

Ubiquitylation of NOXA in DNA Damage Response

Marie-Christine Albert

Abstract

The BH3-only protein NOXA represents one of the critical mediators of apoptosis in response to DNA damage owing to its distinct potential to bind and antagonize the anti-apoptotic protein MCL-1. Due to the central role of MCL-1 in pathogenesis of cancer and the fact that conventional anti-cancer chemotherapy involves DNA damage-induced cellular responses, NOXA has been frequently considered as a valuable target in cancer therapy and research has been focusing on the elucidation of cellular regulatory circuits that govern NOXA expression.

The current work demonstrates for the first time that NOXA is not only transcriptionally but also post-translationally regulated upon DNA damage. The results obtained show that accelerated expressed NOXA is immediately ubiquitylated and targeted for lysosomal degradation to avoid cytosolic aggregation of NOXA upon DNA damage. This process is mediated by the E3 Ligase CHIP (STUB1), which directly binds and ubiquitylates NOXA by attachment of K63-linked ubiquitin chains. The DNA damage-induced CHIP-mediated NOXA ubiquitylation involves three lysine residues residing within NOXAs functional domains, namely the C-terminal hydrophobic patch and the BH3 domain. Biochemical analysis revealed that CHIP requires the BH3 domain of NOXA for direct interaction. Furthermore, both CHIP-binding to as well as ubiquitylation of NOXA inhibited NOXA-MCL-1 interaction. *Vice versa*, prior binding of NOXA to MCL-1 efficiently inhibited CHIP-mediated ubiquitylation of NOXA. Strikingly, the presence of MCL-1 not only prevented NOXA ubiquitylation and lysosomal degradation but also promoted mitochondrial localization of NOXA. These data indicate that NOXA abundance is dictated by pre-existing MCL-1, which inhibits NOXA degradation by CHIP-mediated ubiquitylation.

This study discovered a novel regulatory process, which involves CHIP, ubiquitin and MCL-1 in order to efficiently control cellular levels of NOXA to avoid its cytosolic aggregation upon DNA damage. These data also shed new light on the role of increased Noxa ubiquitylation in cancer. Thus, a better understanding of cellular processes controlling NOXA ubiquitylation provides important insights about resistance to genotoxic chemotherapy and can contribute to the development of

drugs that specifically interfere with the dynamic crosstalk in the CHIP-NOXA-MCL-1 axis in cancer.

Zusammenfassung

Das "BH3-only"-Protein NOXA ist aufgrund seines speziellen Potenzials, das anti-apoptotische Protein MCL-1 zu binden und antagonisieren, einer der entscheidenden Mediatoren der Zellantwort auf DNA-Schäden. Wegen der zentralen Rolle von MCL-1 in der Pathogenese und aufgrund der Tatsache, dass konventionelle Chemotherapie die DNA-Schäden induzierende Zellantwort involviert, wird NOXA häufig als nützliches Protein in der Krebstherapie in Erwägung gezogen. Bisherige Untersuchungen fokussierten die Aufklärung von zellulären regulatorischen Prozessen, die die NOXA-Expression beeinflussen.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass NOXA nicht nur transkriptionell, sondern auch post-translational nach DNA-Schäden reguliert wird. Die erlangten Ergebnisse beschreiben, dass stark expremiertes NOXA umgehend ubiquityliert und für den lysosomalen Abbau markiert wird, um zytosolische Aggregation von NOXA nach DNA-Schäden zu verhindern. Dieser Prozess wird durch die E3-Ligase CHIP (STUB1) mediiert, welche NOXA direkt bindet und mit K63-verknüpften Ubiquitinketten modifiziert. Die durch DNA-Schäden induzierte CHIP-abhängige NOXA-Ubiquitylierung bezieht drei Lysinreste mit ein, die inmitten der funktionellen Domänen von NOXA liegen, nämlich im C-terminalen hydrophoben Abschnitt und in der BH3 Domäne. Biochemische Analysen ergaben, dass CHIP die BH3 Domäne für die direkte Interaktion mit NOXA benötigt. Des Weiteren inhibieren sowohl CHIP-Bindung als auch Ubiquitylierung von NOXA die Interaktion von NOXA und MCL-1. Umgekehrt inhibiert vorheriges Binden von NOXA an MCL-1 effektiv die CHIP-vermittelte Ubiquitylierung. Besonders ist dabei, dass die Präsenz von MCL-1 nicht nur die Ubiquitylierung von NOXA und den lysosomalen Abbau verhindert, sondern auch die mitochondriale Lokalisation von NOXA ermöglicht.

Diese Arbeit beschreibt einen neuen regulatorischen Prozess, der CHIP, Ubiquitin und MCL-1 zur effizienten Kontrolle von NOXA-Leveln involviert, um die zytosolische Aggregation von NOXA nach DNA-Schäden zu vermeiden. Diese Untersuchung beleuchtet ebenfalls die Rolle von erhöhter NOXA-Ubiquitylierung in Krebszellen. Somit ermöglicht das bessere Verständnis der zellulären Prozesse, die NOXA kontrollieren, ebenfalls lebenswichtige Einsichten in die Resistenz zu genotoxischer

Chemotherapie und kann zu der Entwicklung von Medikamenten beitragen, die spezifisch mit der dynamischen Interaktion der CHIP-NOXA-MCL-1-Achse in Krebs interferieren.