSH-Sepharose gebundenes GST-RCC1b und RCC1c wurden über Nacht mit Kaninchen-Retikulozytenlysat inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Auftrennung mit anschließender Coomassie-Färbung in der SDS-PAGE. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind die mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteinbanden. Die numerische Zuordnung ist aus (A) zu entnehmen. (C) wie (B), es wurde RKO-Lysat im Vergleich zu Retikulozytenlysat verwendet.

3.5.2 Kopurifikation mit dem *E. coli* Protein Rho

Nach der Aufreinigung von GST-RCC1b/Herc2 fiel eine weitere Bande in der Coomassiefärbung unter der 55 kDa-Markerbande auf. Diese Bande wurde zu Beginn der Arbeit für ein C-terminales Abbauprodukt von GST-RCC1b gehalten. Allerdings konnte das entsprechende Protein mit Hochsals eluiert werden, was nicht möglich gewesen wäre, wenn das Protein einen intakten N-Terminus (GST) aufweisen würde (Abb. 36).

Schließlich ergab eine massenspektrometrische Bestimmung, dass es sich um den Transkriptionsterminationsfaktor Rho aus *E. coli* handelt. Im Folgenden wurde ausgeschlossen, dass der unter 3.5.1 isolierte Translationsinitiationskomplex nicht an das *E. coli* Protein bindet. Die Präzipitationsexperimente wurden nach Waschen des an GSH-Sepharose gebundenen GST-RCC1b mit Hochsalz-Puffer wiederholt. Die zuvor identifizierten Banden konnten auch ohne den *E. coli*-Faktor nachgewiesen werden. Auch konnten keine ähnlichen Banden nach einem Präzipitationsexperiment mit GST-Terminationsfaktor-Rho gefunden werden. Wieso der Transkriptionsfaktor so effizient an die RCC1b-Domäne von Herc2 bindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt (vgl. 4.5.1). Eine Vermutung war, dass eventuell DNA oder RNA der gemeinsame Bindungspartner sein könnte. Aber auch nach Behandlung mit DNase oder RNase konnte der *E. coli*-Faktor nicht eluiert werden.

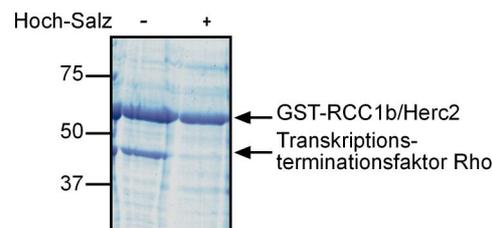


Abb. 36: Kopurifikation von GST-RCC1b mit dem *E. coli* Protein Rho

An GSH-Sepharose gebundenes GST-RCC1b/Herc2 wurde mit und ohne Hochsalz-Puffer gewaschen, in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (2.2.6.1, 2.2.6.2).

3.5.3 Bindung von eIF-2 γ an Herc2

Es konnten unter 3.5.1 Komponenten des Translationsinitiationskomplexes aus Zelllysat identifiziert werden, die mit der RCC1b-Domäne zu interagieren schienen. Unklar blieb jedoch, welche Komponenten direkt mit RCC1b interagieren. Es wurde entschieden zunächst mit der gamma-Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 2 (eIF-2 γ) zu arbeiten. Der eIF-2-Komplex ist ein heterotrimeres G-Protein. Die GTP-Bindestelle ist auf der Gamma-Untereinheit (eIF-2 γ) lokalisiert. Für RCC1 oder RCC1-ähnliche Domänen ist beschrieben, dass sie an kleine GTP-Bindeproteine binden und als Guaninaustauschfaktor fungieren können (vgl. 1.5.1.2).

Die Interaktion wurde *in vitro* in GST-Koprazipitationsassays überprüft. Dazu wurde entweder *in vitro* translatiertes [³⁵S]-markiertes eIF-2 γ mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-RCC1b/Herc2(2959-3327) bzw. GST-Herc2(2918-3606) inkubiert oder

in umgekehrter Richtung *in vitro* translatiertes RCC1b/Herc2, Herc2(2918-3606), sowie Herc2(2960-4836) mit GST-eIF-2 γ präzipitiert. Eine Bindung von den Herc2-Deletionsmutanten an eIF-2 γ konnte *in vitro* in beiden Richtungen nachgewiesen werden (Abb. 37A). Eine Aussage, ob es sich um eine direkte Bindung handelt, konnte aber nicht getroffen werden, da für die *in vitro* Translation Retikulozytenlysat benötigt wurde.

Um zu überprüfen, ob eine Bindung auch in humanen Zellen erfolgen kann, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente mit überexprimiertem eIF-2 γ und Herc2(2918-3606) durchgeführt. Die Immundetektion von eIF-2 γ konnte dabei nicht erfolgen, da seine Laufhöhe mit der schweren Kette der Immunglobuline G korreliert. Es konnte also nur die Präzipitation von eIF-2 γ erfolgen. Dazu wurden für HA-eIF-2 γ - und FLAG-Herc2(2918-3606)-kodierende Expressionsvektoren transient in humane H1299 Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das HA-markierte eIF-2 γ mittels eines monoklonalen HA-Antikörpers, welcher an Protein A-Sepharose gekoppelt war, präzipitiert. Nach erfolgter Trennung der Proteine in der SDS-PAGE und dem Transfer auf PVDF-Membran, folgte die Dekoration des Blots mit einem monoklonalen FLAG-Antikörper. Tatsächlich wurde Flag-Herc2(2918-3606) mit HA-eIF-2 γ koimmunpräzipitiert (Abb. 37B). Als Kontrolle diente HA-E6-AP. Es konnte dabei mehr FLAG-Herc2(2918-3606) an HA-E6-AP als an HA-eIF-2 γ nachgewiesen werden. Allerdings wurde in den Zellen auch eine höhere Menge HA-E6-AP als HA-eIF-2 γ exprimiert, was nach „Strippen“ der Membran und Detektion mit einem HA-Antikörper gezeigt werden konnte (Abb. 37B).

Zur Überprüfung, ob auch das längere Herc2(2960-4836) mit eIF-2 γ interagiert, wurden H1299 Zellen mit HA-Herc2(2918-3606) und HA-Herc2(2960-4836) transient transfiziert. Nach dem Aufschluss der Zellen wurde das Lysat mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-eIF-2 γ inkubiert. GST-E6-AP(1-500) diente dabei als positiv, GST als negativ Kontrolle. Die Präzipitate wurden gewaschen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte ein Westernblot mit einem monoklonalen Antikörper gegen HA. Wiederum konnte eine Bindung von eIF-2 γ an HA-Herc2(2918-3606) gezeigt werden (Abb. 37C). Jedoch konnte keine Bindung des längeren Herc2(2960-4836) nachgewiesen werden (Abb. 37C).

Ebenso wenig konnte die Bindung von endogenem Herc2 in einem ähnlichen Ansatz detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit blieb die physiologische Relevanz der Bindung zwischen eIF-2 γ und Herc2 unklar.

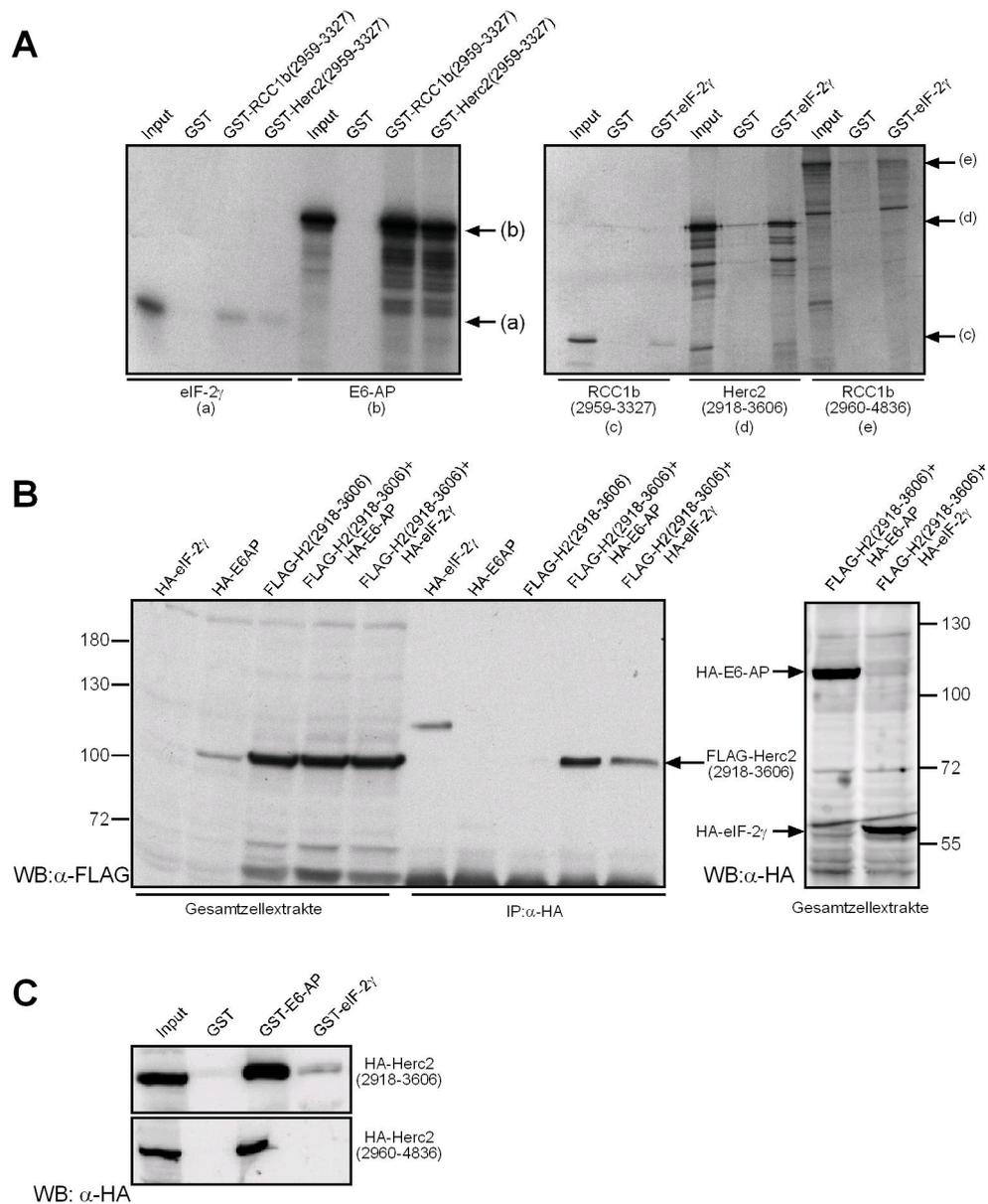


Abb. 37: Bindung von eIF-2 γ an Herc2

(A) An GSH-Sepharose gebundene GST-Fusionsproteine (GST, GST-RCC1b, GST-Herc2(2918-3606) bzw. GST-eIF-2 γ) wurden mit *in vitro* translatiertem eIF-2 γ bzw. RCC1b, Herc2(2918-3606) und Herc2(2960-4836) für 4 h bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde präzipitiert und gewaschen. Der Nachweis der radioaktiv markierten Proteine erfolgte mittels Fluorographie. (B) Koimmunpräzipitation von überexprimiertem FLAG-Herc2(2918-3606) mit HA-eIF-2 γ durch an Protein A-Sepharose gekoppelten HA-Antikörper. Als positiv Kontrolle wurde HA-E6-AP präzipitiert. Der Nachweis des kopräzipitierten FLAG-Herc2(2918-3606) erfolgte im Westernblot mit dem monoklonalen FLAG-Antikörper. (C) HA-Herc2(2918-3606) und HA-Herc2(2960-4836) wurden in H1299-Zellen transfiziert. Das Lysat wurde mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-eIF-2 γ bzw. GST-E6-AP über Nacht inkubiert. Der Nachweis von gebundenem HA-Herc2 erfolgte mit dem HA-Antikörper im Westernblot.

4 Diskussion

E6-AP wurde vor ca. 10 Jahren als erstes Mitglied der HECT-Ligasen identifiziert (Huibregtse et al., 1995). In Zellen, die mit sogenannten *high risk* Papillomviren infiziert sind, bildet es einen Komplex mit dem viralen E6-Onkoprotein und markiert den Tumorsuppressor p53 für den proteasomalen Abbau (Scheffner et al., 1993). Über Substrate von E6-AP in HPV-negativen Zellen ist dagegen bisher wenig bekannt. Dass E6-AP wichtige zelluläre Substrate hat, die vermutlich die Entwicklung des Gehirns beeinflussen, wird bei Patienten mit Mutationen im E6-AP-Gen ersichtlich. Mutationen, welche die Expression eines funktionellen E6-APs verhindern, stehen mit dem Angelman-Syndrom, einer erblichen, neurodegenerativen Erkrankung, im Zusammenhang (Albrecht et al., 1997; Matsuura et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Interaktion von E6-AP mit einem weiteren HECT-Domänen-haltigen Protein, dem Herc2 belegt werden. Interessanterweise ist das für Herc2-kodierende Gen in der gleichen chromosomalen Region (15q11-q13), wie das Gen für E6-AP lokalisiert. Mutationen im homologen Herc2-Gen der Maus führen zu neuromuskulären Entwicklungsstörungen sowie zu Fertilitätsdefekten (*rjs*-Phänotyp).

Durch die Charakterisierung der Interaktion zwischen E6-AP und Herc2 konnten in dieser Arbeit Hinweise auf ein mögliches neues Substrat von E6-AP, sowie auf eine mögliche Regulation von E6-AP durch Herc2 und desweiteren erste Daten über die putative Herc2-HECT-Ligase erhalten werden.

Dass in dieser Arbeit häufig nur mit einem Teil des Gesamtlängenproteins gearbeitet wurde, könnte die physiologische Relevanz der Ergebnisse in Frage stellen. Aber am Beispiel von Herc1 ist zu erkennen, dass häufig keine andere Möglichkeit besteht, um mit einem so großen Protein zu arbeiten. So konnte der Nachweis von Herc1 anfangs nur durch Immunpräzipitation von radioaktiv markiertem Zelllysate erfolgen. Auch eine Generierung des Gesamtlängenproteins im Baculovirussystem resultierte in einer extrem niedrigen Expression (Rosa et al., 1996). So wurden fast alle Versuche aufgrund dieser technischen Probleme mit isolierten Domänen durchgeführt und gezeigt, dass so durchaus physiologisch relevante Ergebnisse zu erzielen sind (Rosa und Barbacid, 1997; Rosa et al., 1996).

Bei den Herc2-Maus-Mutanten kommt es zur Ausbildung des kompletten *rjs*-Phänotyps (vgl. 1.9), wenn die Aminosäuren 4428-4748 oder 3716-3768 von Herc2 deletiert sind

(Ji et al., 1999; Lehman et al., 1998). Dies sind Hinweise darauf, dass eine intakte HECT-Domäne sowie die Region zwischen RCC1b und RCC1c besonders wichtig für die Funktion von Herc2 sind. Diese beiden wichtigen Bereiche umfasst das Herc2-Konstrukt Herc2(2960-4836) mit dem in dieser Arbeit hauptsächlich gearbeitet wurde.

4.1 Herc2 als Bindungspartner von E6-AP

4.1.1 Herc2 ist ein Bindungspartner von E6-AP *in vitro*

In dieser Arbeit konnte anhand von GST-Bindeassays die im „Yeast Two Hybrid“ beobachtete Bindung zwischen E6-AP und Herc2 *in vitro* bestätigt werden (Abb. 8). Von den drei RCC1-ähnlichen Domänen auf Herc2 ist nur die RCC1b-Domäne für eine Bindung an E6-AP notwendig (Abb. 9). Es wurde nachgewiesen, dass die beiden anderen RCC1-ähnlichen Domänen von Herc2 nicht an E6-AP binden können (Abb. 10). Ebenso zeigte auch die zweite RCC1-ähnliche Domäne von Herc1 keine Bindung an E6-AP (Abb. 10). Somit kann die Bindung zwischen Herc2 und E6-AP als spezifisch angesehen und RCC1-ähnliche Domänen als ein allgemeines Bindemotiv für E6-AP ausgeschlossen werden.

Die RCC1-Domäne ist eine Proteininteraktionsdomäne und nimmt in der dreidimensionalen Struktur die Form eines siebenfach gefächerten Propellers ein (Renault et al., 2001). Das RCC1-Protein ist ein Guaninaustauschfaktor für die kleine GTPase Ran. Für den RCC1b-E6-AP-Komplex gibt es keine Hinweise auf eine solche Funktion. Eine gleichzeitige Bindung weiterer Proteine an die RCC1b-Domäne ist jedoch nicht ausgeschlossen, da z. B. das RCC1-Protein mit der einen Seite der Propellerstruktur an Ran bindet, während die andere mit dem Chromatin assoziiert vorliegt (Renault et al., 2001). Über Herc1 ist bekannt, dass es mit seiner zweiten RCC1-ähnlichen Domäne an ARF-GTPasen binden kann und mit seiner ersten RCC1-ähnlichen Domäne die Guaninnukleotid-Dissoziation stimuliert (Rosa et al., 1996). So ist auch für Herc2 möglich, dass es neben E6-AP über die RCC1b-Domäne GTPasen binden kann. Ebenso ist vorstellbar, dass Herc2 mit seinen RCC1-ähnlichen Domänen GTP-Dissoziationen katalysieren kann. Eine Bindung von mehreren E6-AP-Molekülen gleichzeitig an die RCC1b-Domäne kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden (vgl. 4.3.2).

Der Bindebereich von Herc2 konnte auf die Aminosäuren 150-200 von E6-AP eingeschränkt werden (Abb. 12). Dieser Bereich ist weder für die Bindung des E6-Onkoproteins noch die E6-abhängige Ubiquitinierung von p53 erforderlich (vgl. 1.8). Auch scheint diese Region nicht für die Funktion als Steroidhormonrezeptor-Koaktivator essentiell zu sein (Nawaz et al., 1999). Herc2 bindet demnach an einen bisher nicht charakterisierten Bereich von E6-AP. In Datenbankanalysen wurden keine Proteine gefunden, die eine auffallende Ähnlichkeit zu diesem Bereich haben. Da es zumindest nach der Primäraminosäuresequenz keine weiteren ähnlichen Proteine gibt, ist es ausgeschlossen, dass Herc2 nur aufgrund einer Ähnlichkeit zu anderen Proteinen an E6-AP binden würde. Dies spricht zusätzlich für die Spezifität der Bindung zwischen Herc2 und E6-AP. Datenbanksuchen nach bekannten Motiven oder Modifikationsstellen ergaben drei putative Phosphorylierungsstellen in dem Bindebereich von Herc2. Somit wäre es interessant zu untersuchen, ob die Interaktion von Herc2 mit E6-AP über Phosphorylierung reguliert wird.

4.1.2 Herc2 ist ein Bindungspartner von E6-AP *in vivo*

Durch die Verwendung von GST-E6 als eine Art Affinitätsmatrix, die ausreichende Mengen an E6-AP aus Zelllysaten präzipitieren kann, wurde gezeigt, dass endogenes E6-AP an endogenes Herc2 bindet (Abb. 18). Eine E6-Mutante, die kein E6-AP binden kann, konnte auch kein Herc2 präzipitieren (Daten nicht gezeigt). Dies weist daraufhin, dass die RCC1b-Domäne auch im gesamten Protein für die Bindung an E6-AP zugänglich ist.

Durch eine Reihe von Experimenten (Abb. 13), konnte zusätzlich belegt werden, dass die Bindung von E6-AP und Herc2 in Zellen unabhängig vom E6-Onkoprotein des HPVs erfolgt. Herc2 weist zu keinem der bisher beschriebenen E6-unabhängigen Bindungspartner von E6-AP eine strukturelle oder funktionelle Ähnlichkeit auf (z. B. Blk oder HHR23A/B, vgl. 1.8).

Zudem konnte hiermit der erste Bindepartner für Herc2 isoliert werden. Interessanterweise handelt es sich dabei um die erste identifizierte Interaktion zweier HECT-E3-Ligasen. Aus der Literatur ist lediglich bekannt, dass zwei verschiedene HECT-Ligasen an das gleiche Substrat binden können (Ikeda et al., 2000; Levy et al., 2005). Auch wenn ihre Interaktion untereinander nicht untersucht wurde, ist diese unwahrscheinlich, da beide HECT-Ligasen an das selbe Motiv im Substrat binden. Dagegen ist eine Interaktion von verschiedenen

RING-Finger-E3-Ligasen bekannt (Tanimura et al., 1999; Ulrich und Jentsch, 2000; Wu et al., 1996). Zum Beispiel stimuliert das RING-Finger-Protein MdmX durch seine Bindung die Autoubiquitinierung des RING-Finger-Proteins Mdm2 (Linares et al., 2003). Allerdings wird eine Interaktion zweier RING-Finger-E3-Ligasen über die RING-Finger-Domäne vermittelt, während die Bindung zwischen Herc2 und E6-AP unabhängig von der HECT-Domäne verläuft. Die Möglichkeit, dass E6-AP und Herc2 ebenfalls gegenseitig ihre Ligase-Funktion beeinflussen wird unter 4.2.1 diskutiert.

Es ist nicht völlig auszuschließen, dass eine Bindung in Zelllysaten nur aufgrund von „post-Lyse-Artefakten“ nachweisbar sein könnte. Es ist denkbar, dass E6-AP und Herc2 in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert sind und in der intakten Zelle somit nicht aneinander binden. Eine solche Möglichkeit könnte durch eine Kolo-kalisation in Immunfluoreszenzstudien oder in Zellfraktionierungsexperimenten ausgeschlossen werden (vgl. 4.4.3.2). Da aber Effekte von E6-AP auf Herc2 in Zellen gezeigt werden konnten (Abb. 30), ist ersichtlich, dass die Proteine auch in der intakten Zelle interagieren.

4.2 Herc2 als Ligase

4.2.1 Herc2 ist eine E3-Ligase

HECT-Domänen-Proteine binden E2-Enzyme, übernehmen von diesen Ubiquitin und binden es in Form eines Thioesters. Die HECT-Domäne ist für die Reaktion ausreichend (Schwarz et al., 1998). Für die meisten HECT-Proteine ist mindestens eines der Ubcs H5, H7 oder H8 als Ubiquitinübertragungs-Partner beschrieben worden (Kumar et al., 1997; Schwarz et al., 1998). Ebenso konnte für einige Herc-Proteine eine Thioesterbildung nachgewiesen werden. So formen Herc1 und Herc5 einen Thioester mit Ubiquitin in Anwesenheit von UbcH5a (Cruz et al., 2001; Schwarz et al., 1998). Für Herc2 konnte dagegen kein Thioester mit den Ubcs H5 und H7 unter den gewählten Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 19). Es sollte erwähnt werden, dass es sich um die selben Bedingungen handelte, wie sie auch von Schwarz et al. verwendet wurden und zu einem standardisierten Assay in unserem Labor gehören. Es könnte vermutet werden, dass andere Ubcs als die bisher für HECT-Proteine beschriebenen eine Interaktion mit Herc2 eingehen. Eine weitere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass die nach einem Sequenzabgleich bestimmte HECT-Domäne nicht vollständig war und somit der gewählte

Bereich für die Funktion wichtige Regionen nicht umfasste. Hierbei könnte es sich beispielsweise um Bereiche handeln, die für eine aktivierende Modifikation notwendig gewesen wären.

Auch von einem anderen HECT-E3 (HectH5) wurde berichtet, dass es nicht möglich war, einen Thioester darzustellen (Schwarz et al., 1998), obwohl mit den gleichen E2-Enzymen eine Aktivität in einem *in vitro* Ubiquitinierungsassay nachgewiesen werden konnte (Fotia et al., 2006; Hatakeyama et al., 1997). So konnte auch für Herc2 eine, wenn auch schwache, Ligaseaktivität in der Autoubiquitinierung nachgewiesen werden (Abb. 20 und 21). Da bei der Autoubiquitinierung von E6-AP die Zugabe von im Baculovirussystem exprimierten E6-AP für eine effizientere Ubiquitinierung sorgte (Nuber et al., 1998), wurde analog auch für Herc2(2980-4836) ein rekombinantes Baculovirus zur Expression von Herc2 generiert. Im Vergleich zu E6-AP war jedoch die von den Insektenzellen exprimierte Menge von Herc2 sehr viel geringer und wies nach der Aufarbeitung eine Vielzahl von Abbaubanden auf. Dass es sich um Abbauprodukte handelte und nicht um kopurifizierende Proteine, wurde daraus abgeleitet, dass sie vom polyklonalen Herc2-Antikörper erkannt wurden. Da bei der Zugabe von gereinigtem Lysat im Ubiquitinierungsassay auf *in vitro* translatierten Herc2-Deletionsmutanten keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass der Ubiquitintransfer im Fall von Herc2 eher nach einem cis-Mechanismus verläuft. (Man spricht von einer Ubiquitinierung in cis, wenn der Ubiquitintransfer intramolekular verläuft. Bei einer trans-Ubiquitinierung überträgt ein Protein Ubiquitin auf ein anderes in einer intermolekularen Reaktion). Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass die in Insektenzellen exprimierte Herc2-Ligase funktionell nicht aktiv genug ist, um einen Effekt zu erzielen. Tatsächlich wurden im Autoubiquitinierungsassay mit an Ni-NTA gebundenem Herc2 (Abb. 21) nur sehr geringe Proteinmengen modifiziert. Im Vergleich dazu wurden andere getestete E3-Ligasen zu einem sehr viel größeren Anteil ubiquitiniert (Abb. 24).

Es stellt sich die Frage, weshalb rekombinantes Herc2 eine so geringe Aktivität aufwies. Eine Reihe von E3-Ligasen sind als Homo- oder Heterodimere aktiv oder werden zur Aktivierung modifiziert (vgl. 1.5.2.1). Da es sich bei Herc2(2960-4836) um eine N-terminale Deletionsmutante handelt, ist nicht auszuschließen, dass Domänen für eine Dimerisierung fehlen. Dabei könnte es sich beispielsweise um den ZZ-Typ Zinkfinger von Herc2 handeln, der als eine mögliche Proteininteraktionsdomäne beschrieben ist (Giles et al., 1998; Ponting et al., 1996). Alternativ ist vorstellbar, dass eine zusätzliche

Modifikation (oder Demodifikation), wie z. B. der Phosphorylierung, notwendig ist, um die Herc2(2960-4836)-Aktivität zu stimulieren. Möglich ist auch, dass Herc2 seine vollständige Ligaseaktivität nur im Komplex mit E6-AP erhält. Wie auch unter 4.1.2 beschrieben, ist für eine Reihe von RING-Finger-Ligasen bekannt, dass sie im Komplex mit anderen RING-Fingern eine weitaus höhere Aktivität aufweisen als alleine. So hat BRCA1 allein nur eine schwache Ligaseaktivität inne, während für BARD1 bisher keinerlei Aktivität nachgewiesen wurde. Beide Proteine im Komplex ergeben eine potente Ligase (Hashizume et al., 2001). Würde Herc2 erst im Komplex mit E6-AP vollständig aktiv, wäre dies eine mögliche Erklärung, warum kein Thioester auf der HECT-Domäne von Herc2 nachweisbar war (Abb. 19).

4.2.2 Herc2 bildet Ubiquitinketten durch die Lysine K6, K11, K48, K63

Eine Untersuchung, über welche Lysine eine Ubiquitinkette verknüpft ist, kann wichtige Erkenntnisse über die Funktion der Kette bringen (vgl. 1.3). Herc2 wies zwar nur eine schwache Ligaseaktivität auf, dennoch konnten ausreichende Mengen an Ubiquitinketten generiert werden, die zur massenspektrometrischen Analyse ausreichten (Abb. 21). Es konnten K6-, K11-, K48- und K63-Ketten nachgewiesen werden. Im N-terminalen Fragment, welches die Aminosäuren 1-11 von Ubiquitin repräsentiert, wurde noch eine zweite Modifikation durch Ubiquitin nachgewiesen, die entweder dem N-Terminus oder K11 zugeordnet werden kann (Abb. 23). Die momentan gängige Meinung ist jedoch: Wenn ein Lysin modifiziert vorliegt, kann das Trypsin nicht schneiden (zur Methode vgl. Abb. 22) (Kirkpatrick et al., 2005; Peng et al., 2003). Somit handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine weitere K11-Verknüpfung. Die andere Möglichkeit wäre eine Modifikation des N-Terminus. Eine Verknüpfung zweier Ubiquitinmoleküle über den N-Terminus wurde erst einmal in der Literatur erwähnt (Hodgins et al., 1996). Diese Daten beruhen auf Mutationsstudien, in denen mit der K0- (Ubiquitin ohne Lysine) und der K48R-Mutante (Lysin 48 durch Arginin ersetzt) ein identisches Ubiquitinierungsmuster nachgewiesen werden konnte, welches bei Verwendung eines N-terminal „getaggt“-UbiquitinK48Rs verschwand. Allerdings war die Ubiquitinierungseffizienz bei Verwendung einer K48-Mutante (nur Lysin 48 vorhanden) oder eines N-terminal „getaggt“- Wildtypubiquitins wesentlich ausgeprägter, so dass die Signifikanz dieser Studie als fraglich eingestuft werden kann.

Mit der hier verwendeten Methode der Massenspektrometrie kann nicht bestimmt werden, wie häufig ein gegebenes Lysin zur Kettenbildung genutzt wird. Auch wenn ein bestimmtes Lysin nicht modifiziert gefunden wurde, kann daraus nicht notwendigerweise geschlossen werden, dass es nicht zur Verknüpfung verwendet wird. So wird z. B. das K29-haltige Peptid einfach aufgrund seiner geringen Größe von zwei Aminosäuren fast nie massenspektrometrisch nachgewiesen. Es ist auch nicht geklärt, ob es sich um reine K48, K63 etc. oder um gemischte Ketten handelt. Berichte über gemischte Ketten, so wie bei Herc2 im N-terminalen Bereich, sind bisher sehr selten. Es wurde lediglich in einem Fall eine Verzweigung bei Lysin 29 und 33 beschrieben (Peng et al., 2003). Ob diese Kette an einem Substrat gebunden vorliegt und welche E2s und E3s an der Bildung beteiligt sind, ist nicht bekannt. Aus den Daten der vorliegenden Arbeit kann abgeleitet werden, dass Herc2(2960-4836) *in vitro* fähig ist, verschiedene Kettentypen zu bilden. Ob diese auch *in vivo* entstehen können, verbleibt unklar und wird unter 4.2.3 näher vertieft.

4.2.3 Andere Ligasen katalysieren auch Ubiquitinketten über verschiedene Lysine

Ebenso, wie für Herc2, konnten für die HECT-Ligase HectH9 sowie die RING-Finger Ligasen Ro52 und Livin α nachgewiesen werden, dass sie Ubiquitinketten, welche mit K11, K48 und K63 verknüpft sind, katalysieren. Teilweise konnten auch K6-verlinkte Ketten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu scheint E6-AP ausschließlich die Synthese von Ketten mit K48- und K11-Verknüpfungen zu katalysieren. Weshalb E6-AP keine K63-Ketten bilden kann, verbleibt unklar. Im Rahmen dieser Versuche wurde untersucht, ob E2-Enzyme eine Rolle bei der Ubiquitinkettenbildung spielen. Dies könnte erklären, warum ein E3-Enzym meistens mit mehreren E2-Enzymen reagieren kann, nämlich um verschiedene Ketten zu formen. So kann E6-AP z. B. mit den E2-Enzymen UbcH5 oder UbcH7 ubiquitiniert werden, aber auch nach Verwendung von verschiedenen E2s wurden keine anderen Lysine in der Ubiquitinkette anhand von massenspektrometrischen Analysen detektiert (Daten nicht gezeigt).

Es scheint weiterhin keine Rolle für die Ubiquitinketten-Katalyse zu spielen, ob es sich um eine RING-Finger-E3-Ligase (Ro52, Livin α) oder um eine HECT-E3-Ligase (Herc2, HectH9, E6-AP) handelt.

Da die Kettenverknüpfung die Funktion der Ubiquitinkette bestimmt, ist es denkbar, dass sämtliche Ligasen vielseitige Funktionen eingehen können. Es konnte in dieser Arbeit also belegt werden, dass viele Ligasen prinzipiell die Aktivität inne haben, verschiedene

Ketten zu bilden. Es ist aber wahrscheinlich, dass es in der Zelle je nach benötigter Funktion Faktoren gibt, die die Bildung von bestimmten Ubiquitinketten fördern. Die von Ligasen synthetisierten Ubiquitinketten wurden in dieser Arbeit anhand der Autoubiquitinierung nachgewiesen. So bleibt aber die Möglichkeit bestehen, dass die untersuchten Ligasen, wenn sie an ein Substrat binden, nur noch eine Kettenart bilden. Eventuell fehlen auch in diesen *in vitro* Versuchen regulatorische Faktoren, welche die Kettenverknüpfung beeinflussen und regulieren. Es könnte sich hierbei z. B. um E4-Faktoren handeln (vgl. 1.2.4) oder auch um Uba-Domänen-Proteine. Ubiquitin-assoziierte (Uba-) Domänen gelten als allgemeine Ubiquitin-Bindemotive (Hofmann und Bucher, 1996) und haben eine Präferenz für bestimmte Ubiquitinketten (Rao und Sastry, 2002; Wilkinson et al., 2001). So ist gezeigt worden, dass die Uba-Domäne von Rad23 besser an K48- als an K29- oder K63- verknüpfte Ketten bindet (Raasi und Pickart, 2003). Ob Uba-Domänen auch an der Bildung von unterschiedlichen Ketten beteiligt sind, ist zur Zeit noch unklar.

4.3 Herc2 als Effektor

4.3.1 RCC1b und E6 beeinflussen die Aktivität von E6-AP

RCC1b und E6 verändern zumindest *in vitro* nicht die Kettenverknüpfung von E6-AP (Abb. 25). Es konnte aber beobachtet werden, dass die Zugabe von RCC1b/Herc2 und E6/HPV16 jeweils zur Verstärkung der Ubiquitinierung führt. Für E6 ist beschrieben, dass es die Autoubiquitinierung von E6-AP verstärkt (Kao et al., 2000), und da angenommen wird, dass die Autoubiquitinierung von E6-AP zum Abbau im Proteasom führt (Nuber et al., 1998), entstehen vermutlich bevorzugt K48-Ketten. Dies ist im Einklang mit den erhaltenen Daten. Interessanterweise zeigte RCC1b ein ähnliches Phänomen wie E6. Es erscheint möglich, dass beide Proteine durch ihre Bindung die Konformation von E6-AP so verändern, dass mehr oder andere Lysine auf E6-AP für eine Ubiquitinierung zugänglich sind als in Abwesenheit von E6 oder RCC1b. Eine andere Möglichkeit ist, dass E2-Enzyme mit einer größeren Affinität gebunden werden können. Es liegt jedoch keine Kristallstruktur der N-terminalen Region von E6-AP vor, aus der ersichtlich würde, ob die E6-Bindestelle und die RCC1b-Bindestelle in räumlicher Nähe zu einander gelegen sind und somit ähnliche Effekte auf die Struktur von E6-AP haben könnten.

4.3.2 RCC1b und E6 beeinflussen die Aktivität von E6-AP-Mutanten

Zur weiteren Analyse, der unter 4.3.1 beschriebenen Effekte, wurde der Einfluss von RCC1b und E6 auf E6-AP-Mutanten untersucht. Dabei ist zu beachten, dass die meisten verwendeten Mutanten sich nicht autoubiquitinieren können, da ihnen einen Teil der HECT-Domäne fehlt. Dies bedeutet, dass sie nur noch ein Substrat für Gesamtlängen-E6-AP darstellen, aber nicht selber als Ligase aktiv sind. Der minimale Bereich von E6-AP, der von E6-AP noch als Substrat erkannt wird, umfasst die Aminosäuren 200-768 (Nuber et al., 1998). Auch ist belegt, dass die Autoubiquitinierung von Wildtyp-E6-AP nach einem trans-Mechanismus erfolgt (Nuber et al., 1998), d. h. ein E6-AP-Protein ubiquitiniert ein anderes.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass RCC1b und E6 teilweise gegensätzliche Effekte auf verschiedene Mutanten hervorrufen (Abb. 26A-H). Die Zugabe von E6 zu der katalytisch inaktiven E6-AP-Mutante blockierte die Ubiquitinierung nahezu vollständig, während die Zugabe von RCC1b die Ubiquitinierung verstärkte (Abb. 26C). Diese Effekte konnten ebenfalls bei Verwendung der E6-AP Δ C84-Mutante festgestellt werden (Abb. 26G). Im folgenden wird zunächst auf den Effekt von RCC1b eingegangen.

Eine Möglichkeit ist, dass RCC1b die E6-AP-Mutante so aktiviert, dass das vorhandene E6-AP, die Mutante besser als Substrat erkennen kann und deshalb eine verstärkte Ubiquitinierung ersichtlich ist. Alternativ wäre denkbar, dass RCC1b auf das Wildtyp-E6-AP wirkt und seine Ligaseaktivität verstärkt.

Wenn als Substrat eine E6-AP-Mutante eingesetzt wurde, die keine Bindestelle für RCC1b auf E6-AP aufwies, wurde kein aktivierender Effekt festgestellt. Dies könnte darauf hinweisen, dass RCC1b auf das Substrat wirkt. Andererseits ist bekannt, dass die Anwesenheit der RCC1b-Bindestelle erforderlich ist, damit E6-AP als Substrat erkannt wird. So wird die E6-AP Δ N199-Mutante schon wenig effizient als Substrat erkannt (Abb. 26E) und bindet auch kein RCC1b mehr. Dies würde also in Einklang mit beiden oben genannten Möglichkeiten stehen.

Ein aus den Daten abgeleitetes Modell (Abb. 38) wäre z. B., dass das RCC1b an das E6-AP-Substrat bindet und simultan ein weiteres E6-AP-Molekül rekrutiert, welches als Ligase fungiert und effizient an RCC1b gebundene Substrate ubiquitiniert. Interessant wäre, ob dieses Modell auch auf andere Bindungspartner von RCC1b übertragen werden kann. Es wäre möglich, dass auch diese in einem solchen Szenario von E6-AP ubiquitiniert würden. Experimentell wäre dieses Modell in der Gelfiltrationsanalyse

überprüfbar, da RCC1b mit mehreren E6-AP-Molekülen eine veränderte molekulare Masse aufweisen würde.

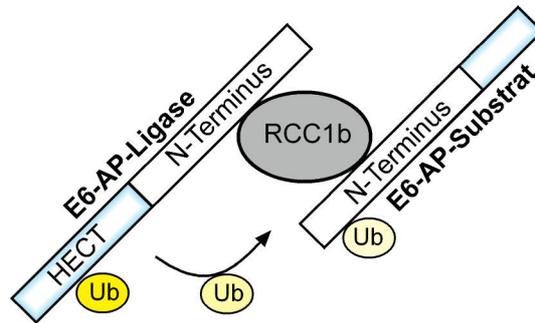


Abb. 38: Hypothetisches Modell des Einflusses von RCC1b auf die Autoubiquitinierung von E6-AP
RCC1b bindet eine E6-AP-Mutante, die nicht als Ligase aktiv ist und rekrutiert zusätzlich Wildtyp-E6-AP, welches die Übertragung von Ubiquitin auf die E6-AP-Mutante in einem trans-Mechanismus katalysiert.

Unterstützt wird das Modell durch die Beobachtung, dass das RCC1-Protein gleichzeitig mit dem Chromatin assoziiert vorliegen und das Protein Ran binden kann, da die Bindestellen auf zwei gegenüberliegenden Seiten der Propellerstruktur von RCC1 liegen (Renault et al., 2001). Dies belegt, dass die RCC1b-Domäne auch mehr als ein E6-AP binden könnte.

Allerdings muss erwähnt werden, dass die beobachteten Effekte von RCC1b nicht mit längeren Fragmenten gemacht werden konnten. Dies könnte aber auf die wesentlich geringeren Expressionen von GST-Herc2(2918-3606) und His₆-Herc2(2960-4836) zurückzuführen sein. Auch wenn es sich bei RCC1b nicht um ein komplettes Protein handelt, zeigen diese Daten, dass es Mechanismen gibt, welche die Ligase- oder Substrateigenschaften von E6-AP beeinflussen können. Ob es sich hierbei um einen Herc2 spezifischen Effekt handelt, kann nicht ausgesagt werden.

Ogleich E6, ähnlich wie RCC1b, die Aktivität der Autoubiquitinierung von E6-AP stimuliert, so scheint der zugrunde liegende Mechanismus doch unterschiedlich zu sein.

Alle verwendeten E6-AP-Mutanten, abgesehen von E6-APΔE6, enthalten die E6-Bindestelle. Weiterhin ist bekannt, dass diese zwar notwendig für eine Bindung von E6 an E6-AP, aber nicht ausreichend für eine E6-abhängige Ubiquitinierung von p53 oder eines artifiziellen Substrats (GST-E6-E7) ist (Huibregtse et al., 1993b). Bei der Zugabe von E6 konnte eine Verstärkung der E6-APΔE6- sowie E6-APΔC170-Ubiquitinierung festgestellt werden. Auffallend war im Gegensatz zu RCC1b eine Blockierung der Ubiquitinierung

durch E6 bei den Mutanten E6-AP(C:A) und E6-AP Δ C84. Da sich diese beiden Mutanten selbst nicht mehr ubiquitinieren können, müssen sie von einem anderen aktiven E6-AP-Molekül, also intermolekular, ubiquitiniert werden. Eine Blockierung der Ubiquitinierung durch E6 bei diesen Mutanten weist daraufhin, dass die E6-abhängige Ubiquitinierung intramolekular abläuft (Abb. 39). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist der Befund, dass eine im Baculovirussystem exprimierte E6-AP Δ E6-Mutante, als Ligase keinen veränderten Einfluss auf die Ubiquitinierung hatte (Abb. 26C). Dies zeigt, dass E6 bevorzugt an das Substrat-E6-AP als an die Ligase bindet, da sonst der inhibierende Effekt durch E6 entfallen würde.

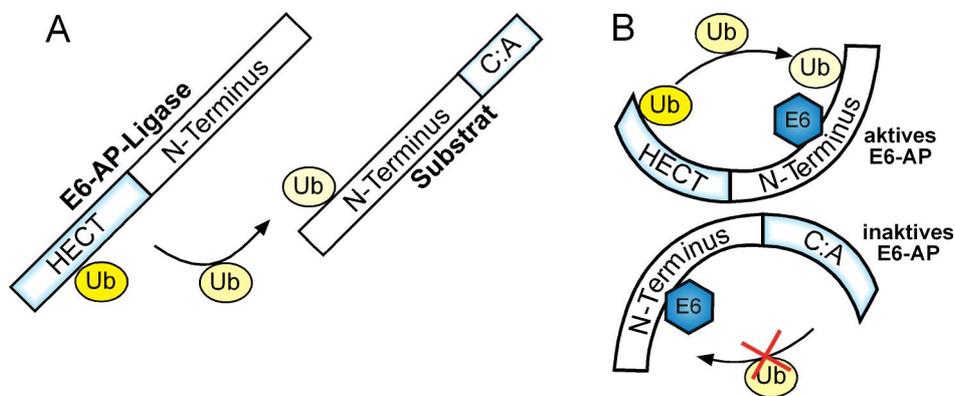


Abb. 39: Hypothetischer Ubiquitinierungsmechanismus der E6-abhängigen Ubiquitinierung

(A) E6-unabhängige Ubiquitinierung der E6-AP(C:A)-Mutante durch Wildtyp-E6-AP. Der Ubiquitinierungsmechanismus verläuft in trans. (B) Die E6-abhängige Ubiquitinierung verläuft bevorzugt nach einem cis-Mechanismus und verhindert die Bindung zweier E6-AP-Moleküle.

Widersprüchlich zu obigem Modell sind die erhaltenen Daten mit den E6-AP-Mutanten Δ E6 und Δ C170 (aktivierender Einfluss). Da E6 an E6-AP Δ E6 nicht binden kann, würde eine gleichbleibende Ubiquitinierung, wie in der Pufferkontrolle, erwartet werden. Eine Verstärkung der Ubiquitinierung kann jedoch nur damit erklärt werden, dass die Ligase aktiviert wird. Dies wäre auch eine Erklärung für den Effekt auf E6-AP Δ C170. Somit scheint E6 verschiedene Mechanismen zur Beeinflussung der Ubiquitinierung zu benutzen, die nicht mit Hilfe eines Modells erklärt werden können. Möglicherweise könnte die Bindung der E2-Enzyme den Mechanismus zusätzlich beeinflussen.

4.4 Herc2 als Substrat

4.4.1 Herc2 ist ein Ubiquitinierungssubstrat von E6-AP *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Herc2(2918-3606) und Herc2(2960-4836) *in vitro* in Anwesenheit von E6-AP verstärkt ubiquitiniert werden (Abb. 28). Auch die katalytisch inaktive Herc2-Mutante stellte *in vitro* ein Substrat von E6-AP dar (Abb. 28C). Aus dem letzten Befund wird ersichtlich, dass E6-AP nicht etwa die Autoubiquitinierung von Herc2 verstärkt, so dass Herc2 *in vitro* ein tatsächliches Substrat für E6-AP darstellt.

Auffallend war, dass nur ein geringer Prozentsatz der eingesetzten Herc2-Deletionsmutanten ubiquitiniert wurde. Auch hier könnten posttranslationale Modifikationen bei der Erkennung eine Rolle spielen (vgl. 4.2.1). Es ist vorstellbar, dass nur ein Teil von Herc2 im Retikulozytenlysat mit einer Modifikation versehen wird und somit von E6-AP als Substrat erkannt werden kann. Umgekehrt fehlen möglicherweise Modifikationen auf E6-AP, die zur Substraterkennung beitragen würden. Dabei könnte es sich z. B. um die putativen Phosphorylierungsstellen im Bindebereich von E6-AP handeln (vgl. 4.1.1). Welche physiologischen Konsequenzen die E6-AP-vermittelte Ubiquitinierung von Herc2 haben könnte wird unter 4.6.2 diskutiert.

4.4.2 Herc2 ist ein Ubiquitinierungssubstrat *in vivo*

Eine Ubiquitinierung von Herc2(2918-3606) und Herc2(2960-4836) in Zellen konnte nur bei einer Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen beobachtet werden (Abb. 29), da wahrscheinlich unter nativen Bedingungen ubiquitinspezifische Peptidasen das Ubiquitin von Herc2 abspalten (vgl. 1.4). Allerdings wurde auch in Abwesenheit von E6-AP eine Ubiquitinierung von Herc2(2918-3606) beobachtet, wenn auch etwas weniger effizient. Somit scheint Herc2(2918-3606) *in vivo* auch von anderen Ligasen als Substrat erkannt zu werden oder endogenes Herc2 erkennt überexprimiertes Herc2(2918-3606) als Substrat.

Für Herc2(2960-4836) konnte keine zu Herc2(2918-3606) vergleichbare Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Abb. 29C). Dies ist zum Einen mit einer geringeren Ausgangsexpression zu erklären, zum Anderen ist auch schon die Monoubiquitinierungsbande schwächer, so dass die Detektion der schwächeren Polyubiquitinbanden nicht zu erwarten ist. Die starken Monoubiquitinierungsbanden sind

wahrscheinlich auf die Verwendung des His₆-„getaggt“ Ubiquitins zurückzuführen, da His₆-„getaggt“ Ubiquitin auch *in vitro* keine effizienten Ketten bildet (Beobachtung AG Scheffner). Da aber unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden musste, war es nicht möglich andere „tags“ auszutesten.

Auffallend war, dass die Ubiquitinierungsbande bei hoher Überexpression von E6-AP verschwindet. Dies mag auf Ubiquitinierung mit anschließendem sehr schnellem Abbau hindeuten. Levy et al. konnten einen ähnlichen Effekt beobachten (Levy et al., 2005). Diese Gruppe zeigte, dass ihr untersuchtes Substrat (Melan A) mit den HECT-Ligasen Itch und Nedd4 interagiert. Bei Überexpression von Nedd4 wurde eine Polyubiquitinierung von Melan A beobachtet. Bei Überexpression von Itch konnten keine Ubiquitinierungsbanden festgestellt werden, aber die unmodifizierte Form konnte auch nicht mehr nachgewiesen werden (Levy et al., 2005). Dies zeigt, dass es auch andere Ligasen gibt, deren Aktivität zu einem schnellen Abbau führen.

Zusammenfassend weisen die Daten daraufhin, dass Herc2(2918-3606) und Herc2(2960-4836) *in vivo* Substrate des Ubiquitinsystems sind, E6-AP aber zumindest nicht die einzige Ligase für Herc2 darstellt. Es ist denkbar, dass die von E6-AP vermittelte Ubiquitinierung zu einem schnellen Abbau führt und deshalb nicht nachgewiesen werden kann. Dies würde die reduzierte Menge an Herc2(2960-4836) bei Zugabe von E6-AP erklären (Abb. 29C und D), während die Modifikationen durch andere Ligasen nicht zum (oder nicht zu einem schnellen) Abbau führen würden.

Daraus ergibt sich aber die Frage, wieso nur bei Herc2(2960-4836) nicht aber bei Herc2(2918-3606) ein Abbau zu sehen ist. Dies mag darauf hindeuten, dass die Lysine, die zu einem effizienten Abbau markiert werden müssen, auf Herc2(2918-3606) fehlen.

Leider ergeben *in vivo* Ubiquitinierungsassays ohne Überexpression des Substrats generell keine befriedigenden Ergebnisse, da von den endogenen Proteinen nur ein sehr geringer Prozentsatz ubiquitiniert vorliegt, fallen solche Analysen unter die Nachweisgrenze unseres Systems. Somit war es nicht möglich, diese Versuche mit endogenem Herc2 durchzuführen.

4.4.3 Herc2 wird in Anwesenheit von E6-AP abgebaut

4.4.3.1 Stabilität von Herc2

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Herc2(2960-4836), aber nicht Herc2(2918-3606) konzentrationsabhängig von aktivem E6-AP abgebaut wird (Abb. 30).

Eine Stabilisierung mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 konnte nicht beobachtet werden. Dass die proteasomale Inhibition prinzipiell funktionierte, wurde am Beispiel von p53 belegt (Abb. 31B). Möglicherweise war diese zur Hemmung des Abbaus von Herc2 nicht vollständig genug. Eine andere Möglichkeit könnte die Kinetik sein: der Abbau wird 24 h nach der Transfektion beobachtet, der proteasomale Inhibitor kann jedoch nur für wenige Stunden inkubiert werden, da die Zellen nach längerer Inkubation sterben. Dieser Zeitraum reicht möglicherweise nicht aus, um eine Stabilisierung festzustellen.

Da eine Stabilisierung mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 nicht beobachtet werden konnte, könnte man auch vermuten, dass der Abbau nicht über das Proteasom verläuft. Es wäre auch eine Markierung für den lysosomalen Abbauweg möglich. Allerdings wird häufig auch bei lysosomal abgebauten Proteinen eine leichte Stabilisierung durch MG132 festgestellt (Mansouri et al., 2003). MG132 ist ein Peptid-Aldehyd und kann ebenfalls Calpaine (ubiquitär exprimierte Cystein-Proteasen) und verschiedene lysosomale Cystein-Proteasen, wie z. B. Cathepsine hemmen (Lee und Goldberg, 1998).

Bei Überexpression von E6-AP konnte ein sehr starker Effekt auf Herc2(2960-4836) erzielt werden (Abb. 30). Dieser konnte jedoch nicht bei endogenem Herc2 beobachtet werden, was damit erklärt werden könnte, dass das kürzere Herc2 ein besseres Substrat, womöglich auch artefizieller Natur darstellt. Dies schließt aber nicht aus, dass endogenes Herc2 ein proteolytisches Substrat für E6-AP darstellt. Zum Beispiel mag der Effekt von E6-AP auf die Halbwertszeit von Herc2 relativ gering sein. Ein Langzeitexperiment mit überexprimiertem E6-AP ist aber nicht möglich, da es nach kurzer Zeit von den Zellen nicht mehr überexprimiert wird. Es wird vermutet, dass eine Überexpression toxisch für die Zelle ist (unveröffentlichte Daten). Es ist auch möglich, dass nur ein geringer Prozentsatz des endogenen Herc2s, also eine Subpopulation, ein Substrat für E6-AP darstellt. Dabei könnte eine unterschiedliche Lokalisation der Proteine eine Rolle spielen. Daten zu dieser Annahme werden unter 4.4.3.2 erläutert.

Für beide Möglichkeiten spricht der Befund, dass in E6-AP-„knock out“-Zellen eine leichte Stabilisierung (20 %) von endogenem Herc2 gezeigt wird (Abb. 30D).

Weiterhin würden diese Annahmen erklären, warum es sich bei Herc2 eigentlich um ein langlebiges Protein handelt (Abb. 32). In einer Cycloheximid-Kinetik (Abb. 32) zeigte sich, dass Herc2 ein relativ stabiles Protein mit einer Halbwertszeit von über 12 h ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Herc2 von einer kurzlebigen Protease oder Ligase reguliert wird. Da diese Proteine wenige Stunden nach Zugabe von Cycloheximid nicht mehr vorlägen, würde Herc2 als langlebig erscheinen, obwohl es in der Zelle normalerweise einem raschen Abbau unterliegt. Wenn dies der Fall ist, handelt es sich bei der Ligase nicht um E6-AP, da dieses ebenfalls zu den langlebigen Proteinen zählt. Es könnte aber ein kurzlebiges E6-AP aktivierendes Protein existieren. Nach dessen Abbau wäre E6-AP konstitutiv inaktiv und könnte kein Herc2 mehr abbauen.

Um diese Punkte zu untersuchen, müßte die Halbwertszeit von Herc2 in einem sogenannten „pulse-chase-assay“ verfolgt werden. Dabei werden Proteine durch Zugabe radioaktiver Aminosäuren markiert („pulse“) und anschließend wieder mit unmarkierten Aminosäuren inkubiert („chase“). In solch einem Experiment hätte zur Detektion von Herc2 eine Immunpräzipitation erfolgen müssen, welche jedoch mit den vorhandenen Herc2-Antikörpern nicht quantitativ durchführbar war.

In Übereinstimmung mit dem Befund, dass Herc2 ein langlebiges Protein ist, war es ebenfalls nicht möglich die Stabilität von endogenem Herc2 durch die Zugabe des proteasomalen Inhibitors MG132 oder des lysosomalen Inhibitors E64d zu erhöhen (Abb. 32).

Zusammengefasst läßt sich feststellen, dass E6-AP vermutlich nur einen gewissen Prozentsatz von Herc2 bindet und zum Abbau führt. Dies steht mit der relativ geringen Stabilitätserhöhung von Herc2 in E6-AP-„knock down“-Zellen in Einklang.

4.4.3.2 Herc2 ist an Membranen lokalisiert

Die Lokalisation von Herc2 in der Zelle wurde einerseits durch Immunfluoreszenzmikroskopie und andererseits durch subzelluläre Fraktionierungen untersucht (Abb. 33). Die Fraktionierung zeigte, dass Herc2 hauptsächlich in der Kern- und in der Membranfraktion vorliegt. Es wurde nicht im cytosolischen Überstand nachgewiesen. Dies schließt aber die cytosolische Lokalisation von Herc2 nicht vollständig aus. Eine weitere Fraktionierung des Zellkerns ergab, dass Herc2 nicht zu den löslichen Kernproteinen gehört, sondern membranassoziiert oder an das Chromatin gebunden vorliegt. In den Immunfluoreszenzaufnahmen hingegen ist Herc2 hauptsächlich

im Cytoplasma und nicht im Zellkern sichtbar. Daraus lässt sich schließen, dass das bei der Fraktionierung im Kernpellet gefundene Herc2 vermutlich nicht mit dem Chromatin assoziiert ist, sondern an der Kernmembran vorliegt. Eine Anreicherung von Herc2 um den Zellkern, ist auch in den Immunfluoreszenzbildern zu erkennen.

Die Interpretation aus beiden Experimenten würde einer Lokalisation an Membranen, wie dem endoplasmatischen Retikulum, sowie den inneren und äußeren Kernmembranen entsprechen. Ein Hydropathie-Plot von Herc2 zeigt keine eindeutigen Transmembranbereiche. Vermutlich handelt es sich bei Herc2 also um ein membranassoziertes Protein. Im Einklang damit ergab eine Fraktionierung, welche mit überexprimiertem Herc2(2960-4836) durchgeführt wurde, eine Anreicherung im Cytosol. Wurde Herc2(2960-4836) dagegen nur leicht überexprimiert, konnte es nicht mehr im Cytosol nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf die Existenz eines membrangebundenen Bindungspartner hindeuten. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich nicht um E6-AP, da dieses hauptsächlich nach einer Fraktionierung im Cytosol lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt).

Da sich der vorhandene E6-AP-Antikörper für Immunfluoreszenzstudien als ungeeignet erwies, war es nicht möglich zu bestimmen, ob endogenes E6-AP und Herc2 in Zellen kolokalisieren.

Eine mögliche Vorstellung ist, dass Herc2 und E6-AP ausschließlich im Cytosol der Zelle interagieren. Dies würde auch erklären, weshalb überexprimiertes Herc2(2960-4836), welches nach Fraktionierungsexperimenten zu einem größeren Anteil als endogenes Herc2 im Cytosol vorliegt, zu einem beträchtlich höheren Prozentsatz abgebaut wird. In diesem Fall kann postuliert werden, dass die membranabhängigen Funktionen von Herc2 nicht unter der Kontrolle von E6-AP stehen, wohingegen die Funktionen von Herc2 im Cytosol über E6-AP reguliert werden.

4.5 Weitere Bindungspartner von Herc2

4.5.1 Transkriptionsterminationsfaktor Rho aus *E. coli*

Während der Aufreinigung der RCC1b-Domäne als GST-Fusion aus *E. coli*, wurde der Transkriptionsterminationsfaktor Rho aus *E. coli* (Richardson, 2002) kopurifiziert und konnte mit Hochsalz-Waschschritten eluiert werden (Abb. 36). Es ist bekannt, dass die Überexpression von GST-Fusionsproteinen zu einer Kopurifikation von endogenen, bakteriellen Proteinen führen kann. Jedoch handelt es sich in den beschriebenen Fällen fast ausschließlich um Chaperone, wie z. B. GroEL (Rohman und Harrison-Lavoie, 2000). Über den Faktor Rho ist dergleichen nicht bekannt. In einem GST-Bindeassay konnte gezeigt werden, dass ein GST-Fusionsprotein des Transkriptionsterminationsfaktors Rho an *in vitro* translatiertes Herc2(2960-4836) binden kann (Daten nicht gezeigt). Dies mag darauf hindeuten, dass die Interaktion zwischen RCC1b und Rho nicht auf konformelle Störungen durch den Einsatz von GST-RCC1b zurückzuführen ist.

Ein Protein mit ähnlichen Funktionen, wie Rho, liegt in Eukaryoten nicht vor. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass Rho aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu Säugerproteinen an GST-RCC1b bindet. Datenbankrecherchen mit der Aminosäuresequenz von Rho aus *E. coli* ergaben Ähnlichkeiten zu Säugerproteinen. So wurde die β -Untereinheit des F1-ATP-Synthase-Komplexes mit 38 % Ähnlichkeit als stärkste Übereinstimmung gefunden. Der übereinstimmende Bereich entspricht der ATP-Bindungsstelle auf beiden Proteinen. So wäre es möglich, dass RCC1b ATP-Bindeproteine binden kann. Eine andere Spekulation könnte sich auf die Rolle von RCC1-Proteinen als möglicher Guaninaustauschfaktor beziehen. Beim Nukleotidaustausch binden die Austauschfaktoren an Aminosäurereste in der GTPase, die das β -Phosphat koordinieren (Renault et al., 2001). Möglicherweise wird das ATP in Rho über ähnliche Reste koordiniert und ermöglicht so eine Bindung zwischen Rho und RCC1b.

Der N-terminale Bereich von Rho umfasst eine sogenannte „cold shock“-Domäne über die Rho an die RNA bindet. Die „cold shock“-Domäne ist vom Bakterium zum Menschen stark konserviert (Weber et al., 2002; Wolffe et al., 1992). Zur Superfamilie der „cold shock“-Proteine gehören in Eukaryoten die Y-Box-Proteine. Diese haben vielfältige Funktionen beispielsweise in der Regulation von Transkription und Translation oder in der DNA-Reparatur (Kohno et al., 2003; Wilkinson und Shyu, 2001). Das Y-Box-Protein

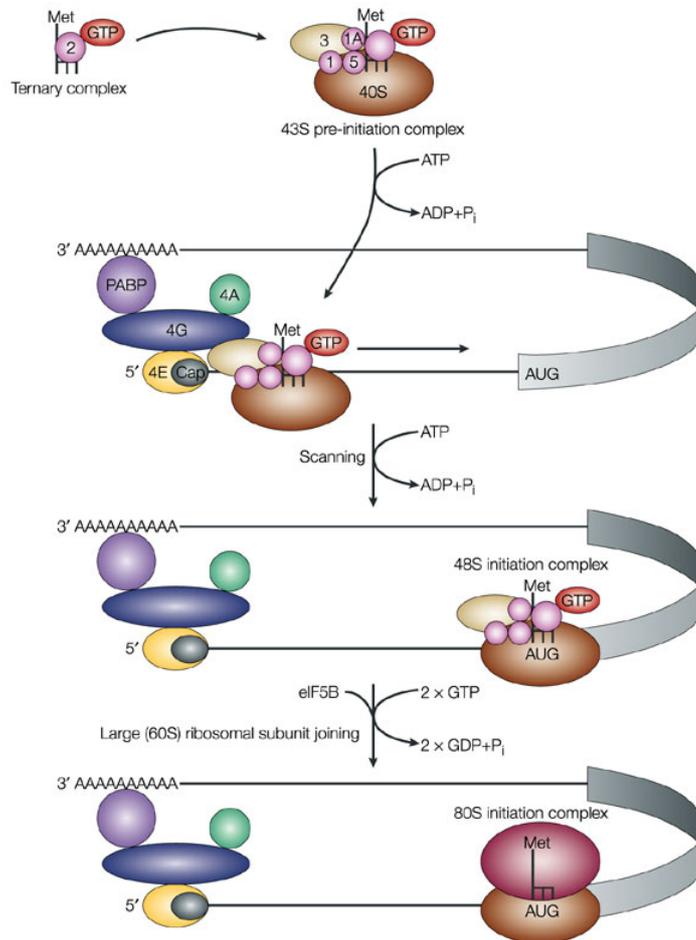
YB-1 reguliert u. a. die Translationsinitiation (Nekrasov et al., 2003; Pisarev et al., 2002; Skabkina et al., 2005). Da Herc2 auch eine Rolle in der Translationsinitiation spielen könnte (vgl. 4.5.2), wäre es möglich, dass Rho aufgrund seiner „cold shock“-Domäne an RCC1b bindet.

4.5.2 Bindung von Herc2 an Komponenten des Translationsinitiationskomplexes

Die im GST-Bindeassay (Abb. 35) isolierten potentiellen Bindungspartner der RCC1b-Domäne gehören alle dem Translationsinitiationskomplex an oder sind als mit diesem assoziiert beschrieben worden.

Im Folgenden wird zunächst die Translationsinitiation bei Eukaryoten kurz beschrieben, wobei im Besonderen auf die identifizierten Komponenten eingegangen wird (Übersicht: Gebauer und Hentze, 2004; Kapp und Lorsch, 2004; Pestova et al., 2001). Der erste Schritt der Translationsinitiation besteht aus der Bildung eines ternären Komplexes bestehend aus der Methionyl-Initiator-t-RNA (Met-t-RNA), eIF-2 (eukaryotic initiation factor 2) und GTP (vgl. Abb. 40). Der ternäre Komplex bindet an die kleine Untereinheit des Ribosoms (40S), was durch die Faktoren eIF-1, 1A, 3 und 5 unterstützt wird. Dieser Komplex wird auch als 43S Komplex bezeichnet. Ein weiterer Komplex, eIF-4F, bestehend aus den Untereinheiten eIF-4A, E, G, bindet an die 5'-Cap-Struktur der mRNA. Er entwindet etwaige Sekundärstrukturen der 5'UTR. Der 43S-Komplex bindet dann die mRNA durch die Bindung von eIF-3 an eIF-4G. Weiterhin interagiert eIF-4G mit dem Poly(A)-Bindepotein (PABP). Durch diese Interaktion wird die mRNA zirkuliert und bringt die 3'UTR in räumliche Nähe zum 5'Ende der mRNA. Nun beginnt der 43S-Komplex in 5'->3'-Richtung die mRNA nach dem Startkodon abzusuchen. Am geeigneten AUG-Kodon kommt es zur Kodon-Antikodon-Basenpaarung zwischen Startkodon und der im ternären Komplex gebundenen Met-t-RNA. Dies löst die GTP-Hydrolyse an eIF-2 aus, welches durch das GTPase aktivierende Protein eIF-5 gefördert wird. eIF-2-GDP entläßt dadurch die Initiator-t-RNA in die P-Bindestelle des Ribosoms und dissoziiert, ebenso wie auch die Faktoren 1, 1A, 3 und 5 vom Komplex. Währenddessen bindet GTP-eIF-5B und die große Untereinheit des Ribosoms (60S) gliedert sich an den 40S, Met-t-RNA, mRNA-Komplex an. Dies führt zur GTP-Hydrolyse von eIF-5B und zu dessen Dissoziation vom Ribosom.

Die Translationsinitiation ist mit Entstehung des zusammengesetzten 80S Ribosoms, welches dann die Methionyl-Initiator-t-RNA in seiner P-Bindestelle gebunden hat und sich am Initiationskodon auf der mRNA befindet, abgeschlossen.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. 40: Schematische Darstellung der Translationsinitiation

(entnommen aus Gebauer und Hentze, 2004). Die einzelnen Schritte der Translationsinitiation sind im Text erläutert.

Als putative Bindungspartner von GST-RCC1b wurden die Untereinheiten eIF-2 α und eIF-2 γ des heterotrimeren G-Proteins eIF-2 identifiziert. Die γ -Untereinheit bindet sowohl die Met-t-RNA als auch GTP (Erickson und Hannig, 1996; Naranda et al., 1995). Die β -Untereinheit von eIF-2 konnte zwar nicht nachgewiesen werden, dafür aber die ϵ -Untereinheit von eIF-2B, welche an die β -Untereinheit von eIF-2 bindet. eIF-2B ist der Guaninaustauschfaktor für den eIF-2-Komplex und besteht aus insgesamt 5

Untereinheiten (α - ϵ). Wird die eIF-2 α -Untereinheit phosphoryliert, verhindert das den GTP-Austausch durch eIF-2B, welches zu einer Inhibition der Translation führt (Hershey, 1991). Das ebenfalls identifizierte p67 bindet an diese Phosphorylierungsstelle und verhindert damit die Phosphorylierung der α -Untereinheit (Gupta et al., 1997). Das auch durch Massenspektrometrie nachgewiesene ABC50 wurde ursprünglich als Protein unbekannter Funktion entdeckt, welches in Tumornekrosefaktor α -stimulierten Synoviozyten induziert wird (Richard et al., 1998). Es ist das erste in Säugern identifizierte ABC-Protein ohne Transmembrandomäne. Später konnte gezeigt werden, dass ABC50 mit dem eIF-2-Komplex kopurifiziert und die gereinigten Komponenten in der Immunpräzipitation interagieren (Tyzack et al., 2000). ABC50 scheint die Interaktion der Met-t-RNA mit eIF-2 zu verstärken (Tyzack et al., 2000). So stehen alle Bindeproteine von GST-RCC1b mit Ausnahme des Poly(A)-Bindeproteins (PABP) in direktem Zusammenhang mit dem eIF-2-Komplex. PABP bindet allerdings an eIF-4G, welches sowohl eIF-5 und eIF-3 bindet. Beide Komplexe interagieren dagegen wiederum mit eIF-2.

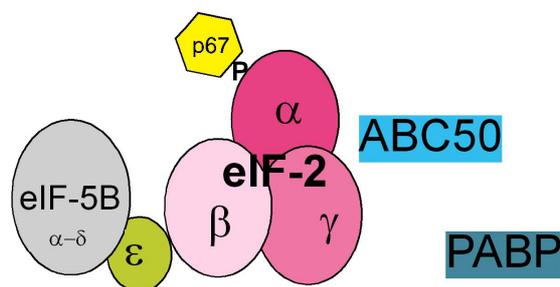


Abb. 41: Darstellung der im Pulldown mit GST-RCC1b identifizierten Komponenten

Vom trimären eIF-2-Komplex konnten die α - und γ -Untereinheit nachgewiesen werden, die β -Untereinheit jedoch nicht. Es wurde aber die an die β -Untereinheit bindende ϵ -Untereinheit von eIF-5B nachgewiesen. Ein an die α -Untereinheit bindendes, nachgewiesenes Protein ist das p67. ABC50 wurde zum eIF-2-Komplex assoziiert gefunden, welches seine direkten Bindungspartner darstellen ist unklar. PABP steht nach bisherigen Daten nur über eIF-4G und eIF-3 mit eIF-2 in Verbindung.

Es ist denkbar, dass auch eIF-3- oder eIF-4-Komponenten im GST-Bindeassay mit RCC1b zu finden sind. Aus technischen Gründen wurden nur Banden aus dem Gel ausgeschnitten, die eindeutig nicht in den Kontrollen zu sehen waren, überlagerte sich die Laufhöhe der Proteine im Gel mit anderen kopurifizierenden Proteinen (aus *E. coli* oder Retikulozytenlysate), wurden sie nicht für die massenspektrometrische Analyse berücksichtigt.

Herc2 kann als essentielle Komponente des Translationsinitiationskomplexes ausgeschlossen werden, da die Translationsinitiation aus gereinigten Komponenten *in vitro* rekonstituiert werden kann (Pestova et al., 1998; Pestova et al., 2001). Obwohl aber schon seit Jahrzehnten Komponenten des Translationskomplexes isoliert und untersucht werden, ist am Beispiel von ABC50 ersichtlich, dass es möglicherweise weitere mit dem Translationsinitiationskomplex assoziierte Proteine gibt, die noch nicht identifiziert sind. Im Falle von ABC50 spekulieren die Autoren, dass die Abwesenheit eines bestimmten Proteinaseinhibitors oder andere Aufreinigungsmethoden wahrscheinlich dazu führten, dass das ABC50 nicht bereits zuvor isoliert wurde (Tyzack et al., 2000). So ist es auch möglich, dass Herc2, welches in Zelllysaten relativ schnell degradiert und eher unlöslich ist, durch die mehrschrittigen Säulenaufreinigungen, während einer eIF-2-Aufreinigung, nicht mehr nachweisbar ist bzw. aufgrund seiner Unlöslichkeit nicht isoliert wurde.

Rein spekulativ ist für Herc2 eine Rolle in der Translationsinitiation denkbar. So ist z. B. für p67 beschrieben, dass es unter bestimmten physiologischen Bedingungen, wie Nahrungsmangel oder virale Infektion, sehr schnell abgebaut wird (Ray et al., 1992). Der Abbau wird durch zwei unabhängige Mechanismen reguliert. Auf der einen Seite wird p67 auf der mRNA-Ebene reguliert, auf der anderen Seite erfolgt die Inaktivierung durch Deglykosylierung (p67 ist ein Glykoprotein). Denkbar wäre auch ein dritter Mechanismus: Inaktivierung oder Abbau durch Ubiquitinierung durch die Herc2-Ligase. In diesem Modell wäre p67 der direkte Bindungspartner von Herc2 und die restlichen Translationsinitiationskomponenten würden durch ihre Bindung an p67 mitpräzipitiert. Möglich wäre auch, dass ribosomale Proteine Substrate für Herc2 darstellen. Das ribosomale Protein L28, eine Komponente der großen ribosomalen Untereinheit, wird beispielsweise zellzyklusabhängig durch eine K63-verknüpfte Ubiquitinkette modifiziert (Spence et al., 2000).

Ein funktioneller Assay aus dem der Einfluss von Herc2 auf die Translation ersichtlich werden sollte, bei dem aus dem Baculovirussystem gereinigtes His₆-Herc2(2960-4836) oder aus *E. coli* gereinigtes GST-RCC1b zur *in vitro* Translation titriert wurde, konnte aufgrund von pH- und Salzkonzentrations-Empfindlichkeit des Systems nicht etabliert werden. Somit blieb eine funktionelle Relevanz der Bindung zwischen Herc2 und Komponenten des Translationsinitiationskomplexes unklar.

4.5.3 Bindung von Herc2 an eIF-2 γ

Da Herc2 über seine RCC1b-Domäne mit dem eIF-2-Komplex interagiert, ist es auch denkbar, dass Herc2 als ein Guaninaustauschfaktor (GEF) oder Guanin-Release-Faktor (GRF) fungiert. Ausgehend von den Daten, dass GTPasen mit GEFs und GRFs interagieren können und für das G-Protein eIF-2, eIF-2B als Austauschfaktor beschrieben ist, könnte RCC1b die Rolle eines zusätzlichen GRFs übernehmen oder einen alternativen Austauschfaktor darstellen. Aus diesen Überlegungen heraus wurde die γ -Untereinheit näher auf eine eventuelle Bindung untersucht.

Tatsächlich konnte in *in vitro* GST-Bindeassays eine Bindung an eIF-2 γ sowohl von RCC1b als auch von längeren Herc2-Fragmenten in beide Richtungen nachgewiesen werden (Abb. 37A). Da diese Versuche mit in Retikulozytenlysat translatierten Proteinen durchgeführt wurden, konnte aber keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um eine direkte Bindung oder um eine durch andere im Retikulozytenlysat anwesende Proteine vermittelte Bindung handelt.

In vivo konnte eine Interaktion in der Koimmunpräzipitation zwischen eIF-2 γ und Herc2(2918-3606) gezeigt werden (Abb. 37B und C). Ein Nachweis, dass auch Herc2(2960-4836) in der Zelle an eIF-2 γ bindet, gelang nicht (Abb. 37B und C). Dies könnte einmal darauf zurückzuführen sein, dass Herc2(2960-4836) in Zellen nicht so stark überexprimiert wird, wie Herc2(2918-3606), und wenn nur eine Subpopulation von Herc2 binden würde, wären die Mengen möglicherweise für einen Nachweis zu gering. Eine andere Erklärung könnte sein, dass Herc2(2960-4836) eIF-2 γ in der Zelle abbaut und deshalb keine Bindung nachweisbar war. Auch kann eine Behinderung der Bindung durch das Verwenden von zwei „getaggt“ Proteinen nicht ausgeschlossen werden.

Vorversuche zeigten, dass die Autoubiquitinierung von Herc2(2960-4836) schwach durch die Zugabe von GST-eIF-2 γ gehemmt wurde (Daten nicht gezeigt). Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass eIF-2 γ zumindest *in vitro* ein Substrat von Herc2 darstellt, da angenommen wird, dass eine Ligase sich nur autoubiquitiniert, wenn sie nicht an ein Substrat gebunden ist (Nuber et al., 1998). Jedoch müssen zur Verifizierung solcher Aussagen weitere Kontrollversuche durchgeführt werden.

4.6 Physiologische Rolle von Herc2

4.6.1 Herc2 ist nicht essentiell für die Zelle

Mittels RNAi konnte ein „knock down“ von Herc2 auf Proteinebene von ca. 80 % erzielt werden (Abb. 27). Jedoch fiel bei dem korrelierenden E6-AP-Westernblot auf, dass eine der verwendeten siRNA-Sequenzen zu einem verringerten Proteinlevel von E6-AP führt. Es besteht die Möglichkeit, dass Herc2 einen Effekt auf die Expression von E6-AP haben könnte. Dieser Möglichkeit stehen jedoch die Ergebnisse mit den beiden anderen siRNAs gegenüber, bei denen kein Einfluss auf E6-AP beobachtet wurde. Somit scheint die eine Sequenz (siRNA H2-11) einen sogenannten „off target“-Effekt zu haben. „Off target“-Effekte können z. B. durch die Ähnlichkeit des „sense“-Stranges der siRNA zu anderen Genen oder auch andere Mechanismen, wie z. B. Mikro-RNA ausgelöst werden (Doench et al., 2003; Jackson et al., 2003; Lin et al., 2005). In einer Datenbanksuche konnten keine bekannten Transkripte gefunden werden, die eine Übereinstimmung mit der Sequenz aufweisen. Untersuchungen von Jackson et al. weisen daraufhin, dass „off target“-Effekte keine Seltenheit sind und nur in den meisten Fällen nicht entdeckt werden, da meist nur wenige Transkripte im Rahmen des jeweiligen Experiments untersucht werden (Jackson et al., 2003). In deren Studien wurden u. a. acht verschiedene siRNAs, welche gegen das selbe Transkript gerichtet waren, getestet und acht verschiedene Expressionsprofile erhalten (Jackson et al., 2003), was zeigt, dass jeder dieser siRNAs die Genexpression anders beeinflusst.

Das Einbringen der siRNA gegen Herc2 in verschiedene Zelllinien führte zwar zu einem effizienten „knock down“, zeigte aber keinen weiteren detektierbaren Effekt, wie z. B. auf die Morphologie der Zellen. Auch ein Doppel-„knock down“ von Herc2 und E6-AP führte zu keinem auffallenden Phänotyp in den untersuchten Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Zwar war ein „knock down“ von Herc2 für über 100 h stabil, möglicherweise ist aber dieser Zeitraum zu kurz, um einen Effekt von Herc2 zu beobachten. Außerdem war der „knock down“ nicht vollständig, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass nicht 100 % der Zellen transfiziert wurden. Um den Einfluss von Herc2 mittels Zellkultur abschließend zu untersuchen, sollte die vektorbasierende RNAi angewendet und nach Transfektion und Selektion gegen die Antibiotikaresistenz des Vektors einzelne Klone daraufhin getestet werden, wie gut die „knock down“-Effizienz ist. Vielleicht würde ein kompletter „knock down“ einen Phänotyp aufweisen.

4.6.2 Phänotyp der Herc2- und E6-AP-Maus-Mutanten

Für Herc2 existieren keine transgenen „knock out“-Mäuse, aber anhand von Komplementationstudien und N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-Mutagenese gibt es Hinweise, dass Mutationen im Herc2-Gen der Maus zu einem pleiotropen Phänotyp (*rjs*) führen (Lehman et al., 1998). Auch wenn es relativ gesichert erscheint, dass der Phänotyp der *rjs*-Mäuse durch Mutationen im Herc2-Gen bedingt ist, kann nur eine Generierung einer „knock out“-Maus dies letztendlich belegen.

Die *rjs*-Mäuse sind kleinwüchsig, haben einen ruckartigen, nervösen Gang und zittern, die männlichen Mäuse sind unfruchtbar und die Weibchen sind semisteril (Lyon et al., 1992; Rinchik et al., 1995). Der verschiedenartige Phänotyp läßt darauf schließen, dass mehrere Stoffwechselwege durch die Funktionen von Herc2 beeinflusst werden oder dass Herc2 an einer Verknüpfungsstelle verschiedener Stoffwechselwege sitzt (Lehman et al., 1998). Diese Annahmen werden durch die Betrachtung des Herc2-Proteins unterstützt. Denn bei einem so großen Protein, welches alleine über acht bekannte Proteindomänen verfügt, ist anzunehmen, dass verschiedene Bereiche auf dem Protein mit unterschiedlichen Aufgaben belegt sind und in einem Protein vereinigt und koordiniert werden.

Worauf die neuromuskulären Defekte der Mäuse zurückzuführen sind, ist unklar, aber die verringerte Fertilität der Weibchen hängt mit ungereiften Eierstöcken und die männliche Unfruchtbarkeit mit Defekten in der Spermatogenese zusammen, was auf einen endokrinologischen Defekt oder eine Hypophysenfunktionsstörung hindeuten könnte (Melvold, 1974).

Interessanterweise interagiert E6-AP mit dem Testis-spezifischen Protein VCY2, dessen Funktion bisher weitestgehend unbekannt ist (Wong et al., 2002). Bekannt ist, dass das VCY2-Gen häufig bei infertilen Männern deletiert ist (Wong et al., 2002). Da Herc2-Maus-Mutanten Defekte in der Spermatogenese aufweisen, wäre eine Überlegung, dass Herc2 mit E6-AP im Komplex mit VCY2 regulatorisch in die Spermatogenese eingreifen. Zudem weisen männliche E6-AP-Nullmäuse (Jiang et al., 1998; Miura et al., 2002) eine verringerte Hodengröße auf und produzieren vermindert funktionelles Sperma (Smith et al., 2002). Somit wäre eine spezialisierte, gemeinsame Funktion von Herc2 und E6-AP im Hoden möglich.

Weiterhin weisen E6-AP-„knock out“-Mäuse (Jiang et al., 1998; Miura et al., 2002), die allgemein den Phänotyp des menschlichen Angelman-Syndroms widerspiegeln, einen Defekt in der hippocampalen LTP (long term potentiation) auf. Ob auch die Herc2-

Maus-Mutanten solche Defekte aufweisen, wurde bisher nicht untersucht. Aufgrund des Phänotyps der Herc2-Maus-Mutanten und der Ähnlichkeit zu dem Herc1-Protein wird in der Literatur eine Rolle von Herc2 im Vesikeltransport postuliert (Ji et al., 1999; Lehman et al., 1998). Dies und die Tatsache, dass Herc2 auch im Gehirn exprimiert wird, könnten als erste Hinweise gedeutet werden, dass Herc2 und E6-AP auch eine gemeinsame Rolle in der LTP spielen. Möglicherweise würden Defekte der E3-Ligase-Aktivität von E6-AP zu einer Anreicherung von Herc2 in bestimmten Gehirnregionen führen. In diesem Szenario würde Herc2 dann wichtige Faktoren für die LTP abbauen oder negativ regulieren. Eine Anreicherung von bisher nicht identifizierten Substraten von E6-AP ist als eine mögliche Ursache des Angelman-Syndroms beschrieben worden (Rougeulle et al., 1997). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Herc2 in E6-AP-„knock down“-Zellen angereichert wird, wäre es interessant zu untersuchen, ob Angelman-Patienten ebenfalls eine Herc2-Anreicherung im Gehirn aufweisen.

5 Literaturverzeichnis

- Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., Kogel, U., Scheffner, M., Helin, K. und Eilers, M. (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell*, **123**, 409-421.
- Albrecht, U., Sutcliffe, J.S., Cattanach, B.M., Beechey, C.V., Armstrong, D., Eichele, G. und Beaudet, A.L. (1997) Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet*, **17**, 75-78.
- Amerik, A.Y. und Hochstrasser, M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 189-207.
- Amos-Landgraf, J.M., Ji, Y., Gottlieb, W., Depinet, T., Wandstrat, A.E., Cassidy, S.B., Driscoll, D.J., Rogan, P.K., Schwartz, S. und Nicholls, R.D. (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet*, **65**, 370-386.
- Aravind, L. (2001) The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem Sci*, **26**, 273-275.
- Arnason, T. und Ellison, M.J. (1994) Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol*, **14**, 7876-7883.
- Au, S.W., Leng, X., Harper, J.W. und Barford, D. (2002) Implications for the ubiquitination reaction of the anaphase-promoting complex from the crystal structure of the Doc1/Apc10 subunit. *J Mol Biol*, **316**, 955-968.
- Baboshina, O.V. und Haas, A.L. (1996) Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem*, **271**, 2823-2831.
- Balakirev, M.Y., Tcherniuk, S.O., Jaquinod, M. und Chroboczek, J. (2003) Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep*, **4**, 517-522.
- Bar-Peled, M. und Raikhel, N.V. (1996) A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to the GST. *Anal Biochem*, **241**, 140-142.
- Bates, E.E., Ravel, O., Dieu, M.C., Ho, S., Guret, C., Bridon, J.M., Ait-Yahia, S., Briere, F., Caux, C., Banchereau, J. und Lebecque, S. (1997) Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells. *Eur J Immunol*, **27**, 2471-2477.
- Beaudenon, S.L., Huacani, M.R., Wang, G., McDonnell, D.P. und Huijbrechtse, J.M. (1999) Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6972-6979.
- Beer-Romero, P., Glass, S. und Rolfe, M. (1997) Antisense targeting of E6AP elevates p53 in HPV-infected cells but not in normal cells. *Oncogene*, **14**, 595-602.
- Bischoff, F.R. und Ponstingl, H. (1991a) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature*, **354**, 80-82.
- Bischoff, F.R. und Ponstingl, H. (1991b) Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10830-10834.

- Blumenfeld, N., Gonen, H., Mayer, A., Smith, C.E., Siegel, N.R., Schwartz, A.L. und Ciechanover, A. (1994) Purification and characterization of a novel species of ubiquitin-carrier protein, E2, that is involved in degradation of non-"N-end rule" protein substrates. *J Biol Chem*, **269**, 9574-9581.
- Borden, K.L. (2000) RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol*, **295**, 1103-1112.
- Borden, K.L. und Freemont, P.S. (1996) The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol*, **6**, 395-401.
- Burnett, B., Li, F. und Pittman, R.N. (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet*, **12**, 3195-3205.
- Carroll, C.W. und Morgan, D.O. (2002) The Doc1 subunit is a processivity factor for the anaphase-promoting complex. *Nat Cell Biol*, **4**, 880-887.
- Cenci, G., Rawson, R.B., Belloni, G., Castrillon, D.H., Tudor, M., Petrucci, R., Goldberg, M.L., Wasserman, S.A. und Gatti, M. (1997) UbcD1, a Drosophila ubiquitin-conjugating enzyme required for proper telomere behavior. *Genes Dev*, **11**, 863-875.
- Ciechanover, A., Orian, A. und Schwartz, A.L. (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, **22**, 442-451.
- Clayton-Smith, J. und Laan, L. (2003) Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet*, **40**, 87-95.
- Cooper, E.M., Hudson, A.W., Amos, J., Wagstaff, J. und Howley, P.M. (2004) Biochemical analysis of Angelman syndrome-associated mutations in the E3 ubiquitin ligase E6-associated protein. *J Biol Chem*, **279**, 41208-41217.
- Cruz, C., Ventura, F., Bartrons, R. und Rosa, J.L. (2001) HERC3 binding to and regulation by ubiquitin. *FEBS Lett*, **488**, 74-80.
- Daniels, P.R., Sanders, C.M. und Maitland, N.J. (1998) Characterization of the interactions of human papillomavirus type 16 E6 with p53 and E6-associated protein in insect and human cells. *J Gen Virol*, **79 (Pt 3)**, 489-499.
- Dastur, A., Beaudenon, S., Kelley, M., Krug, R.M. und Huibregtse, J.M. (2006) Herc5, an Interferon-induced HECT E3 Enzyme, Is Required for Conjugation of ISG15 in Human Cells. *J Biol Chem*, **281**, 4334-4338.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. und Chen, Z.J. (2000) Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, **103**, 351-361.
- Denison, M.S., Harper, P.A. und Okey, A.B. (1986) Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Codistribution of unoccupied receptor with cytosolic marker enzymes during fractionation of mouse liver, rat liver and cultured Hepa-1c1 cells. *Eur J Biochem*, **155**, 223-229.
- Deshaies, R.J. (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-467.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S. und Hay, R.T. (1998) SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell*, **2**, 233-239.
- Dimmeler, S., Breitschopf, K., Haendeler, J. und Zeiher, A.M. (1999) Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med*, **189**, 1815-1822.
- Doench, J.G., Petersen, C.P. und Sharp, P.A. (2003) siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, **17**, 438-442.

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Eletr, Z.M., Huang, D.T., Duda, D.M., Schulman, B.A. und Kuhlman, B. (2005) E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 933-934.
- Erickson, F.L. und Hannig, E.M. (1996) Ligand interactions with eukaryotic translation initiation factor 2: role of the gamma-subunit. *Embo J*, **15**, 6311-6320.
- Fang, P., Lev-Lehman, E., Tsai, T.F., Matsuura, T., Benton, C.S., Sutcliffe, J.S., Christian, S.L., Kubota, T., Halley, D.J., Meijers-Heijboer, H., Langlois, S., Graham, J.M., Jr., Beuten, J., Willems, P.J., Ledbetter, D.H. und Beaudet, A.L. (1999) The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome. *Hum Mol Genet*, **8**, 129-135.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. und Weissman, A.M. (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem*, **275**, 8945-8951.
- Finley, D., Bartel, B. und Varshavsky, A. (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, **338**, 394-401.
- Finley, D., Sadis, S., Monia, B.P., Boucher, P., Ecker, D.J., Crooke, S.T. und Chau, V. (1994) Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol*, **14**, 5501-5509.
- Fisk, H.A. und Yaffe, M.P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **145**, 1199-1208.
- Fotia, A.B., Cook, D.I. und Kumar, S. (2006) The ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2 show similar ubiquitin-conjugating enzyme specificities. *Int J Biochem Cell Biol*, **38**, 472-479.
- Galan, J.M. und Haguenauer-Tsapis, R. (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J*, **16**, 5847-5854.
- Gao, Q., Kumar, A., Singh, L., Huibregtse, J.M., Beaudenon, S., Srinivasan, S., Wazer, D.E., Band, H. und Band, V. (2002) Human papillomavirus E6-induced degradation of E6TP1 is mediated by E6AP ubiquitin ligase. *Cancer Res*, **62**, 3315-3321.
- Gao, Q., Srinivasan, S., Boyer, S.N., Wazer, D.E. und Band, V. (1999) The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol Cell Biol*, **19**, 733-744.
- Garcia-Gonzalo, F.R., Bartrons, R., Ventura, F. und Rosa, J.L. (2005) Requirement of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate for HERC1-mediated guanine nucleotide release from ARF proteins. *FEBS Lett*, **579**, 343-348.
- Garcia-Gonzalo, F.R., Cruz, C., Munoz, P., Mazurek, S., Eigenbrodt, E., Ventura, F., Bartrons, R. und Rosa, J.L. (2003) Interaction between HERC1 and M2-type pyruvate kinase. *FEBS Lett*, **539**, 78-84.
- Garcia-Gonzalo, F.R., Munoz, P., Gonzalez, E., Casaroli-Marano, R.P., Vilaro, S., Bartrons, R., Ventura, F. und Rosa, J.L. (2004) The giant protein HERC1 is recruited to aluminum fluoride-induced actin-rich surface protrusions in HeLa cells. *FEBS Lett*, **559**, 77-83.
- Garcia-Gonzalo, F.R. und Rosa, J.L. (2005) The HERC proteins: functional and evolutionary insights. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 1826-1838.
- Gebauer, F. und Hentze, M.W. (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 827-835.

- Gewin, L., Myers, H., Kiyono, T. und Galloway, D.A. (2004) Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev*, **18**, 2269-2282.
- Giles, R.H., Peters, D.J. und Breuning, M.H. (1998) Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet*, **14**, 178-183.
- Glaunsinger, B.A., Lee, S.S., Thomas, M., Banks, L. und Javier, R. (2000) Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene*, **19**, 5270-5280.
- Glickman, M.H. und Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
- Glotzer, M., Murray, A.W. und Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-138.
- Grenfell, S.J., Trausch-Azar, J.S., Handley-Gearhart, P.M., Ciechanover, A. und Schwartz, A.L. (1994) Nuclear localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, is cell-cycle-dependent. *Biochem J*, **300 (Pt 3)**, 701-708.
- Grossberger, R., Gieffers, C., Zachariae, W., Podtelejnikov, A.V., Schleiffer, A., Nasmyth, K., Mann, M. und Peters, J.M. (1999) Characterization of the DOC1/APC10 subunit of the yeast and the human anaphase-promoting complex. *J Biol Chem*, **274**, 14500-14507.
- Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y. und Livingston, D.M. (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science*, **300**, 342-344.
- Gupta, S., Bose, A., Chatterjee, N., Saha, D., Wu, S. und Gupta, N.K. (1997) p67 transcription regulates translation in serum-starved and mitogen-activated KRC-7 cells. *J Biol Chem*, **272**, 12699-12704.
- Haas, A.L., Ahrens, P., Bright, P.M. und Ankel, H. (1987) Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem*, **262**, 11315-11323.
- Haas, A.L. und Rose, I.A. (1982) The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. *J Biol Chem*, **257**, 10329-10337.
- Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A. und Rose, I.A. (1982) Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem*, **257**, 2543-2548.
- Handley-Gearhart, P.M., Stephen, A.G., Trausch-Azar, J.S., Ciechanover, A. und Schwartz, A.L. (1994) Human ubiquitin-activating enzyme, E1. Indication of potential nuclear and cytoplasmic subpopulations using epitope-tagged cDNA constructs. *J Biol Chem*, **269**, 33171-33178.
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H. und Ohta, T. (2001) The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem*, **276**, 14537-14540.
- Hatakeyama, S., Jensen, J.P. und Weissman, A.M. (1997) Subcellular localization and ubiquitin-conjugating enzyme (E2) interactions of mammalian HECT family ubiquitin protein ligases. *J Biol Chem*, **272**, 15085-15092.
- Hatfield, P.M. und Vierstra, R.D. (1992) Multiple forms of ubiquitin-activating enzyme E1 from wheat. Identification of an essential cysteine by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem*, **267**, 14799-14803.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. und Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**, 296-299.

- Henderson, M.J., Russell, A.J., Hird, S., Munoz, M., Clancy, J.L., Lehrbach, G.M., Calanni, S.T., Jans, D.A., Sutherland, R.L. und Watts, C.K. (2002) EDD, the human hyperplastic discs protein, has a role in progesterone receptor coactivation and potential involvement in DNA damage response. *J Biol Chem*, **277**, 26468-26478.
- Hengstermann, A., D'Silva M, A., Kuballa, P., Butz, K., Hoppe-Seyler, F. und Scheffner, M. (2005) Growth suppression induced by downregulation of E6-AP expression in human papillomavirus-positive cancer cell lines depends on p53. *J Virol*, **79**, 9296-9300.
- Hengstermann, A., Linares, L.K., Ciechanover, A., Whitaker, N.J. und Scheffner, M. (2001) Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1218-1223.
- Hengstermann, A., Whitaker, N.J., Zimmer, D., Zentgraf, H. und Scheffner, M. (1998) Characterization of sequence elements involved in p53 stability regulation reveals cell type dependence for p53 degradation. *Oncogene*, **17**, 2933-2941.
- Hershey, J.W. (1991) Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, **60**, 717-755.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. und Ciechanover, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, **258**, 8206-8214.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 195-201.
- Hicke, L. und Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141-172.
- Hicke, L., Schubert, H.L. und Hill, C.P. (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 610-621.
- Hipp, M.S., Kalveram, B., Raasi, S., Groettrup, M. und Schmidtke, G. (2005) FAT10, a ubiquitin-independent signal for proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*, **25**, 3483-3491.
- Hiyama, H., Yokoi, M., Masutani, C., Sugasawa, K., Maekawa, T., Tanaka, K., Hoeijmakers, J.H. und Hanaoka, F. (1999) Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem*, **274**, 28019-28025.
- Hochrainer, K., Mayer, H., Baranyi, U., Binder, B., Lipp, J. und Kroismayr, R. (2005) The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects. *Genomics*, **85**, 153-164.
- Hodgins, R., Gwozd, C., Arnason, T., Cummings, M. und Ellison, M.J. (1996) The tail of a ubiquitin-conjugating enzyme redirects multi-ubiquitin chain synthesis from the lysine 48-linked configuration to a novel nonlysine-linked form. *J Biol Chem*, **271**, 28766-28771.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135-141.
- Hofmann, K. und Bucher, P. (1996) The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci*, **21**, 172-173.
- Hofmann, R.M. und Pickart, C.M. (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, **96**, 645-653.

- Honda, R. und Yasuda, H. (2000) Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene*, **19**, 1473-1476.
- Honda, Y., Tojo, M., Matsuzaki, K., Anan, T., Matsumoto, M., Ando, M., Saya, H. und Nakao, M. (2002) Cooperation of HECT-domain ubiquitin ligase hHYD and DNA topoisomerase II-binding protein for DNA damage response. *J Biol Chem*, **277**, 3599-3605.
- Hoppe, T. (2005) Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci*, **30**, 183-187.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D. und Jentsch, S. (2000) Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*, **102**, 577-586.
- Hori, T., Osaka, F., Chiba, T., Miyamoto, C., Okabayashi, K., Shimbara, N., Kato, S. und Tanaka, K. (1999) Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene*, **18**, 6829-6834.
- Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M. und Pavletich, N.P. (1999) Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science*, **286**, 1321-1326.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. und Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5249.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M. und Howley, P.M. (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J*, **10**, 4129-4135.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M. und Howley, P.M. (1993a) Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol*, **13**, 775-784.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M. und Howley, P.M. (1993b) Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol*, **13**, 4918-4927.
- Huibregtse, J.M., Yang, J.C. und Beaudenon, S.L. (1997) The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3656-3661.
- Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L.C. und Longnecker, R. (2000) The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology*, **268**, 178-191.
- Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.I. und Takahashi, R. (2002) CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*, **10**, 55-67.
- Ingham, R.J., Gish, G. und Pawson, T. (2004) The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene*, **23**, 1972-1984.
- Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., Weissman, A.M., Lewis, J., Chandrasekharappa, S.C. und Chitnis, A.B. (2003) Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev Cell*, **4**, 67-82.

- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. und Linsley, P.S. (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, **21**, 635-637.
- Jensen, J.P., Bates, P.W., Yang, M., Vierstra, R.D. und Weissman, A.M. (1995) Identification of a family of closely related human ubiquitin conjugating enzymes. *J Biol Chem*, **270**, 30408-30414.
- Jensen, R.B., La Cour, T., Albrethsen, J., Nielsen, M. und Skriver, K. (2001) FYVE zinc-finger proteins in the plant model *Arabidopsis thaliana*: identification of PtdIns3P-binding residues by comparison of classic and variant FYVE domains. *Biochem J*, **359**, 165-173.
- Ji, Y., Walkowicz, M.J., Buiting, K., Johnson, D.K., Tarvin, R.E., Rinchik, E.M., Horsthemke, B., Stubbs, L. und Nicholls, R.D. (1999) The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet*, **8**, 533-542.
- Jiang, Y.H., Armstrong, D., Albrecht, U., Atkins, C.M., Noebels, J.L., Eichele, G., Sweatt, J.D. und Beaudet, A.L. (1998) Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron*, **21**, 799-811.
- Joazeiro, C.A. und Weissman, A.M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, **102**, 549-552.
- Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T. und Liu, Y.C. (1999) The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*, **286**, 309-312.
- Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. und Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, **270**, 17442-17456.
- Jones, D.S. und Schofield, J.P. (1990) A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*, **18**, 7463-7464.
- Kalchman, M.A., Graham, R.K., Xia, G., Koide, H.B., Hodgson, J.G., Graham, K.C., Goldberg, Y.P., Gietz, R.D., Pickart, C.M. und Hayden, M.R. (1996) Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem*, **271**, 19385-19394.
- Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Jr., Elledge, S.J., Conaway, R.C., Harper, J.W. und Conaway, J.W. (1999) Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science*, **284**, 657-661.
- Kao, W.H., Beaudenon, S.L., Talis, A.L., Huijbregtse, J.M. und Howley, P.M. (2000) Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *J Virol*, **74**, 6408-6417.
- Kapp, L.D. und Lorsch, J.R. (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem*, **73**, 657-704.
- Kappes, F., Burger, K., Baack, M., Fackelmayer, F.O. und Gruss, C. (2001) Subcellular localization of the human proto-oncogene protein DEK. *J Biol Chem*, **276**, 26317-26323.
- Khan, O.Y., Fu, G., Ismail, A., Srinivasan, S., Cao, X., Tu, Y., Lu, S. und Nawaz, Z. (2006) Multifunction Steroid Receptor Coactivator, E6-Associated Protein, Is Involved in Development of the Prostate Gland. *Mol Endocrinol*, **20**, 544-559.
- Kirkpatrick, D.S., Denison, C. und Gygi, S.P. (2005) Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Cell Biol*, **7**, 750-757.

- Kleijnen, M.F., Shih, A.H., Zhou, P., Kumar, S., Soccio, R.E., Kedersha, N.L., Gill, G. und Howley, P.M. (2000) The hPLIC proteins may provide a link between the ubiquitination machinery and the proteasome. *Mol Cell*, **6**, 409-419.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. und Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.
- Kohno, K., Izumi, H., Uchiumi, T., Ashizuka, M. und Kuwano, M. (2003) The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays*, **25**, 691-698.
- Kroismayr, R., Baranyi, U., Stehlik, C., Dorfleutner, A., Binder, B.R. und Lipp, J. (2004) HERC5, a HECT E3 ubiquitin ligase tightly regulated in LPS activated endothelial cells. *J Cell Sci*, **117**, 4749-4756.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. und Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
- Kuhne, C. und Banks, L. (1998) E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol Chem*, **273**, 34302-34309.
- Kumar, S., Kao, W.H. und Howley, P.M. (1997) Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *J Biol Chem*, **272**, 13548-13554.
- Kumar, S., Talis, A.L. und Howley, P.M. (1999) Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination. *J Biol Chem*, **274**, 18785-18792.
- Kwon, Y.T., Reiss, Y., Fried, V.A., Hershko, A., Yoon, J.K., Gonda, D.K., Sangan, P., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. und Varshavsky, A. (1998) The mouse and human genes encoding the recognition component of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7898-7903.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, D.H. und Goldberg, A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, **8**, 397-403.
- Lee, S.S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. und Javier, R.T. (2000) Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol*, **74**, 9680-9693.
- Lehman, A.L., Nakatsu, Y., Ching, A., Bronson, R.T., Oakey, R.J., Keiper-Hrynko, N., Finger, J.N., Durham-Pierre, D., Horton, D.B., Newton, J.M., Lyon, M.F. und Brilliant, M.H. (1998) A very large protein with diverse functional motifs is deficient in rjs (runty, jerky, sterile) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9436-9441.
- Leverson, J.D., Joazeiro, C.A., Page, A.M., Huang, H., Hieter, P. und Hunter, T. (2000) The APC11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. *Mol Biol Cell*, **11**, 2315-2325.
- Levy, F., Muehlethaler, K., Salvi, S., Peitrequin, A.L., Lindholm, C.K., Cerottini, J.C. und Rimoldi, D. (2005) Ubiquitylation of a melanosomal protein by HECT-E3 ligases serves as sorting signal for lysosomal degradation. *Mol Biol Cell*, **16**, 1777-1787.
- Lin, X., Ruan, X., Anderson, M.G., McDowell, J.A., Kroeger, P.E., Fesik, S.W. und Shen, Y. (2005) siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res*, **33**, 4527-4535.
- Linares, L.K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Muller, S. und Scheffner, M. (2003) HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12009-12014.

- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S. und Weissman, A.M. (1999) RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11364-11369.
- Lyon, M.F., King, T.R., Gondo, Y., Gardner, J.M., Nakatsu, Y., Eicher, E.M. und Brilliant, M.H. (1992) Genetic and molecular analysis of recessive alleles at the pink-eyed dilution (p) locus of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6968-6972.
- Ma, J., Plesken, H., Treisman, J.E., Edelman-Novemsky, I. und Ren, M. (2004) Lightoid and Claret: a rab GTPase and its putative guanine nucleotide exchange factor in biogenesis of Drosophila eye pigment granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11652-11657.
- Macias, M.J., Wiesner, S. und Sudol, M. (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett*, **513**, 30-37.
- Mansouri, M., Bartee, E., Gouveia, K., Hovey Nerenberg, B.T., Barrett, J., Thomas, L., Thomas, G., McFadden, G. und Fruh, K. (2003) The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *J Virol*, **77**, 1427-1440.
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K. und Benarous, R. (1998) A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell*, **1**, 565-574.
- Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M. und Nakayama, K.I. (2004) Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *Embo J*, **23**, 659-669.
- Matsuura, T., Sutcliffe, J.S., Fang, P., Galjaard, R.J., Jiang, Y.H., Benton, C.S., Rommens, J.M. und Beaudet, A.L. (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet*, **15**, 74-77.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. und Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **135**, 1457-1470.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. und Ratcliffe, P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.
- Melvold, R.W. (1974) The effects of mutant p-alleles on the reproductive system in mice. *Genet Res*, **23**, 319-325.
- Mifsud, W. und Bateman, A. (2002) Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0068.
- Miller, J. und Gordon, C. (2005) The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett*, **579**, 3224-3230.
- Mitsui, K., Nakanishi, M., Ohtsuka, S., Norwood, T.H., Okabayashi, K., Miyamoto, C., Tanaka, K., Yoshimura, A. und Ohtsubo, M. (1999) A novel human gene encoding HECT domain and RCC1-like repeats interacts with cyclins and is potentially regulated by the tumor suppressor proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **266**, 115-122.
- Miura, K., Kishino, T., Li, E., Webber, H., Dikkes, P., Holmes, G.L. und Wagstaff, J. (2002) Neurobehavioral and electroencephalographic abnormalities in Ube3a maternal-deficient mice. *Neurobiol Dis*, **9**, 149-159.

- Miura, T., Klaus, W., Gsell, B., Miyamoto, C. und Senn, H. (1999) Characterization of the binding interface between ubiquitin and class I human ubiquitin-conjugating enzyme 2b by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J Mol Biol*, **290**, 213-228.
- Morris, J.R. und Solomon, E. (2004) BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet*, **13**, 807-817.
- Muratani, M. und Tansey, W.P. (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 192-201.
- Nakagawa, S. und Huibregtse, J.M. (2000) Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol*, **20**, 8244-8253.
- Nakao, M., Sutcliffe, J.S., Durtschi, B., Mutirangura, A., Ledbetter, D.H. und Beaudet, A.L. (1994) Imprinting analysis of three genes in the Prader-Willi/Angelman region: SNRPN, E6-associated protein, and PAR-2 (D15S225E). *Hum Mol Genet*, **3**, 309-315.
- Naranda, T., Sirangelo, I., Fabbri, B.J. und Hershey, J.W. (1995) Mutations in the NKXD consensus element indicate that GTP binds to the gamma-subunit of translation initiation factor eIF2. *FEBS Lett*, **372**, 249-252.
- Nawaz, Z., Lonard, D.M., Smith, C.L., Lev-Lehman, E., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. und O'Malley, B.W. (1999) The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol*, **19**, 1182-1189.
- Nekrasov, M.P., Ivshina, M.P., Chernov, K.G., Kovrigina, E.A., Evdokimova, V.M., Thomas, A.A., Hershey, J.W. und Ovchinnikov, L.P. (2003) The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *J Biol Chem*, **278**, 13936-13943.
- Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D. und Macara, I.G. (2001) Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*, **292**, 1540-1543.
- Nicholls, R.D. und Knepper, J.L. (2001) Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **2**, 153-175.
- Nicholls, R.D., Saitoh, S. und Horsthemke, B. (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet*, **14**, 194-200.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K. und Bernards, R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, **123**, 773-786.
- Nuber, U., Schwarz, S., Kaiser, P., Schneider, R. und Scheffner, M. (1996) Cloning of human ubiquitin-conjugating enzymes UbcH6 and UbcH7 (E2-F1) and characterization of their interaction with E6-AP and RSP5. *J Biol Chem*, **271**, 2795-2800.
- Nuber, U., Schwarz, S.E. und Scheffner, M. (1998) The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur J Biochem*, **254**, 643-649.
- Oda, H., Kumar, S. und Howley, P.M. (1999) Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9557-9562.

- Ohtsubo, M., Kai, R., Furuno, N., Sekiguchi, T., Sekiguchi, M., Hayashida, H., Kuma, K., Miyata, T., Fukushige, S., Murotsu, T. und et al. (1987) Isolation and characterization of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation. *Genes Dev*, **1**, 585-593.
- Oughtred, R., Bedard, N., Adegoke, O.A., Morales, C.R., Trasler, J., Rajapurohitam, V. und Wing, S.S. (2002) Characterization of rat100, a 300-kilodalton ubiquitin-protein ligase induced in germ cells of the rat testis and similar to the *Drosophila* hyperplastic discs gene. *Endocrinology*, **143**, 3740-3747.
- Ozkaynak, E., Finley, D. und Varshavsky, A. (1984) The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature*, **312**, 663-666.
- Page, A.M. und Hieter, P. (1999) The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu Rev Biochem*, **68**, 583-609.
- Passmore, L.A. und Barford, D. (2004) Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J*, **379**, 513-525.
- Passmore, L.A., McCormack, E.A., Au, S.W., Paul, A., Willison, K.R., Harper, J.W. und Barford, D. (2003) Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *Embo J*, **22**, 786-796.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. und Gygi, S.P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*, **21**, 921-926.
- Pestova, T.V., Borukhov, S.I. und Hellen, C.U. (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature*, **394**, 854-859.
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I. und Hellen, C.U. (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7029-7036.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, **25**, 544-548.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Pickart, C.M. (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell*, **116**, 181-190.
- Pickart, C.M. und Fushman, D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, **8**, 610-616.
- Pintard, L., Willis, J.H., Willems, A., Johnson, J.L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P.E., Tyers, M., Bowerman, B. und Peter, M. (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, **425**, 311-316.
- Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Thomas, A.A., Merrick, W.C., Ovchinnikov, L.P. und Shatsky, I.N. (2002) Positive and negative effects of the major mammalian messenger ribonucleoprotein p50 on binding of 40 S ribosomal subunits to the initiation codon of beta-globin mRNA. *J Biol Chem*, **277**, 15445-15451.
- Ponting, C., Schultz, J. und Bork, P. (1997) SPRY domains in ryanodine receptors (Ca²⁺)-release channels). *Trends Biochem Sci*, **22**, 193-194.
- Ponting, C.P., Blake, D.J., Davies, K.E., Kendrick-Jones, J. und Winder, S.J. (1996) ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci*, **21**, 11-13.
- Qiu, L., Joazeiro, C., Fang, N., Wang, H.Y., Elly, C., Altman, Y., Fang, D., Hunter, T. und Liu, Y.C. (2000) Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **275**, 35734-35737.
- Raasi, S. und Pickart, C.M. (2003) Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, **278**, 8951-8959.

- Raasi, S., Schmidtke, G., de Giuli, R. und Groettrup, M. (1999) A ubiquitin-like protein which is synergistically inducible by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol*, **29**, 4030-4036.
- Raasi, S., Schmidtke, G. und Groettrup, M. (2001) The ubiquitin-like protein FAT10 forms covalent conjugates and induces apoptosis. *J Biol Chem*, **276**, 35334-35343.
- Rao, H. und Sastry, A. (2002) Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J Biol Chem*, **277**, 11691-11695.
- Rao, H., Uhlmann, F., Nasmyth, K. und Varshavsky, A. (2001) Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature*, **410**, 955-959.
- Ray, M.K., Datta, B., Chakraborty, A., Chattopadhyay, A., Meza-Keuthen, S. und Gupta, N.K. (1992) The eukaryotic initiation factor 2-associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 539-543.
- Reiss, Y., Kaim, D. und Hershko, A. (1988) Specificity of binding of NH₂-terminal residue of proteins to ubiquitin-protein ligase. Use of amino acid derivatives to characterize specific binding sites. *J Biol Chem*, **263**, 2693-2698.
- Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A. und Wittinghofer, A. (2001) Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell*, **105**, 245-255.
- Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M. und Wittinghofer, A. (1998) The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature*, **392**, 97-101.
- Richard, M., Drouin, R. und Beaulieu, A.D. (1998) ABC50, a novel human ATP-binding cassette protein found in tumor necrosis factor-alpha-stimulated synoviocytes. *Genomics*, **53**, 137-145.
- Richardson, J.P. (2002) Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim Biophys Acta*, **1577**, 251-260.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C. und Jentsch, S. (2005) A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, **120**, 73-84.
- Rinchik, E.M., Carpenter, D.A. und Handel, M.A. (1995) Pleiotropy in microdeletion syndromes: neurologic and spermatogenic abnormalities in mice homozygous for the p6H deletion are likely due to dysfunction of a single gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6394-6398.
- Rizo, J. und Sudhof, T.C. (1998) C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem*, **273**, 15879-15882.
- Robinson, P.A. und Ardley, H.C. (2004) Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci*, **117**, 5191-5194.
- Rohman, M. und Harrison-Lavoie, K.J. (2000) Separation of copurifying GroEL from glutathione-S-transferase fusion proteins. *Protein Expr Purif*, **20**, 45-47.
- Rolfe, M., Beer-Romero, P., Glass, S., Eckstein, J., Berdo, I., Theodoras, A., Pagano, M. und Draetta, G. (1995) Reconstitution of p53-ubiquitylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3264-3268.
- Rosa, J.L. und Barbacid, M. (1997) A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70. *Oncogene*, **15**, 1-6.

- Rosa, J.L., Casaroli-Marano, R.P., Buckler, A.J., Vilaro, S. und Barbacid, M. (1996) p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins. *Embo J*, **15**, 4262-4273.
- Rougeulle, C., Glatt, H. und Lalande, M. (1997) The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. *Nat Genet*, **17**, 14-15.
- Sankar, R. (2005) Angelman syndrome: need for further illumination in the theater of the happy puppet. *Epilepsy Curr*, **5**, 220-222.
- Scarafia, L.E., Winter, A. und Swinney, D.C. (2000) Quantitative expression analysis of the cellular specificity of HECT-domain ubiquitin E3 ligases. *Physiol Genomics*, **4**, 147-153.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M. und Howley, P.M. (1994) Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8797-8801.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. und Howley, P.M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**, 495-505.
- Scheffner, M., Nuber, U. und Huibregtse, J.M. (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, **373**, 81-83.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. und Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-1136.
- Schule, T., Rose, M., Entian, K.D., Thumm, M. und Wolf, D.H. (2000) Ubc8p functions in catabolite degradation of fructose-1, 6-bisphosphatase in yeast. *Embo J*, **19**, 2161-2167.
- Schwarz, S.E., Rosa, J.L. und Scheffner, M. (1998) Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. *J Biol Chem*, **273**, 12148-12154.
- Seufert, W. und Jentsch, S. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *Embo J*, **9**, 543-550.
- Skabkina, O.V., Lyabin, D.N., Skabkin, M.A. und Ovchinnikov, L.P. (2005) YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining. *Mol Cell Biol*, **25**, 3317-3323.
- Skordalakes, E. und Berger, J.M. (2003) Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. *Cell*, **114**, 135-146.
- Smith, C.L., DeVera, D.G., Lamb, D.J., Nawaz, Z., Jiang, Y.H., Beaudet, A.L. und O'Malley, B.W. (2002) Genetic ablation of the steroid receptor coactivator-ubiquitin ligase, E6-AP, results in tissue-selective steroid hormone resistance and defects in reproduction. *Mol Cell Biol*, **22**, 525-535.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E. und Sigler, P.B. (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature*, **379**, 369-374.
- Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M. und Finley, D. (2000) Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*, **102**, 67-76.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L. und Finley, D. (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*, **15**, 1265-1273.

- Stephen, A.G., Trausch-Azar, J.S., Handley-Gearhart, P.M., Ciechanover, A. und Schwartz, A.L. (1997) Identification of a region within the ubiquitin-activating enzyme required for nuclear targeting and phosphorylation. *J Biol Chem*, **272**, 10895-10903.
- Talis, A.L., Huibregtse, J.M. und Howley, P.M. (1998) The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem*, **273**, 6439-6445.
- Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A. und Ohtsubo, M. (1999) MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett*, **447**, 5-9.
- Tao, W. und Levine, A.J. (1999) Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3077-3080.
- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H. und Hay, R.T. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem*, **276**, 35368-35374.
- Thomas, M. und Banks, L. (1998) Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*, **17**, 2943-2954.
- Thomas, M. und Banks, L. (1999) Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*, **80 (Pt 6)**, 1513-1517.
- Thomas, M., Laura, R., Hepner, K., Guccione, E., Sawyers, C., Lasky, L. und Banks, L. (2002) Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*, **21**, 5088-5096.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. und Pickart, C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J*, **19**, 94-102.
- Turner, G.C., Du, F. und Varshavsky, A. (2000) Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature*, **405**, 579-583.
- Tyers, M. und Jorgensen, P. (2000) Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 54-64.
- Tyzack, J.K., Wang, X., Belsham, G.J. und Proud, C.G. (2000) ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem*, **275**, 34131-34139.
- Ulrich, H.D. und Jentsch, S. (2000) Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J*, **19**, 3388-3397.
- Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C. und Fushman, D. (2004) Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem*, **279**, 7055-7063.
- Varshavsky, A., Turner, G., Du, F. und Xie, Y. (2000) Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem*, **381**, 779-789.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E. und Cook, W.J. (1987) Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*, **194**, 531-544.
- Wada, K. und Kamitani, T. (2006) Autoantigen Ro52 is an E3 ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun*, **339**, 415-421.
- Walkowicz, M., Ji, Y., Ren, X., Horsthemke, B., Russell, L.B., Johnson, D., Rinchik, E.M., Nicholls, R.D. und Stubbs, L. (1999) Molecular characterization of radiation- and chemically induced mutations associated with neuromuscular tremors, runting, juvenile lethality, and sperm defects in jdf2 mice. *Mamm Genome*, **10**, 870-878.

- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. und Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, **412**, 346-351.
- Wasch, R. und Engelbert, D. (2005) Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells. *Oncogene*, **24**, 1-10.
- Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I. und Yarden, Y. (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, **274**, 22151-22154.
- Weber, M.H., Fricke, I., Doll, N. und Marahiel, M.A. (2002) CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. *Nucleic Acids Res*, **30**, 375-378.
- Weissman, A.M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 169-178.
- Welchman, R.L., Gordon, C. und Mayer, R.J. (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 599-609.
- Wendt, K.S., Vodermaier, H.C., Jacob, U., Gieffers, C., Gmachl, M., Peters, J.M., Huber, R. und Sondermann, P. (2001) Crystal structure of the APC10/DOC1 subunit of the human anaphase-promoting complex. *Nat Struct Biol*, **8**, 784-788.
- Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C. und Gordon, C. (2001) Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol*, **3**, 939-943.
- Wilkinson, K.D. (1995) Roles of ubiquitylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu Rev Nutr*, **15**, 161-189.
- Wilkinson, M.F. und Shyu, A.B. (2001) Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays*, **23**, 775-787.
- Williams, C.A., Beaudet, A.L., Clayton-Smith, J., Knoll, J.H., Kyllerman, M., Laan, L.A., Magenis, R.E., Moncla, A., Schinzel, A.A., Summers, J.A. und Wagstaff, J. (2006) Angelman syndrome 2005: Updated consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet A*, **140**, 413-418.
- Wolffe, A.P., Tafuri, S., Ranjan, M. und Familari, M. (1992) The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from Escherichia coli to man. *New Biol*, **4**, 290-298.
- Wong, E.Y., Tse, J.Y., Yao, K.M., Tam, P.C. und Yeung, W.S. (2002) VCY2 protein interacts with the HECT domain of ubiquitin-protein ligase E3A. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 1104-1111.
- Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M. und Baer, R. (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet*, **14**, 430-440.
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T.H., Vidal, M., Elledge, S.J. und Harper, J.W. (2003) BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*, **425**, 316-321.
- Yamamoto, Y., Huijbrechtse, J.M. und Howley, P.M. (1997) The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing. *Genomics*, **41**, 263-266.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J.P., Weissman, A.M. und Ashwell, J.D. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, **288**, 874-877.

- You, J., Cohen, R.E. und Pickart, C.M. (1999) Construct for high-level expression and low misincorporation of lysine for arginine during expression of pET-encoded eukaryotic proteins in *Escherichia coli*. *Biotechniques*, **27**, 950-954.
- You, J. und Pickart, C.M. (2001) A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, **276**, 19871-19878.
- Yu, H., Peters, J.M., King, R.W., Page, A.M., Hieter, P. und Kirschner, M.W. (1998) Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science*, **279**, 1219-1222.
- Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D. und Pavletich, N.P. (2000) Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell*, **102**, 533-539.

6 Zusammenfassung

Ursprünglich wurde E6-AP (E6-assoziiertes Protein) als zellulärer Partner des E6-Onkoproteins Krebs-assoziiertes humaner Papillomviren isoliert. In diesem Komplex fungiert E6-AP als eine Ubiquitin-Protein-Ligase, welche das Tumorsuppressorprotein p53 für den proteasomalen Abbau markiert. Essentiell für die Ligasefunktion von E6-AP ist dabei eine 350 Aminosäuren umfassende C-terminale Region, die als HECT-Domäne (Homolog zum E6-AP C-Terminus) bezeichnet wird. Die HECT-Domäne ist in einer Vielzahl von weiteren Proteinen vorhanden, von denen daher angenommen wird, dass sie ebenfalls eine Ubiquitin-Protein-Ligase-Funktion aufweisen.

In dieser Arbeit konnte ein neuer Bindungspartner von E6-AP identifiziert werden. Es handelt sich um das Protein Herc2. Es hat eine molekulare Masse von 528 kDa und weist zusätzlich zu drei RCC1-ähnlichen Domänen ebenfalls eine C-terminale HECT-Domäne auf. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Bindung von E6-AP über die zweite der drei RCC1-ähnlichen Domänen vermittelt wird. Diese Domäne war in der Lage die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von E6-AP zu erhöhen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Herc2 von E6-AP *in vitro* ubiquitiniert wird. *In vivo* konnte ein E6-AP-abhängiger Abbau von Herc2 demonstriert werden, woraus geschlossen wird, dass Herc2 ein mögliches neues Substrat von E6-AP darstellt. Dies ist von besonderem Interesse, da über E6-unabhängige Substrate von E6-AP nur wenig bekannt ist. Mutationen im E6-AP-Gen führen zu einer erblichen, neurologischen Erkrankung, dem sogenannten Angelman-Syndrom, wenn sie die Ligaseaktivität zerstören. Ein deregulierter Abbau von Substraten von E6-AP könnte daher diese Erkrankung verursachen.

Für Herc2 konnte in dieser Arbeit eine Ligaseaktivität nachgewiesen und somit gezeigt werden, dass es sich um ein funktionelles HECT-Domänen-Protein handelt. Es wurde belegt, dass es verschiedene Lysine im Ubiquitinmolekül zur Kettenverknüpfung *in vitro* benutzen kann. Zudem wurden Hinweise erhalten, dass Herc2 im Zusammenhang mit dem Translationsinitiationskomplex steht.

7 Abstract

E6-AP (E6-associated protein) was originally identified as a cellular partner of the E6-oncoprotein of cancer-associated human papillomaviruses. In this complex, E6-AP acts as an ubiquitin-protein ligase, inducing the proteasomal degradation of the tumour suppressor protein p53. A C-terminal region of 350 amino acids in length, termed HECT domain (homologous to E6-AP C-terminus), is essential for the ligase function. The HECT domain is present in a multitude of proteins and it is commonly assumed, that these proteins also show ubiquitin-protein ligase activity.

In this work, the giant protein Herc2 was identified as a new binding partner of E6-AP. Herc2 has a molecular mass of 528 kDa and contains in addition to three RCC1-like domains a C-terminal HECT domain. The second RCC1-like domain of Herc2 was demonstrated to be required for the interaction with E6-AP *in vitro*. This domain was able to enhance the ligase activity of E6-AP. Furthermore, Herc2 was shown to be ubiquitinated by E6-AP *in vitro*. *In vivo* experiments revealed an E6-AP-dependent degradation of Herc2, which suggests that Herc2 is an E6-independent substrate of E6-AP. This is of considerable interest, since only little is known about E6-independent substrates of E6-AP. Mutations in the E6-AP gene, which result in the inactivation of its ligase activity, have been associated with the Angelman Syndrome, a hereditary neurological disorder. Thus, deregulated degradation of substrates of E6-AP may be involved in the pathogenesis of Angelman Syndrome.

Finally, it was shown that Herc2 possesses ligase activity, which provides evidence that it is a functional HECT domain protein. Different lysines in ubiquitin can be used for polyubiquitin chain assembly by Herc2. In addition, evidence has been obtained, that Herc2 could be associated with the translation initiation complex.

8 Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. H. W. Klein betreut worden.

(Ulrike Kogel)

Teilpublikation:

Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., Kogel, U., Scheffner, M., Helin, K. und Eilers, M. (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. Cell, 123, 409-421

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ulrike Kogel
Anschrift	Nussbaumerstraße 78 50823 Köln
Geburtsdatum	09.03.1975
Geburtsort	Köln
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

August 1985-Juni 1994	Hochschulreife am Otto-Hahn-Gymnasium, Bergisch Gladbach-Bensberg
-----------------------	--

Berufsausbildung

August 1994-Juli 1996	Ausbildung zur „Staatlich geprüften Chemisch- technischen Assistentin“ an der Berufsbildenden Schule 16 der Stadt Köln
-----------------------	--

Studium

Oktober 1996-Juni 2001	Studiengang Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum, Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolf-H. Kunau mit dem Thema: „Molekularbiologische und zellbiologische Charakterisierung der Peroxine Pex4p und Pex22p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> “
Dezember 2001-November 2004	Promotion an der Universität zu Köln. Praktische Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Scheffner am Institut für Biochemie I, Medizinische Fakultät. Betreuung der Promotion durch Prof. Dr. H. W. Klein, Institut für Biochemie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Promotionsthema: Charakterisierung von Herc2 und seiner Interaktion mit der Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP
ab Dezember 2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Konstanz, Fachbereich Biologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Scheffner
30. Juni 2006	Disputation an der Universität zu Köln