



# Der p97-Kofaktor UBXD1 ist ein neuer Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalweges

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Claudia Wollny

aus Burgsteinfurt

Würzburg 2016

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am: .....

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Buchberger
2. Gutachter: Prof. Dr. Utz Fischer

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: Prof. Dr. Alexander Buchberger
2. Prüfer: Prof. Dr. Utz Fischer
3. Prüfer: PD Dr. Ingolf Berberich

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

### Der p97-Kofaktor UBXD1 ist ein neuer Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalweges

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Grade keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, Januar 2016

.....

Claudia Wollny

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Signaltransduktion in Eukaryoten	3
2.2 Das Ubiquitin-System	4
2.3 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg	6
2.3.1 Der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg	8
2.3.2 Die Rolle von Ubiquitin im NF- $\kappa$ B-Signalweg	13
2.4 Die Ubiquitin-selektive ATPase p97	18
2.4.1 Die Struktur und zellulären Funktionen von p97	18
2.4.2 Die Kofaktoren von p97	21
2.4.3 Die Familie der UBX-Domänen-Proteine	23
2.4.4 Das UBX-Domänen-Protein UBXD1	26
2.5 Ziel der Arbeit	27
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner von UBXD1	28
3.1.1 Bestätigung neuer Interaktoren von UBXD1	28
3.1.2 Interaktion von UBXD1 und den Kandidaten in HEK293T-Zellen	30
3.1.3 Rolle der PUB-Domäne für die Bindung von UBXD1 an A20	33
3.1.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen A20 und UBXD1	34
3.2 Rolle von p97 und unterschiedlichen p97-Kofaktoren im NF- $\kappa$ B-Signalweg	36
3.2.1 Einfluss von p97 auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges	36
3.2.2 Einfluss der chemischen Inhibition von p97 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg	38
3.2.3 Einfluss unterschiedlicher Kofaktoren von p97 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg	39
3.3 Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch UBXD1	43
3.3.1 Einfluss von UBXD1 auf den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg	43
3.3.2 Spezifität des Einflusses von UBXD1 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg	44
3.3.3 Einfluss der Überexpression von UBXD1 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg	46
3.4 Nähere Charakterisierung der Rolle von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg	48
3.4.1 Einfluss von UBXD1 auf die Aktivierung des atypischen NF- $\kappa$ B-Signalweges	48
3.4.2 <i>Dose-response</i> -Kurven und zeitliche Abhängigkeit der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach UBXD1-Depletion	49
3.4.3 Einfluss von UBXD1 auf die Expression von endogenen NF- $\kappa$ B-Zielgenen	50
3.4.4 Der Einfluss von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg HEK293T-Zellen	54
3.4.5 Einfluss von UBXD1 auf die Kerntranslokation von p65	56
3.4.6 Einfluss von UBXD1 auf die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$	60
<b>4 Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1 p97 und p97-Kofaktoren besitzen mehrere Rollen im NF- $\kappa$ B-Signalweg	62
4.2 UBXD1 ist ein positiver Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalweges	66
4.3 UBXD1 bindet an die NF- $\kappa$ B-Regulatoren A20 und TRIAD3A	69
4.4 Mögliche Modelle für den molekularen Mechanismus der UBXD1-vermittelten Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges	70
4.4.1 Modell 1: UBXD1 reguliert die Bindung von A20 an lineare Ubiquitinketten	72
4.4.2 Modell 2: UBXD1 reguliert die Lokalisation von A20 an Vesikeln	73
4.4.3 Ausblick	75
<b>5 Material und Methoden</b>	<b>77</b>
5.1 Material	77
5.1.1 Chemikalien und Reagenzien	77
5.1.2 Plasmide	77
5.1.3 <i>small interfering RNA</i> (siRNA)	78
5.1.4 Antikörper	79
5.1.5 Affinitätschromatographie-Matrizen	80
5.1.6 p97-Inhibitoren	80
5.1.7 Transfektionsreagenzien	80

5.1.8	Kits	80
5.1.9	<i>E. coli</i> Stämme	81
5.1.10	Hefestämme	81
5.1.11	Zelllinien	81
5.1.12	Zellkultur	81
5.1.13	Weitere Materialien	81
5.2	Methoden .....	83
5.2.1	<i>E. coli</i> -Methoden	83
5.2.2	Molekular-biologische Methoden	85
5.2.3	<i>S. cerevisiae</i> -Methoden	88
5.2.4	Zellkulturtechniken	91
5.2.5	Proteinbiochemische Methoden	97
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>120</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>124</b>

# 1 Zusammenfassung

Die essenzielle, Ubiquitin-selektive ATPase p97 reguliert eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse in Eukaryoten. Dazu zählen Proteinqualitätskontrolle, DNA-Reparatur, Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle, Autophagie sowie das endolysosomale System. Diese unterschiedlichen Funktionen von p97 werden durch die Bindung von Kofaktoren engmaschig gesteuert und kontrolliert. Die größte und am besten untersuchte Gruppe von p97-Kofaktoren sind die Proteine der UBX-Familie. Diese zeichnen sich durch den Besitz einer UBX-Domäne aus, welche die Bindung an p97 vermittelt. Das in höheren Eukaryoten konservierte Familienmitglied UBXD1 besitzt darüber hinaus mit einer PUB-Domäne und einem VIM-Motiv noch mindestens zwei weitere p97-Bindemodule. UBXD1 kann an Vesikel des endolysosomalen Degradationssystems lokalisieren, seine genauen zellulären Funktionen sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von humanem UBXD1. Dafür wurden Kandidaten eines zuvor durchgeführten Yeast-Two-Hybrid-Screens auf ihre Two-Hybrid-Interaktion mit unterschiedlichen UBXD1-Varianten getestet. Darüber hinaus wurde durch Immunpräzipitationsexperimente untersucht, ob die Kandidatenproteine auch in Säugerzellen mit UBXD1 interagieren. Als vielversprechende neue Bindungspartner von UBXD1 wurden so die Ubiquitin-Ligase TRIAD3A und das Ubiquitin-editierende Protein A20 identifiziert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen UBXD1 und A20 von einer funktionellen PUB-Domäne und dem siebten Zinkfinger-Motiv von A20 abhängig ist.

Da sowohl TRIAD3A als auch A20 negative Regulatoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges sind, wurde daraufhin untersucht, ob auch UBXD1 eine Funktion in diesem Signalweg besitzt. Tatsächlich war in UBXD1-depletierten HeLa 57A-Zellen die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression eines Reportgens nach Aktivierung des Signalweges durch TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Doxorubicin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stark reduziert. Dabei spricht die verringerte Aktivierung nach unterschiedlichen Stimuli für eine generelle Rolle von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg. Durch quantitative Echtzeit-PCR konnte gezeigt werden, dass in HeLa- und HEK293T-Zellen nach UBXD1-Depletion auch die Expression endogener NF- $\kappa$ B-Zielgene verringert ist. Da in UBXD1-depletierten Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  bereits die Kerntranslokation des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor p65 reduziert ist, ist davon auszugehen, dass UBXD1 an einer früheren Phase der Aktivierung des Signalweges beteiligt ist. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass UBXD1 bekannte Funktionen von A20 reguliert und etwa die Bindung von A20 an Vesikel des endolysosomalen Systems oder an lineare Ubiquitinketten beeinflusst. Diese Arbeit beschreibt somit eine neue Funktion des p97-Kofaktors UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg.

## Abstract

The essential, ubiquitin-selective ATPase p97 regulates a variety of cellular processes in eukaryotes. Among others, these include protein quality control, DNA-repair, signal-transduction, cell cycle control, autophagy and the endolysosomal system. The distinct functions of p97 are tightly controlled by regulatory cofactors. UBX domain-containing proteins are the largest and best studied group of p97 cofactors. They are characterized by a UBX domain, which mediates binding to p97. The family-member UBXD1 is highly conserved in higher eukaryotes and possesses at least two additional p97 binding modules, a PUB domain and a VIM motif. While UBXD1 can localize to vesicles of the endolysosomal degradation system, its exact cellular function is still poorly understood.

The aim of this study was the functional characterisation of human UBXD1. To that end, candidates of a previous yeast two-hybrid screen were tested for their two-hybrid interaction with different UBXD1 variants. Immunoprecipitation experiments were used to analyse if the candidates also interact with UBXD1 in mammalian cells. This led to the identification of the ubiquitin-ligase TRIAD3A and the ubiquitin-editing protein A20 as promising new binding partners of UBXD1. Moreover, it could be demonstrated that the interaction between UBXD1 and A20 depends on a functional PUB domain and the seventh zinc finger motif of A20.

Because both TRIAD3A and A20 are negative regulators of the NF- $\kappa$ B signaling pathway, it was subsequently tested if UBXD1 also has a function in NF- $\kappa$ B signaling. Indeed, UBXD1-depleted HeLa 57A cells showed a strongly reduced NF- $\kappa$ B dependent expression of a reporter gene after activation of the signaling pathway by TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Doxorubicin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The reduced activity observed after various stimuli argues for a general role of UBXD1 in the NF- $\kappa$ B signaling pathway. Quantitative real-time PCR demonstrated that the expression of endogenous NF- $\kappa$ B target genes in HeLa and HEK293T cells was also reduced upon UBXD1-depletion. Since the nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B subunit p65 upon stimulation with TNF $\alpha$  or IL-1 $\beta$  was also reduced in UBXD1-depleted cells, UBXD1 is likely to participate in an earlier phase of NF- $\kappa$ B activation. It is possible that UBXD1 regulates a known function of A20 and influences for example the binding of A20 to endocytic vesicles or to linear ubiquitin chains. In summary, this work describes a novel function of the p97 cofactor UBXD1 as a positive regulator of the NF- $\kappa$ B signaling pathway.

## 2 Einleitung

### 2.1 Signaltransduktion in Eukaryoten

Signaltransduktion umfasst sequenzielle, molekulare Prozesse in einer Zelle, die dazu führen, dass externe Signale zu einer funktionellen Änderung innerhalb der Zelle führen oder dazu beitragen. Signaltransduktion ist sowohl für die einzelne Zelle als auch für die Entwicklung und das Überleben von Metazoen essenziell. Signale werden erkannt, amplifiziert und zusammengefasst, um so eine spezifische Antwort der Zelle hervorzurufen. Neben chemischen Signalen wie Hormonen, Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen (Arvanitakis et al., 1998) können die initialen Reize auch z.B. aus Photonen oder mechanischen Kräften bestehen (Arvanitakis et al., 1998; Kaazempur Mofrad et al., 2005). Am Ende der Signalkaskade kann die gezielte Expression von bis zu 1000 aktivierten Genen, aber auch Änderungen von Enzym-Aktivitäten stehen (Vert und Chory, 2011). Rezeptoren für Signalmoleküle können unterschiedlich innerhalb der Zelle lokalisiert sein. Lipophile Liganden wie Steroidhormone und Retinoide oder lösliche gasförmige Stoffe passieren die Zellmembran und binden an Rezeptoren im Cytoplasma oder im Zellkern (Falkenstein et al., 2000). Hydrophile Signalmoleküle binden hingegen an Rezeptoren in der Zellmembran. Diese membranständigen Rezeptoren übertragen nach Bindung der Liganden Signale von der extrazellulären Seite in das Innere der Zelle. Zu den Rezeptoren gehören Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (Panyi et al., 2014), Enzym-gekoppelte Rezeptoren wie Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) (Mirshafiey et al., 2014) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) (Offermanns, 2003).

Auf molekularer Ebene gibt es einige Grundprinzipien der Signaltransduktion, die sich in den unterschiedlichen Signalwegen wiederfinden. Typisch für die den GPCRs nachgeschalteten Signalkaskaden sind sekundäre Botenstoffe: chemische Substanzen, die konzentrationsabhängig das Ausgangssignal amplifizieren und unterschiedliche andere Mitglieder der Signalkaskade steuern können (Clister et al., 2015). Beispiele hierfür sind cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>), Diacylglycerol (DAG) und Ca<sup>2+</sup> (Clister et al., 2015). So führt die Stimulation von unterschiedlichen GPCRs zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in IP<sub>3</sub> und DAG spaltet (Mikoshiba, 2007). IP<sub>3</sub> bindet dann an seine Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum (ER), was wiederum zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> führt, und DAG aktiviert die Protein Kinase C (PKC) (Mikoshiba, 2007). Bei der Signaltransduktion nach RTKs werden viele Proteine durch Phosphorylierung gesteuert. Dies erfolgt schon direkt am Rezeptor. Bindung des Liganden an eine RTK führt zu einer Stabilisierung des Rezeptors in seiner aktiven Form, die oft aus

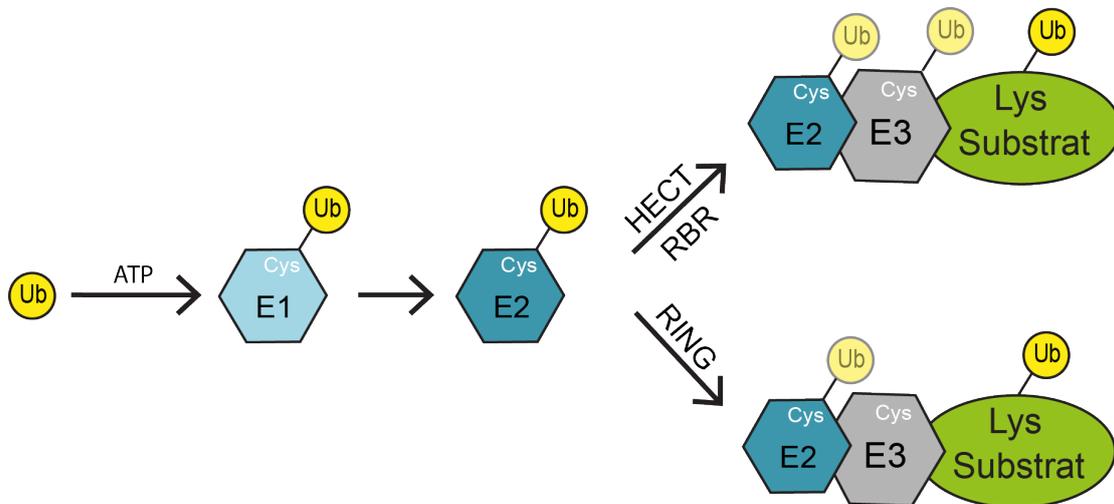
einem Rezeptoren-Dimer oder -Oligomer besteht (Lemmon und Schlessinger, 2010). In den meisten Fällen führt diese räumliche Nähe zu einer *trans*-Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten und damit zur Aktivierung der Signalkaskade (Hubbard und Miller, 2007). Die Signalkaskade selbst kann ebenfalls unterschiedliche Phosphorylierungsschritte einschließen wie es z.B. bei der Aktivierung eines MAP(*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalweges der Fall ist. Diese Signalwege umfassen mindestens drei Kinasen, die sich gegenseitig nacheinander durch Phosphorylierung aktivieren (Chang und Karin, 2001). Neben der Phosphorylierung spielt auch die Ubiquitinierung von Proteinen eine zentrale Rolle in vielen Signalwegen.

## 2.2 Das Ubiquitin-System

Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes, in allen Eukaryoten konserviertes Protein. Durch kovalente Verknüpfung an Zielproteine beeinflusst es deren Stabilität, zelluläre Lokalisation oder Funktion (Wertz und Dixit, 2010; Behrends und Harper, 2011).

Für die Modifikation mit Ubiquitin wird eine Kaskade von drei Enzymen benötigt: ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym E1, ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 und eine Ubiquitin-Ligase E3 (Ye und Rape, 2009; Wertz und Dixit, 2010; Berndsens und Wolberger, 2014) (Abb. 1). Im ersten Schritt wird in einer ATP-abhängigen Reaktion zwischen dem katalytischen Cysteinrest des E1 und dem C-Terminus von Ubiquitin eine energiereiche Thioester-Bindung gebildet (Schulman und Harper, 2009). Anschließend wird das aktivierte Ubiquitin durch eine Transesterifizierung auf den katalytischen Cysteinrest eines von über 30 E2-Enzymen übertragen (Ye und Rape, 2009) (Abb. 1). Als nächstes wird das Ubiquitin durch E3-Ubiquitin-Ligasen auf einen Lysinrest des Substrates oder eines anderen Ubiquitinmoleküls transferiert (Vittal et al., 2015) (Abb. 1). E3-Ubiquitin-Ligasen vermitteln letztendlich die Substratspezifität der Kaskade (Karin und Ben-Neriah, 2000; Li et al., 2008b). Die über 600 humanen E3-Ubiquitin-Ligasen lassen sich in drei unterschiedliche Familien einteilen: HECT (*Homologous To E6AP Carboxy Terminus*)-E3s, RING (*Really Interesting New Gene*)-E3s, die auch die topologisch verwandten U-Box-E3s beinhalten, und RBR (*RING Between RING*)-E3s (Berndsens und Wolberger, 2014; Vittal et al., 2015). Die Familien unterscheiden sich voneinander vor allem durch ihren Übertragungsmechanismus (Abb. 1). RING-E3-Ligasen binden sowohl das Substrat als auch den E2-Ubiquitin-Thioester gleichzeitig und bringen sie so in räumliche Nähe zueinander, um den Transfer des Ubiquitinmoleküls zu katalysieren (Berndsens und Wolberger, 2014; Vittal et al., 2015). Bei HECT- und RBR-E3-Ligasen wird das

Ubiquitin vom E2 auf das aktive Cystein des E3s und anschließend auf das Substrat übertragen (Berndsen und Wolberger, 2014) (Abb. 1)



**Abbildung 1: Das Ubiquitin-Konjugations-System.** Ubiquitin (Ub) wird in einer ATP-verbrauchenden Reaktion vom Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1 (E1) aktiviert. Danach wird es auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 (E2) und mit Hilfe einer Substratspezifität-vermittelnden Ubiquitin-Ligase E3 (E3) auf das Substrat (Substrat) übertragen. Während dieser Kaskade wird das Ubiquitin an die katalytischen Cystein-Reste (Cys) vom E1, E2 und E3 oder Lysin-Reste (Lys) des Substrates gebunden.

Substrate können sowohl durch einzelne Ubiquitinmoleküle, als auch durch Polyubiquitinketten, bei denen ein Ubiquitin mit einem anderen verknüpft wird, modifiziert werden (Ye und Rape, 2009). Diese Verknüpfung kann an einen der sieben Lysinreste (K) 6, 11, 27, 29, 33, 48 und 63 erfolgen oder aber an das N-terminale Methionin (M) (Wertz und Dixit, 2010). Je nach Verknüpfung können auch mehrfach verzweigte Polyubiquitinketten entstehen (Ye und Rape, 2009). Polyubiquitinketten, bei denen die Verknüpfung über K48 erfolgt, sind eine Markierung für den proteasomalen Abbau des Substrates (Chau et al., 1989). Dabei gelangen ubiquitinierte Substrate zum 26S Proteasom, einem 2,5 MDa-großen, zylinderförmigen Proteinkomplex mit proteolytischer Aktivität. Das 26S Proteasom setzt sich aus einem 20S Partikel und einem oder zwei regulatorischen 19S Kappen zusammen (Adams, 2003). Die 19S Kappen können die Polyubiquitinketten der Substrate binden und sie abspalten (Adams, 2003). Das Substrat wird dann durch ATPasen der 19S Kappen entfaltet und in den 20S Partikel geschleust (Zwickl et al., 1999). Der 20S Partikel besteht aus vier Ringen, die aus je sieben  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehen. Die  $\beta$ -Untereinheiten sind proteolytisch aktiv und spalten entfaltete Substratproteine in kurze Peptide von acht bis zehn Aminosäureresten (Pickart und Cohen, 2004).

K11-verknüpfte Polyubiquitinketten dienen vor allen als Signal für den proteasomalen Abbau von Zellzyklusproteinen (Ye und Rape, 2009), sind aber auch an Faktoren

des NF- $\kappa$ B-Signalweges nachweisbar, wo sie als Plattform zur Rekrutierung anderer Proteine fungieren (Iwai, 2012). K63-verknüpfte Ketten spielen häufig eine Rolle in DNA-Reparaturprozessen, im NF- $\kappa$ B-Signalweg oder im lysosomalen Proteinabbau (Ye und Rape, 2009).

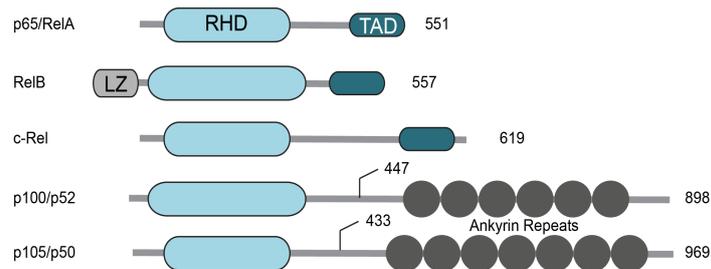
Die Markierung von Substraten mit Monoubiquitin erfolgt häufig bei Histonen und in den Prozessen der Endocytose und der Knospung von Retroviren aus der Plasmamembran (Hicke, 2001).

Da die Markierung mit Ubiquitin als temporäres Signal dient, muss dieser Prozess auch rückgängig gemacht werden können. Polyubiquitinketten werden vor dem Abbau des Substrates durch das 26S Proteasom entfernt und so dem intrazellulären Pool wieder zugeführt (Adams, 2003). Zusätzlich kann aber auch unabhängig vom proteasomalen Abbau ein Substrat dadurch reguliert werden, dass es de-ubiquitiniert wird. Die Abspaltung von Ubiquitin geschieht durch spezielle Proteasen, sogenannten Deubiquitinasen (DUBs). Die etwa 100 menschlichen DUBs lassen sich in fünf Familien einteilen: UCHs (*Ubiquitin Carboxyl Hydrolases*), USPs (*Ubiquitin Specific Proteases*), OTU (*Ovarian Tumor Domain*)-DUBs, MJD (*Machado-Joseph Disease*)-DUBs und JAMMs (*Jab1/Mov34/Mpr1*) (Wertz und Dixit, 2010). Dabei zeigen DUBs meistens eine Präferenz für bestimmte Verknüpfungsarten in Polyubiquitinketten (Clague et al., 2012).

### 2.3 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg

Der NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor- $\kappa$  B*)-Signalweg ist an essenziellen zellulären Vorgängen wie Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung sowie Immun- und Entzündungsantworten beteiligt (Bonizzi und Karin, 2004; Hayden und Ghosh, 2004; Oeckinghaus und Ghosh, 2009). Die am stärksten evolutionär konservierte Rolle hat dieser Signalweg im Immunsystem, ist aber auch in anderen Zelltypen von Bedeutung (Hayden und Ghosh, 2008). Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges kann durch unterschiedliche Zytokine, durch Liganden von Antigen-Rezeptoren, aber auch durch mikrobielle oder virale Infektionen und genotoxischen Stress erfolgen (Oeckinghaus und Ghosh, 2009; O'Dea und Hoffmann, 2010). Unterschiedliche Krankheiten wie Allergien, Autoimmunkrankheiten, Asthma, Muskeldystrophie und Krebs werden mit abnormaler Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges in Verbindung gebracht (Acharyya et al., 2007; Hayden und Ghosh, 2008; Staudt, 2010; Iwai, 2012).

In der Familie der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren fasst man die fünf Proteine p65 (auch RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 und p52/p100 zusammen (Bonizzi und Karin,



**Abbildung 2: Schematische Übersicht über die Familie der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren.** Schematische Übersicht der fünf Mitglieder der Familie der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren. Die Anzahl der Aminosäuren ist rechts angegeben. Zusätzlich ist bei den Proteinen p100/p52 (Aminosäure 447) und p105/p50 (Aminosäure 433) die Spaltungsstelle angegeben, die zur Bildung des aktiven bzw. reifen Transkriptionsfaktors führt. RHD=Rel Homology Domain, TAD= Transkriptionsaktivierungsdomäne, LZ=Leucin-Zipper-Domäne (modifiziert nach Hayden und Ghosh, 2004)

2004; Hayden und Ghosh, 2004, 2008) (Abb. 2). Sie können unterschiedliche Kombinationen von Homo- und Heterodimeren bilden. Zwei Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren werden als inaktive Vorgängerproteine exprimiert, die proteolytisch prozessiert werden. Dabei erfolgt die Prozessierung von p105 zu p50 konstitutiv, während die

Prozessierung von p100 zu p52 von der Stimulation des Signalweges abhängig ist (Oeckinghaus und Ghosh, 2009). Alle Mitglieder der Familie haben eine konservierte Region im N-Terminus, die RHD (*Rel Homology Domain*) (Hayden und Ghosh, 2008; Oeckinghaus und Ghosh, 2009). Sie vermittelt neben der Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren auch die DNA-Bindung; außerdem liegt in ihr eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) (Bonizzi und Karin, 2004; Hayden und Ghosh, 2004). Für die Aktivierung der Genexpression wird die Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD) benötigt (Schmitz und Baeuerle, 1991), die nur im C-Terminus von p65, RelB und c-Rel vorhanden ist (Hayden und Ghosh, 2004). Ein Homodimer von p50 führt daher durch das Fehlen der TAD zu einer Unterdrückung der Transkription der Zielgene (Grundstrom et al., 2004; Cheng et al., 2011).

Vorrangig wird der NF- $\kappa$ B-Signalweg in den kanonischen und den nicht-kanonischen Aktivierungsweg unterteilt, wobei das wesentliche Unterscheidungsmerkmal die jeweils beteiligten Transkriptionsfaktoren sind (Hayden und Ghosh, 2004). Der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert p50, das meistens als Dimer mit p65 oder c-Rel vorliegt, während beim nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg p100 zu p52 prozessiert wird, das seinerseits vorzugsweise mit RelB dimerisiert (Morgan und Liu, 2011). Im kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg wird im nicht-aktivierten Zustand das Transkriptionsfaktor-Dimer von Inhibitoren, sogenannten I $\kappa$ B (*Inhibitor of NF- $\kappa$ B*)-Proteinen, gebunden und dadurch die NLS verdeckt (Baeuerle und Baltimore, 1988; Malek et al., 1998). Das inaktive Transkriptionsfaktor-Dimer befindet sich somit im Cytoplasma. Nach Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges werden die I $\kappa$ B-Proteine abgebaut und es kommt zur Kerntranslokation der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren (Alkalay et al., 1995; Scherer et al., 1995). Im Kern binden die Transkriptionsfaktor-Dimere über die RHD spezifisch an ein  $\kappa$ B-Sequenzmotiv in den Promotoren oder Enhancern unterschiedlicher Zielgene und aktivieren so deren Expression (Chen et

al., 1998; Hayden und Ghosh, 2004). Das  $\kappa$ B-Sequenzmotiv lautet 5'-GGGRNYYYCC-3' (G=Guanin, C=Cytosin, Y=eine Pyrimidinbase, R=eine Purinbase, N=alle Basen) (Chen et al., 1998; Chen und Greene, 2004; Wan und Lenardo, 2009).

Im nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg liegt meist ein Heterodimer aus p100 und RelB vor (Bonizzi und Karin, 2004; Gardam und Brink, 2014). Dabei wirkt p100 gleichzeitig als Inhibitor-Protein, da es die NLS des reifen Transkriptionsfaktor-Dimers maskiert und es dadurch im Cytoplasma hält (Oeckinghaus und Ghosh, 2009; Iwai, 2012). Die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges führt zu einer Prozessierung von p100 zum aktiven p52 (Xiao et al., 2001); ein Teil des C-Terminus wird dabei durch das 26S Proteasom abgebaut (Hayden und Ghosh, 2004). Dadurch wird die NLS frei erkennbar, das p52/RelB-Dimer kann in den Zellkern gelangen und dort an die DNA binden

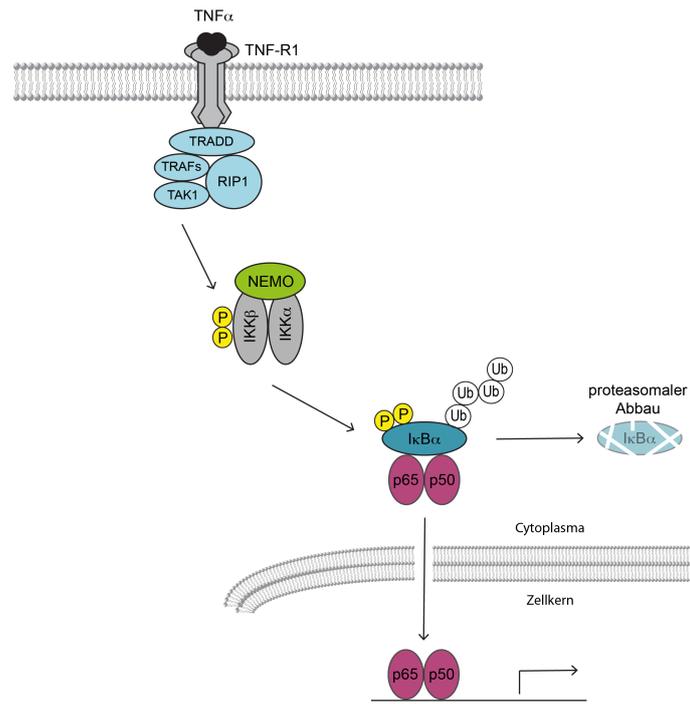
Der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg wird über den TNF $\alpha$ -Rezeptor TNF-R1, den IL-1 $\beta$ -Rezeptor IL1R1, Toll-like Rezeptoren (TLR), den B-Zell-Rezeptor und den T-Zell-Rezeptor aktiviert (Hayden und Ghosh, 2004; Oeckinghaus und Ghosh, 2009). Er ist somit vor allem in der Entstehung der Entzündungsreaktion und im angeborenen Immunsystem wichtig (Bonizzi und Karin, 2004). Der nicht-kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg wird unter anderem durch den CD40-Rezeptor, Lymphotoxin  $\beta$ -Rezeptoren (LT $\beta$ R), den B-Zell-Aktivierungsfaktor-Rezeptor und den Rezeptoraktivator von NF- $\kappa$ B (RANK) aktiviert (Bonizzi und Karin, 2004; Hayden und Ghosh, 2004). Dieser Signalweg spielt vor allem eine wichtige Rolle in der lymphatischen Organogenese und der adaptiven Immunantwort (Bonizzi und Karin, 2004).

### 2.3.1 Der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg

#### 2.3.1.1 Die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch TNF $\alpha$

Das Zytokin TNF $\alpha$  bindet in trimerer Form an den TNF-Rezeptor TNF-R1 (Idriss und Naismith, 2000; Liu et al., 2012), was zu einer Trimerisierung des Rezeptors führt (Brazil, 2006). Dadurch dissoziiert der Inhibitor SODD (*Silencer Of Death Domain*) vom Rezeptor, wodurch TRADD (*TNFR-Associated Death Domain Protein*) an seiner Stelle binden kann (Jiang et al., 1999). TRADD wiederum rekrutiert weitere wichtige Proteine in den *signaling*-Komplex an den Rezeptor. Dazu gehören die Kinase RIP1 und Mitglieder der TRAF (*TNF-Receptor-Associated Factor*)-Familie von Ubiquitin-E3-Ligasen (Hayden und Ghosh, 2004) (Abb. 3). Mitglieder dieser Familie

zeichnen sich durch eine etwa 80 Aminosäurereste große C-terminale TRAF-Domäne aus (Rothe et al., 1994). Besonders gut belegt ist eine Rekrutierung von TRAF2 in den *signaling*-Komplex (Wajant und Scheurich, 2001). Allerdings kann ein Verlust von TRAF2 durch das nahe verwandte TRAF5 kompensiert werden, da nur die Depletion von beiden Proteinen zu einer beeinträchtigten Aktivierung des  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten



NF- $\kappa$ B-Signalweges führt (Tada et al., 2001). RIP1 ist ein essenzieller Faktor der NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die Kinase-Aktivität wird dafür allerdings nicht benötigt (Ting et al., 1996; Devin et al., 2000).

**Abbildung 3: Schematische Repräsentation des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$ .** Nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  werden TRADD, Mitglieder der TRAF-Familie, TAK1 und RIP1 in den *signaling*-Komplex am Rezeptor (TNF-R1) rekrutiert. Dies führt zur Aktivierung des IKK-Komplexes (bestehend aus NEMO, IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ ), der I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoryliert. Nach folgender Ubiquitinierung wird I $\kappa$ B $\alpha$  durch das Proteasom abgebaut und der Transkriptionsfaktor-Dimer gelangt in den Zellkern und bindet an die DNA.

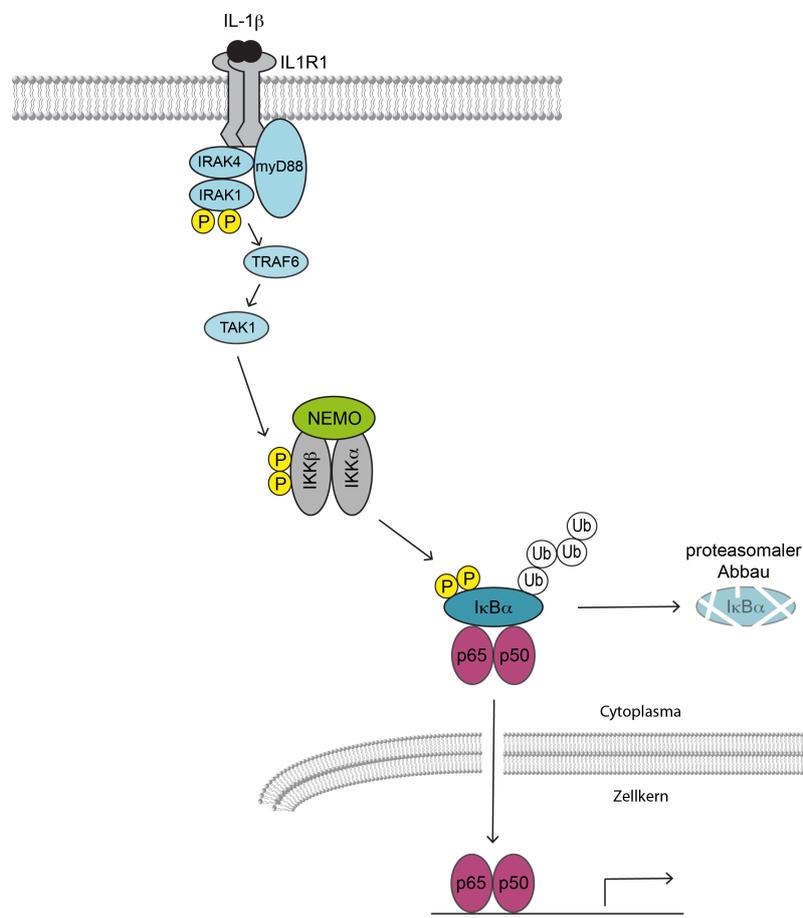
TAB2 und TAB3 werden ebenfalls in den *signaling*-Komplex gebunden (Kanayama et al., 2004; Iwai, 2012). Dieses führt direkt zu der Rekrutierung der TAK1-Kinase (Abb. 3), einem weiteren essenziellen Faktor der NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Sato et al., 2005; Skaug et al., 2009). Außerdem kann RIP1 von NEMO (*NF- $\kappa$ B Essential Modulator*), der regulatorische Untereinheit des I- $\kappa$ B Kinase (IKK)-Komplexes, gebunden werden (Ea et al., 2006). Der IKK-Komplex besteht neben NEMO noch aus den beiden Kinase-Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  (Hayden und Ghosh, 2008; Oeckinghaus und Ghosh, 2009) (Abb. 3). TAK1 phosphoryliert IKK $\beta$  an Serin 177, was wiederum zur Autophosphorylierung von IKK $\beta$  an Serin 181 führt (Zhang et al., 2014). Die Aktivierung des IKK-Komplexes führt dazu, dass dieser die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an den Serinresten 32 und 36 katalysiert (Chen et al., 1995; Hayden und Ghosh, 2004; Oeckinghaus und Ghosh, 2009) (Abb. 3). Diese Phosphorylierung dient wiederum als Erkennungs-Signal für den E3-Ubiquitinligase-Komplex  $\text{SCF}^{\beta\text{-TrCP}}$ , der I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitiniert (Yaron et al., 1998; Kanarek und Ben-Neriah, 2012). Anschließend wird I $\kappa$ B $\alpha$  durch das 26S Proteasom abgebaut und dadurch das Transkriptionsfaktoren-Dimer freigesetzt (Palombella et al., 1994; Hayden und Ghosh, 2004; Skaug et al., 2009; Iwai, 2012) (Abb. 3). Durch die

Exposition der NLS erfolgt die Translokation des Transkriptionsfaktoren-Dimers in den Zellkern, wo es die Transkription der NF- $\kappa$ B-Zielgene anregt (Chen und Greene, 2004; Wan und Lenardo, 2009) (Abb. 3). Der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  wird innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges mit TNF $\alpha$  initiiert (Karin und Ben-Neriah, 2000), wodurch es zu einer schnellen Anpassung der Genexpression kommt. Unter den Zielgenen befinden sich auch einige, die für unterschiedliche Inhibitoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges kodieren (Hayden und Ghosh, 2004; Kanarek und Ben-Neriah, 2012). So kommt es durch die Transkription des für I $\kappa$ B $\alpha$ -kodierende Gen *NFKBIA* zu einer negativen Rückkopplung des aktivierten Signalweges (Le Bail et al., 1993). Das neu synthetisierte I $\kappa$ B $\alpha$  transloziert in den Zellkern, bindet dort wieder den Transkriptionsfaktor-Dimer und der Komplex wird anschließend durch eine nukleäre Exportsequenz (NES) im C-Terminus von I $\kappa$ B $\alpha$  vermittelt zurück ins Cytoplasma transportiert (Ganchi et al., 1992; Arenzana-Seisdedos et al., 1995; Arenzana-Seisdedos et al., 1997).

#### 2.3.1.2 Die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch IL-1 $\beta$

Wichtig für die Signaltransduktion nach Bindung von IL-1 $\beta$  an seinen Rezeptor IL1R1 ist die Interaktion von Proteinen der Signalkaskade mit der Toll-IL-1R-(TIR)-Domäne des Rezeptors (Hayden und Ghosh, 2004). Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Rekrutierung mehrerer cytosolischer Adaptoren, die ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen (Hayden und Ghosh, 2004). Eines der ersten Proteine, die in den *signaling*-Komplex gebunden werden, ist MyD88 (*myeloid differentiation primary gen 88*) (Abb. 4). MyD88 ist essenziell für die weitere Signalkaskade im IL-1 $\beta$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg (Adachi et al., 1998), nicht jedoch für den TNF $\alpha$ -induzierten Signalweg (Wesche et al., 1997). Seine Funktion entspricht der Funktion von TRADD während der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach Stimulation mit TNF $\alpha$  (Wesche et al., 1997). Über seine N-terminale *death domain* rekrutiert MyD88 die Serin/Threonin-Kinasen IRAK1 und IRAK4 (Loiarro et al., 2009) (Abb. 4). Ähnlich wie für RIP1 ist die Kinaseaktivität von IRAK1 nicht essenziell für die weitere Signalkaskade (Knop und Martin, 1999). In unstimulierten Zellen liegt IRAK1 gebunden an das Adaptorprotein Tollip im Cytosol vor, wodurch es nicht phosphoryliert werden kann (Burns et al., 2000). Nach Aktivierung des IL1R1 wird IRAK1 phosphoryliert (Abb. 4), was seine Affinität zu Tollip verringert und zu Myd88 erhöht (Dunne und O'Neill, 2003). Im weiteren Verlauf wird IRAK1 hyperphosphoryliert (Abb. 4), wodurch es sich wieder aus dem *signaling*-Komplex löst und im Cytosol mit TRAF6 interagiert (Dunne und O'Neill, 2003). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von IRAK1 an Thr387 und Ser376 durch IRAK4 erfolgen kann (Li et al., 2002a). Die Interaktion zwischen IRAK1 und TRAF6

ist wichtig für die weitere Aktivierung des Signalweges (Dunne und O'Neill, 2003). TRAF6 interagiert dann mit TAB2, was zur Aktivierung der TAK1-Kinase führt (Takaesu et al., 2000). Dabei transloziert membrangebundenes TAB2 ins Cytosol (Qian et al., 2001; Takaesu et al., 2001). TAB2 erfüllt die Rolle eines Adapters, der TRAF6 zu der TAK1-Kinase und TAB1 rekrutiert (Dunne und O'Neill, 2003). Dies führt zur Aktivierung von TAK1 (Abb. 4), wobei der genaue molekulare Mechanismus unklar ist (Besse et al., 2007). Wie nach  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation ist die Aktivierung der TAK1-Kinase ein essenzieller Schritt zur Aktivierung des IKK (Besse et al., 2007). Der weitere Verlauf der Phosphorylierung von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  durch den aktivierten IKK (Abb. 4), die darauf folgende Ubiquitinierung und der proteasomale Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  erfolgen wie beim  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten NF- $\kappa\text{B}$ -Signalweg.



**Abbildung 4: Schematische Repräsentation des kanonischen NF- $\kappa\text{B}$ -Signalweges nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ .** Nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  werden Myd88, IRAK1 und IRAK4 in den *signaling*-Komplex am Rezeptor (IL1R1) rekrutiert. Dies führt zur Aktivierung von IRAK1 und damit zur Aktivierung von TRAF6 und TAK1. TAK1 aktiviert den IKK-Komplex (bestehend aus NEMO, IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ ), der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  phosphoryliert. Nach folgender Ubiquitinierung wird  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  durch das Proteasom abgebaut und der Transkriptionsfaktor-Dimer gelangt in den Zellkern und bindet an die DNA.

### 2.3.1.3 Die atypische Aktivierungen des NF- $\kappa$ B-Signalweges

Zusätzlich zu den gut beschriebenen Wegen über Rezeptor-bindende Liganden gibt es weitere Mechanismen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. So wurden Stimuli wie DNA-Schäden oder oxidativer Stress als atypische Aktivierung zusammengefasst (Janssens und Tschopp, 2006). Es stellte sich jedoch heraus, dass sich die Signalkaskaden, die hierbei zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges führen, teilweise stark voneinander unterscheiden. So führt UV-Bestrahlung und ein Teil der p53-induzierten Aktivierung zu einer IKK-unabhängigen Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges, während die meisten anderen genotoxischen Substanzen eher dem klassischen Aktivierungsablauf über IKK folgen (Janssens und Tschopp, 2006).

Die Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden ist komplex. Dass dabei u.a. der NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert wird, ist schon lange beschrieben (Brach et al., 1991). Bei vielen unterschiedlichen Ursachen von DNA-Schäden, wie  $\gamma$ -Strahlung, Camptothecin und Doxorubicin wurde gezeigt, dass die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges über die nukleäre Kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) läuft (Janssens und Tschopp, 2006). Die Aktivierung der ATM erfolgt dabei über den Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex (Lee und Paull, 2007). Dann phosphoryliert ATM nukleäres NEMO an Serin 85 (Wu et al., 2006b). Zusätzlich aktiviert PARP1 die Komplexbildung von NEMO, der Sumo-Ligase PIAS $\gamma$  und ATM, was zu einer Sumoylierung von NEMO an den Lysin 277 und 309 führt (Stilmann et al., 2009). Da die Interaktion zwischen PIAS $\gamma$  und NEMO eine gleichzeitige Interaktion zwischen IKK $\beta$  und NEMO ausschließt und nur wenig IKK $\beta$  im Kern vorhanden ist, geht man davon aus, dass der Anteil von NEMO im Zellkern nicht im Komplex mit den restlichen IKK-Komponenten vorliegt (Mabb et al., 2006). Mutationen in K277 und K309 führen dazu, dass DNA-Schäden nicht mehr den NF- $\kappa$ B-Signalweg aktivieren können, während der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg von diesen Mutationen nicht betroffen ist (McCool und Miyamoto, 2012). Die Phosphorylierung von nukleären NEMO dient als Signal für eine Monoubiquitinierung (Wu et al., 2006b), die zusammen mit der Sumoylierung zu einem Kern-Export eines NEMO-ATM-Komplexes führt (McCool und Miyamoto, 2012). Das cytoplasmatische ATM aktiviert dann den TAB1-TAB2-TAK1-Kinase-Komplex. Da der genaue molekulare Mechanismus noch nicht aufgeklärt wurde, wurden bis jetzt mehrere Möglichkeiten vorgeschlagen. So wurde postuliert, dass die Aktivierung über die Ubiquitin-E3-Ligase XIAP verläuft, die direkt an TAB1 binden kann (Lu et al., 2007; Jin et al., 2009). Andere Arbeiten zeigen eine Aktivierung über ELKS, dessen Interaktion mit TAK1 abhängig von ATM und NEMO ist (Ducut Sigala et al., 2004; Wu et al., 2010). Weitere Studien zeigen eine Abhängigkeit von TRAF6 (Hinz et al., 2010) oder RIP1 (Yang et al., 2011). Letztendlich aktiviert der TAB1-TAB2-TAK1-

Komplex dann IKK, was wiederum zum proteasomalen Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  und Kerntranslokation von p65 führt (McCool und Miyamoto, 2012).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, für *Reactive Oxygen Species*) können bei zu hohen Konzentrationen schädlich für die Zelle sein. Je nach Zelltyp und schon entstandenem zellulären Schaden können ROS dazu führen, dass eine Zelle entweder apoptotisch oder nekrotisch wird, oder dass über den NF- $\kappa$ B-Signalweg Gene aktiviert werden, die das Überleben der Zelle fördern (Morgan und Liu, 2011). Einige Zielgene des NF- $\kappa$ B-Signalweges wie die Superoxiddismutasen SOD1 und SOD2 oder die Oxidoreduktasen Trx1 und Trx2 haben antioxidative Funktion und schützen so die Zelle vor Schäden durch ROS (Morgan und Liu, 2011). Da in Experimenten häufig  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Aktivierung NF- $\kappa$ B-Signalweges benutzt wird, wurde durch vergleichende Studien festgestellt, dass die Signaltransduktion gerade hier in verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedlich verläuft (Gloire et al., 2006). In HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte NF- $\kappa$ B-Signalweg über die Aktivierung der Protein Kinase D (PKD) gesteuert wird (Storz und Toker, 2003). Dabei wird das Tyrosin 463 der PKD durch die Tyrosin-Kinase Abl phosphoryliert (Storz und Toker, 2003; Storz et al., 2004). Die dadurch folgende Phosphorylierung in dem *activation loop* der PKD durch die Protein Kinase  $\text{C}\delta$  (Storz et al., 2004) führt dann zur Aktivierung des IKK und damit zum proteasomalen Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Gloire et al., 2006).

Beide beschriebene Wege zur Aktivierung des atypischen NF- $\kappa$ B-Signalweges resultieren wie der kanonische NF- $\kappa$ B-Signalweg in einer Aktivierung des IKK und damit im Abbau von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  durch das Proteasom, was schlussendlich zur Translokation von p65 führt. Mit Ausnahme des ROS-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweges erfolgt die Aktivierung von IKK in Abhängigkeit von TAK1 (Morgan und Liu, 2011).

### 2.3.2 Die Rolle von Ubiquitin im NF- $\kappa$ B-Signalweg

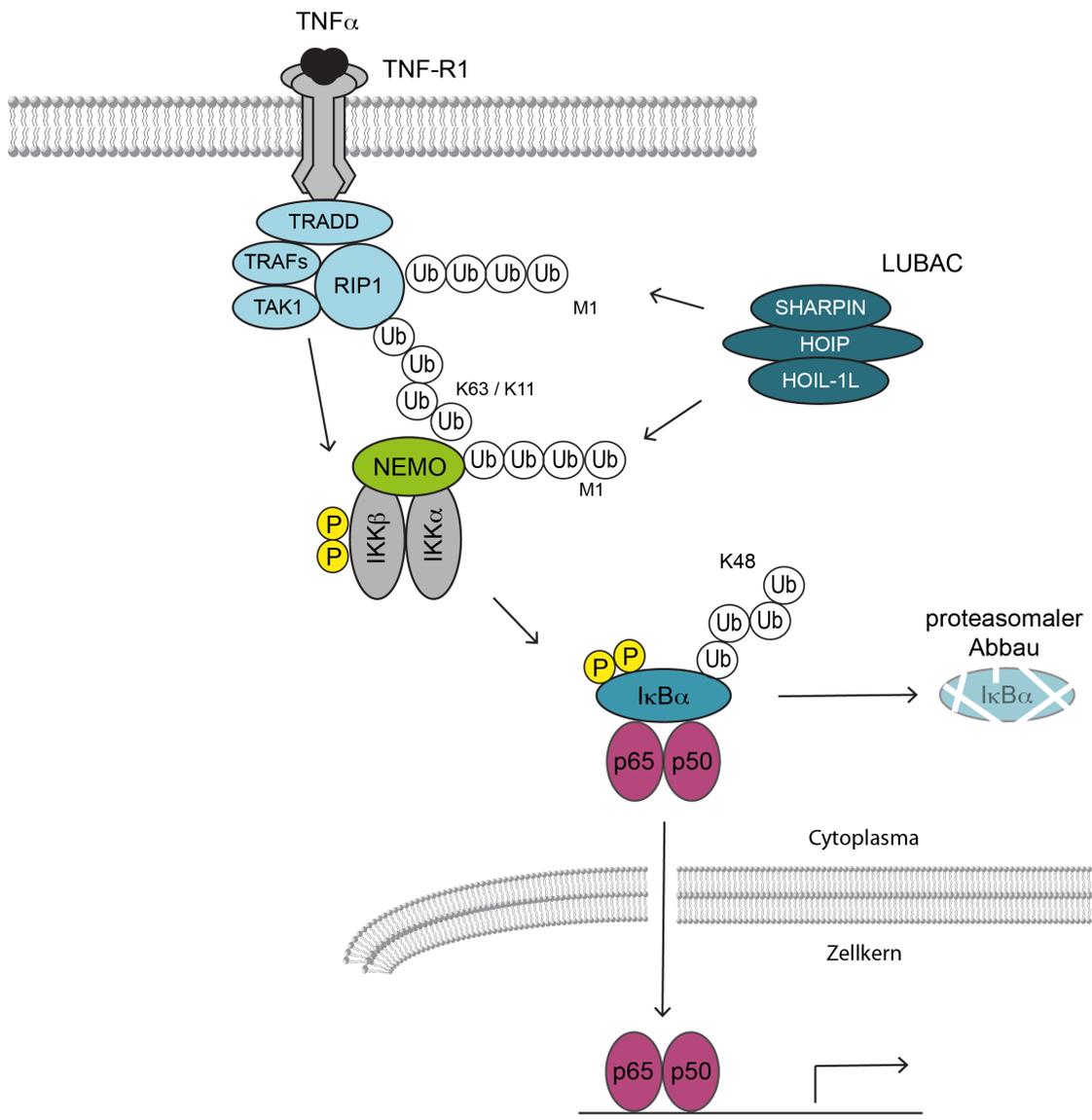
Während der Signaltransduktion im NF- $\kappa$ B-Signalweg kommt es bei mehreren Schritten zur Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin. Die Markierung von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  durch K48-verknüpftes Ubiquitin und der danach folgende Abbau durch das Proteasom ist Voraussetzung für die Freisetzung und Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern und die damit verbundene Aktivierung der Genexpression (Hayden und Ghosh, 2004; Skaug et al., 2009; Iwai, 2012) (Abb. 5). K48-verknüpfte Polyubiquitin-Ketten sind also auch im NF- $\kappa$ B-Signalweg ein Signal für den proteasomalen Abbau.

Besonders erwähnenswert ist, dass für den NF- $\kappa$ B-Signalweg zum ersten Mal das Vorkommen von linearen Ubiquitinketten beschrieben worden ist (Tokunaga et al., 2009; Ikeda et al., 2011). Bei diesem Kettentyp kommt es zu einer Verknüpfung des C-terminalen Glycins eines Ubiquitins mit der N-terminalen  $\alpha$ -Gruppe des Methionins eines anderen Ubiquitins (Iwai, 2012; Iwai et al., 2014). Lineare Ubiquitinketten werden durch den E3-Ligase-Komplex LUBAC (*Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex*) generiert, der aus HOIL-1L (*Heme-Oxidized IRP2 Ubiquitin Ligase 1L*), SHARPIN (*SHANK-Associated RH Domain-Interacting Protein*) und der katalytischen Untereinheit HOIP (*HOIL-1L Interacting Protein*) besteht (Kirisako et al., 2006; Gerlach et al., 2011; Ikeda et al., 2011; Iwai et al., 2014). LUBAC spielt eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach Stimulation mit TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und CD40L (Tokunaga et al., 2009; Gerlach et al., 2011). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Maus-B-Zellen, denen die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von LUBAC fehlt, auch eine Beeinträchtigung in der Entwicklung und Funktionalität der B-Zellen zeigen (Sasaki et al., 2013). Neben der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges ist auch die des ERK-Signalweges in diesen Zellen reduziert, was ein Hinweis darauf ist, dass lineare Ubiquitinketten auch an anderen Signalwegen beteiligt sind (Sasaki et al., 2013). Nach Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges katalysiert LUBAC die Modifizierung der Lysinreste 285 und 309 in der CC2-Leuzin-Zipper-Domäne von NEMO mit linearen Ubiquitinketten (Tokunaga et al., 2009) (Abb. 5). Dies ist neben der Phosphorylierung von IKK $\beta$  ein essenzieller Schritt für die Aktivierung des IKK (Schmid und Birbach, 2008; Tokunaga et al., 2009; Chen, 2012). Neben NEMO wird auch RIP1 mit linearen Ubiquitinketten modifiziert (Gerlach et al., 2011) (Abb. 5). Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von LUBAC zu einem proteasomalen Abbau des Modellsubstrates Ubiquitin-GFP führt (Kirisako et al., 2006), dienen die bis jetzt nachgewiesenen linearen Ubiquitinketten im NF- $\kappa$ B-Signalweg als Rekrutierungs- und Stabilisationsfaktoren für den *signaling*-Komplex am Rezeptor (Haas et al., 2009; Iwai, 2014)

K63-verknüpfte Ketten werden bei der Aktivierung des kanonischen Signalweges sowohl nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  als auch mit TNF $\alpha$  gebildet (Newton et al., 2008; Xu et al., 2009), sind aber nur für den IL-1 $\beta$ -aktivierten NF- $\kappa$ B-Signalweg essenziell (Xu et al., 2009). Im TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -aktivierten NF- $\kappa$ B-Signalweg wird RIP1 mit K63-verknüpften Ubiquitinketten markiert (Ea et al., 2006; Newton et al., 2008) (Abb. 5). NEMO bindet über seine CC2-Leuzin-Zipper-Domäne mit höherer Affinität K63-verknüpfte Ketten als K48-verknüpfte Ketten und ist in TNF $\alpha$ -stimulierten Zellen in Abhängigkeit von einer funktionellen CC2-Leuzin-Zipper-Domäne in einem Komplex mit RIP1 nachweisbar (Ea et al., 2006; Wu et al., 2006a) (Abb. 5). Eine andere Studie zeigt, dass die CC2-Leuzin-Zipper-Domäne von NEMO lineare Ubiquitinketten wiederum mit einer höheren Affinität binden kann als K63-verknüpfte

Ubiquitinketten (Hadian et al., 2011). Da K63-verknüpfte Ubiquitinketten nicht essenziell für den TNF $\alpha$ -aktivierten NF- $\kappa$ B-Signalweg sind (Xu et al., 2009), spielt die Rekrutierung von NEMO in den *signaling*-Komplex nach Stimulation mit TNF $\alpha$  über unterschiedlich verknüpfte Ubiquitinketten eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. So wird RIP1 nach Stimulation von Zellen mit TNF $\alpha$  auch mit K11-verknüpften Ubiquitinketten modifiziert (Dynek et al., 2010) (Abb. 5). Nach der Stimulation mit IL-1 $\beta$  kommt es darüber hinaus auch zur Bildung von freien K63-verknüpften Ubiquitinketten, die an der Aktivierung des IKK-Komplexes beteiligt sind (Xia et al., 2009). In allen Modellen dient die Verknüpfung mit K63- oder K11-Polyubiquitinketten als Plattform zur Rekrutierung von Faktoren, die an der weiteren Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges beteiligt sind.

Als Besonderheit des IL-1 $\beta$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweges sind darüber hinaus M1-K63-verzweigte Polyubiquitinketten nachgewiesen, die die Rekrutierung von TAK1 zum IKK-Komplex regulieren und somit zu der Phosphorylierung von IKK $\beta$  beitragen (Emmerich et al., 2013).



**Abbildung 5: Die Beteiligung unterschiedlich verknüpfter Polyubiquitinketten an der Aktivierung des kanonischen NF-κB-Signalweges.** Nach Bindung von TNF $\alpha$  an den Rezeptor TNF-R1 wird RIP1 mit K63- und K11-verknüpften Polyubiquitinketten modifiziert. Anschließend wird NEMO durch M1-verknüpfte, lineare Polyubiquitinketten, die vom E3-Ligase-Komplex LUBAC synthetisiert werden, modifiziert. Dies führt zur Aktivierung des IKK, der IκB $\alpha$  phosphoryliert. Die dadurch folgende Markierung von IκB $\alpha$  durch K48-verknüpftes Polyubiquitin führt zum proteasomalen Abbau von IκB $\alpha$ .

Neben der Verknüpfung mit unterschiedlichen Ubiquitinketten bei der Aktivierung des NF-κB-Signalweges ist auch der reversible Prozess, die Abspaltung von Ubiquitin durch DUBs, ein wichtiger Bestandteil der Regulation des Signalweges. So wird die Expression von A20 durch den NF-κB-Signalweg induziert (Heyninck und Beyaert, 1999). A20 hat eine N-terminale OTU-Domäne mit DUB-Aktivität und sieben charakteristische Zinkfinger-Motive (Opipari et al., 1990). *In vitro* konnte eine deutliche Präferenz von A20 für die Spaltung K48-verknüpfter Polyubiquitinketten nachgewiesen werden (Wertz et al., 2004; Komander und Barford, 2008; Mevissen

et al., 2013). Außerdem hat A20 zusätzlich eine schwache DUB-Aktivität für K11- und K63-verknüpfte Ubiquitinketten (Wertz et al., 2004; Mevissen et al., 2013). Dabei wird *in vivo* die DUB-Aktivität für K63-verknüpfte Ubiquitinketten über die Phosphorylierung von A20 gesteuert (Wertz et al., 2015). Überexpression von A20 führt dazu, dass der NF- $\kappa$ B-Signalweg kaum aktiviert werden kann (Jaattela et al., 1996; Song et al., 1996; Heyninck et al., 1999). Zusammen mit der NF- $\kappa$ B-induzierten Expression spricht dies für eine Funktion von A20 als negativem *feedback*-Inhibitor. Konsistent damit zeigen  $A20^{-/-}$  *Knock-Out*-Mäuse erhöhte Entzündungsreaktionen, ein typisches Symptom für einen hyperaktiven NF- $\kappa$ B-Signalweg (Lee et al., 2000). Mutationen oder Deletion des für A20 kodierenden Genes *TNFAIP3* sind mit Krankheiten wie B-Zell-Lymphomen und Autoimmunstörungen in Zusammenhang gebracht worden (Wertz und Dixit, 2010). Obwohl gezeigt wurde, dass A20 Ubiquitin von RIP1 und TRAF6 abspaltet (Boone et al., 2004; Wertz et al., 2004; Lin et al., 2008), ist die OTU-Domäne für die negativ regulierende Funktion von A20 im NF- $\kappa$ B-Signalweg nicht von Bedeutung (Song et al., 1996; Natoli et al., 1998; Klinkenberg et al., 2001; Evans et al., 2004; Li et al., 2008a; Lippens et al., 2011; De et al., 2014). Auch wenn der molekulare Mechanismus nicht vollständig geklärt ist, spielt A20 eine essenzielle Rolle in der negativen Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges.

Ein anderer Inhibitor des NF- $\kappa$ B-Signalweges ist das USP CYLD (Brummelkamp et al., 2003; Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003). Die DUB-Aktivität von CYLD zeigt eine Spezifität für K63- und M1-verlinkte Polyubiquitinketten (Takiuchi et al., 2014; Sato et al., 2015). Anders als bei A20 konnte für CYLD ein klarer Zusammenhang zwischen seiner Inhibitor-Funktion und der DUB-Aktivität hergestellt werden (Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003). CYLD entfernt Ubiquitinketten von TRAF2, TRAF6 und NEMO und wirkt so der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges entgegen (Brummelkamp et al., 2003; Kovalenko et al., 2003; Trompouki et al., 2003). Nach Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges wird CYLD durch den IKK phosphoryliert und dadurch inaktiviert (Reiley et al., 2005). Im Gegensatz zu A20 ist CYLD also kein negativer *feedback*-Inhibitor, sondern verhindert vielmehr die unbeabsichtigte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch Erhöhung der Aktivierungsschwelle (Harhaj und Dixit, 2011).

Die von LUBAC generierten linearen Polyubiquitinketten an NEMO werden außerdem von dem DUB Otulin/Gumby (Keusekotten et al., 2013; Rivkin et al., 2013; Takiuchi et al., 2014) abgebaut. Otulin reguliert somit den NF- $\kappa$ B-Signalweg auch negativ (Keusekotten et al., 2013; Schaeffer et al., 2014; Takiuchi et al., 2014). Otulin interagiert über seine PUB-Domäne direkt mit der LUBAC-Untereinheit HOIP und antagonisiert oder unterbindet die von LUBAC gebildeten linearen Ubiquitinketten (Schaeffer et al., 2014; Takiuchi et al., 2014). Dadurch wird weniger NEMO in den *signaling*-Komplex rekrutiert und die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges reduziert

(Keusekotten et al., 2013). Darüber hinaus reguliert Otulin ebenfalls die Signaltransduktion des NOD2-Rezeptors, der eine wichtige Funktion im Immunsystem erfüllt (Fiil et al., 2013).

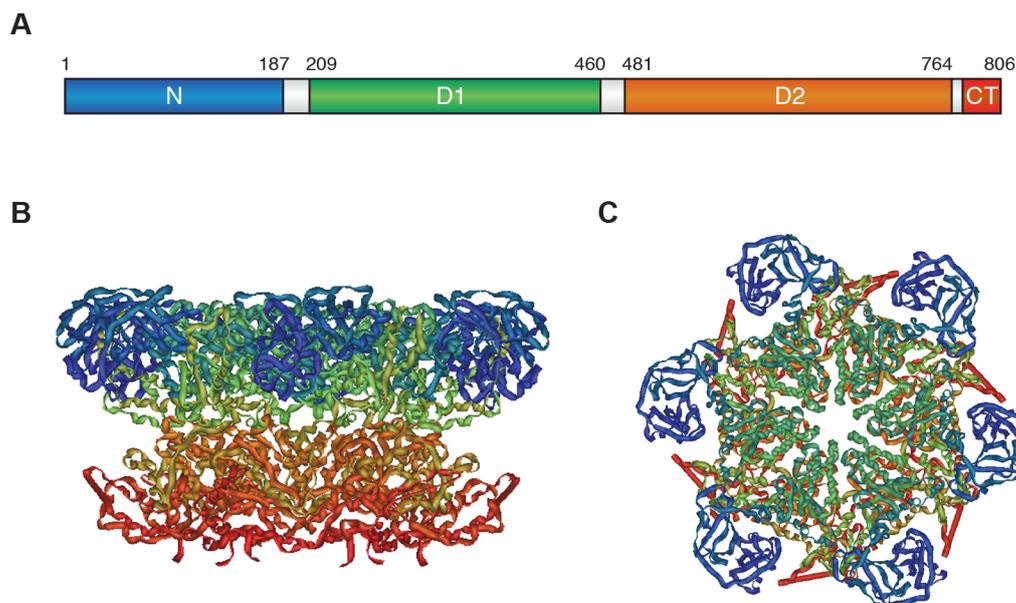
## 2.4 Die Ubiquitin-selektive ATPase p97

Zusätzlich zu den Enzymen der Ubiquitinierungskaskade und DUBs werden Ubiquitin-abhängige Prozesse von vielen anderen Proteinen reguliert. Die essenzielle ATPase p97, die auf ubiquitinierte Substrate wirkt, spielt eine elementare Rolle in vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen (Ye, 2006; Schubert und Buchberger, 2008; Meyer et al., 2012). p97 ist ein abundantes Protein (ungefähr 1% der gesamten zellulären Proteine) und kommt in allen bisher getesteten Geweben und Zelltypen vor (Peters et al., 1990). p97 hat eine zentrale Funktion in den drei wichtigsten proteolytischen Wegen der Zelle, dem proteasomalen Abbau, der Autophagie und dem endolysosomalen System und reguliert so u.a. die Stabilität von Faktoren unterschiedlicher Signalwege und des Zellzyklus (Wang et al., 2004; Stolz et al., 2011; Meyer et al., 2012). Auch für die ER-assoziierte Degradation (ERAD) ist p97 essenziell (Schubert und Buchberger, 2008). Zusätzlich spielt p97 eine Rolle in der Apoptose, bei der Fusion von Membranen, der Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren und in DNA-Reparatur-Prozessen (Wang et al., 2004; Stolz et al., 2011; Meyer et al., 2012). Für viele dieser unterschiedlichen Aufgaben wird angenommen, dass p97 mit seiner sogenannten „Segregase“-Aktivität die bei der ATP-Hydrolyse freigesetzte chemische Energie in Konformationsänderungen umwandelt und so Substrate aus Proteinkomplexen oder anderen zellulären Strukturen löst (Jentsch und Rumpf, 2007). Die diversen Funktionen werden engmaschig durch die Bindung unterschiedlicher Kofaktoren reguliert, die p97 spezifisch zu Substraten rekrutieren oder die zellulären Lokalisationen von p97 beeinflussen (Meyer et al., 2012; Buchberger et al., 2015). Mutationen im p97-kodierenden Gen *VCP* können zu zwei schweren Krankheiten führen, die beide mit Protein-Aggregationen verbunden sind: IBMPFD (*Inclusion Body Myopathy with Paget's disease of the bone and frontotemporal Dementia*) und familiengebundene ALS (*Amyotrophic Lateral Sclerosis*) (Ju et al., 2008; Yamanaka et al., 2012). Chemische Inhibitoren von p97 befinden sich mittlerweile außerdem in der Phase I als Krebstherapeutikum (Deshaies, 2014).

### 2.4.1 Die Struktur und zellulären Funktionen von p97

Die Typ II AAA (*ATPase associated with diverse cellular activities*) ATPase p97, die auch *VCP* (*Valosin containing protein*) in Säugern, Ter94 in *D. melanogaster* und

Cdc48 (*Cell division control protein 48*) in *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *A. thaliana* heißt, ist eines der evolutionär am stärksten konservierten Proteine (Wang et al., 2004). Mitglieder der Familie der AAA-Proteine zeichnen sich durch den Besitz einer (Typ I) oder zweier (Typ II) etwa 250 Aminosäuren großen AAA-Domänen aus, die jeweils unter anderem ein Walker A- und B-Motiv enthalten (Lupas und Martin, 2002; Hanson und Whiteheart, 2005). Alle AAA-ATPasen assemblieren zu Oligomeren, wobei p97 als Homohexamer vorliegt (Hanson und Whiteheart, 2005). Jedes Monomer weist dabei drei distinkte Domänen auf (Abb. 6): eine strukturell konservierte N-terminale Domäne (N-Domäne, Aminosäuren 1-187), die die meisten Kofaktoren bindet, sowie die beiden ATPase-Domänen D1 (Aminosäuren 209-460) und D2 (Aminosäuren 481-763). Der C-Terminus (Aminosäuren 764-806) ist unstrukturiert und wird ebenfalls von einigen Kofaktoren gebunden (Wang et al., 2004; Buchberger et al., 2015). Die Monomere formen ein fassförmiges Hexamer, indem die N-D1- und die D2-Domänen jeweils als konzentrische Ringe übereinander liegen (DeLaBarre und Brunger, 2003; Huyton et al., 2003; Tang und Xia, 2012). Innerhalb dieser Ringe entsteht so eine zentrale Pore (Zhang et al., 2000) (Abb. 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung von p97.** **A** Schema der Domänenstruktur eines einzelnen Monomers (blau: N-Domäne; grün: ATPase-Domäne D1, orange: ATPase-Domäne D2, rot: C-Terminus), **B** Schematische Darstellung eines p97-Hexamers in der Seitenansicht (Farben wie in A), **C** schematische Darstellung eines p97-Hexamers in der Aufsicht (Farben wie in A) (modifiziert nach Buchberger, 2006)

Die zellulären Funktionen von p97 sind vielfältig und beinhalten unterschiedliche essenzielle Vorgänge. Eine der am besten beschriebenen Funktionen von p97/Cdc48 ist die Extraktion von missgefalteten Proteinen im ERAD-Abbauweg (Ye et al., 2001; Rabinovich et al., 2002). Hierbei werden ubiquitinierte Substrate aus dem ER-Lumen und der ER-Membran von p97/Cdc48 ins Cytosol befördert, um dort

anschließend proteasomal abgebaut zu werden (Ye et al., 2001; Neuber et al., 2005; Schuberth und Buchberger, 2005). Ähnlich wie für ERAD beschrieben ist p97 auch an der Extraktion von Proteinen der äußeren Mitochondrien-Membran wie Mcl1 und Mfn1 beteiligt, die ebenfalls im Cytosol proteasomal abgebaut werden (Xu et al., 2011; Kim et al., 2013b).

Daneben gibt es eine Reihe von Substraten, die durch die Segregase-Aktivität von p97 vom Chromatin gelöst werden. p97 wurde in einem genomweiten Screen als essenzieller Faktor für den Abbau von ubiquitinierten CDT1 und SET8 nach UV-Bestrahlung ermittelt (Raman et al., 2011; Kim et al., 2013b). Zusätzlich wurden ebenfalls nach UV-Bestrahlung die beiden Proteine DDB2 und XPC, die wichtig für das Erkennen von DNA-Schäden sind, als Substrate von p97 identifiziert (Puumalainen et al., 2014). Auch im Fall von DNA-Doppelstrang-Brüchen, die durch Röntgen-Strahlung entstehen, entfernt p97 ubiquitinierte Substrate von der DNA (Meerang et al., 2011). In der Hefe konnte gezeigt werden, dass Cdc48 benötigt wird, um die RNA Polymerase II vom Chromatin zu lösen, wenn nach UV-Bestrahlung Läsionen entstehen (Verma et al., 2011). Interessanterweise ist p97 in Zellen, die mit DNA-schädigenden Reagenzien behandelt werden, an Ser784 phosphoryliert, was wahrscheinlich einen Regulationsmechanismus darstellt (Livingstone et al., 2005).

Neben der Regulation von Chromatin-assoziierten Faktoren während in DNA-Reparaturprozessen löst p97 auch während der Mitose die Kinase Aurora B vom Chromatin (Ramadan et al., 2007). Obwohl Cdc48 ursprünglich in einem Hefe-Screen für Zellzyklus-Mutanten identifiziert wurde (Moir et al., 1982), ist die Rolle von p97/Cdc48 im Zellzyklus bis jetzt noch nicht vollständig geklärt. Neben der erwähnten Extraktion von Aurora B reguliert p97/Cdc48 auch die Kinase-Aktivität von Aurora B/Ipl1 auf unterschiedliche Substrate im Zellzyklus (Dobrynin et al., 2011; Bohm und Buchberger, 2013). Auch die Stabilität anderer Regulatoren des Zellzyklus wird von p97/Cdc48 beeinflusst. Dazu gehören Cyclin E (Dai und Li, 2001), der G1-Zyklus-abhängige Kinasen-Inhibitor Far1 (Fu et al., 2003), CDC25A (Riemer et al., 2014) sowie Securin und Separase (Ikai und Yanagida, 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass p97/Cdc48 eine Rolle bei der DNA-Replikation besitzt (Maric et al., 2014; Moreno et al., 2014).

Daneben ist p97/Cdc48 in der Regulation unterschiedlicher Signalwege in der Zelle beteiligt. So ist p97 essenziell, um nach Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges den Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  proteasomal abzubauen, um so eine Translokation von p65-p50 in den Zellkern zu ermöglichen (Li et al., 2014). p97 reguliert außerdem auch die Degradation des Transkriptionsfaktors HIF1 $\alpha$  unter physiologischen Sauerstoffkonzentration (Alexandru et al., 2008; Bandau et al., 2012).

p97 wurde auch mit der Regulation des post-mitotischen Aufbaus des Golgi-Apparats und des ERs in Verbindung gebracht (Kondo et al., 1997). Für die

Neubildung der Kernmembran nach der Mitose wurde interessanterweise unterschiedliche, temporär distinkte Aufgaben für p97 nachgewiesen (Hetzer et al., 2001).

Mehrere Arbeiten belegen eine Rolle von p97/Cdc48 in der Autophagie. In Hefe konnte für Cdc48 eine gemeinsame Rolle mit dem Ubiquitin-ähnlichen Atg8 in der Autophagosomen-Biogenese nachgewiesen werden (Krick et al., 2010). Für eine spezielle Form der Autophagie, die Degradation von Ribosomen unter Hungerbedingungen, konnte ebenfalls eine Abhängigkeit von Cdc48 gezeigt werden (Ossareh-Nazari et al., 2010). In Geweben von IBMPFD-Patienten akkumulieren p62- und LC3-II-angereicherte Vakuolen, was auch auf einen Defekt in der Autophagie schließen lässt (Ju et al., 2009).

Neben dem proteasomalen Abbau und der Autophagie gibt es als dritten großen proteolytischen Abbauweg den endolysosomalen Weg, bei dem Cargo-Proteine ähnlich wie bei der Autophagie über Lysosomen abgebaut werden. Auch hier spielt p97 eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass p97 den Oligomerizations-Zustand von EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) beeinflusst und so die Größe von Endosomen reguliert (Ramanathan und Ye, 2012). Für p97 wurde eine Interaktion mit ubiquitiniertem Caveolin1 (Cav1) an Endosomen gezeigt (Ritz et al., 2011; Kirchner et al., 2013). Nach Inhibition von p97 und gleichzeitiger Überexpression von Cav1 akkumulieren vergrößerte Endosomen in der Zelle (Ritz et al., 2011). Potentielle Substrate von p97 im endolysosomalen Weg sind der Transferrin-Rezeptor (Ramanathan und Ye, 2012), der EGF-Rezeptor (Ritz et al., 2011) und der Mannose-Rezeptor (Zehner et al., 2011). Interessanterweise war Clathrin, ein Regulator der Endocytose, einer der ersten beschriebenen Interaktoren von p97 (Pleasure et al., 1993).

#### **2.4.2 Die Kofaktoren von p97**

Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen in unterschiedlichen zellulären Prozessen muss die Aktivität von p97 eng kontrolliert werden. *In vitro* kann eine direkte Bindung von Ubiquitin und ubiquitinierten Proteinen an die N-Domäne von p97 nachgewiesen werden (Dai und Li, 2001; Rape et al., 2001). *In vivo* ist dagegen eine indirekte Bindung über Kofaktoren wahrscheinlicher, die bestimmte Substrate binden und an p97 rekrutieren, um so die Spezifität von p97 zu kontrollieren. Neben Ubiquitin kann p97 auch direkt an un- oder fehlgefaltete Proteine binden (Thoms, 2002; Song et al., 2007), aber auch hier ist *in vivo* eine indirekte Bindung über Kofaktoren wahrscheinlicher.

Bis jetzt sind etwa 40 unterschiedliche Kofaktoren von p97 beschrieben, die sich funktionell in zwei distinkte Gruppe einteilen lassen: Substrat-rekrutierende und Substrat-prozessierende Kofaktoren (Jentsch und Rumpf, 2007; Yamanaka et al.,

2012). Da p97 hauptsächlich auf ubiquitinierte Proteine wirkt, besitzen die meisten Substrat-rekrutierenden Kofaktoren konsequenterweise eine Ubiquitin-bindende Domäne. Dazu gehören zum Beispiel FAF1, p47, UBXD7 und SAKS1 mit ihrer UBA-Domäne (Schuberth und Buchberger, 2008). Substrat-prozessierende Kofaktoren besitzen eine eigene enzymatische Aktivität, mit der sie das Substrat modifizieren (Rumpf und Jentsch, 2006). Beispiele hierfür sind die E3-Ubiquitin-Ligasen Hrd1 und gp78, die beide Funktionen im ERAD-Abbauweg haben (Ballar et al., 2006; Morreale et al., 2009), die DUBs VCIP135 und Otu1 (Uchiyama et al., 2002; Rumpf und Jentsch, 2006) sowie die Glycosidase PNGase (Park et al., 2001; Allen et al., 2006).

Bis jetzt wurden sieben unterschiedliche Domänen bzw. Motive beschrieben, die eine Bindung von Kofaktoren an p97 vermitteln, wobei ein einzelner Kofaktor mehrere dieser Bindemotive besitzen kann. Dabei handelt es sich um die UBX-Domäne (Buchberger et al., 2001; Buchberger, 2002; Schuberth und Buchberger, 2008), die UBX-ähnliche Domäne (Isaacson et al., 2007; Schuberth und Buchberger, 2008), die PUB-Domäne (Suzuki et al., 2001; Doerks et al., 2002; Allen et al., 2006), die PUL-Domäne (Iyer et al., 2004), das BS1 (*Binding Site 1*)-Motiv bzw. Shp-Box (Bruderer et al., 2004; Hitt und Wolf, 2004; Sato und Hampton, 2006), das VBM-Motiv (Boeddrich et al., 2006) und das VIM (*VCP-Interacting Motif*) (Ballar et al., 2006; Yeung et al., 2008; Stapf et al., 2011). Die Bindung an p97 durch UBX-Domäne, UBX-ähnliche Domäne, BS1-Motiv/Shp-Box, VBM-Motiv oder VIM erfolgt an die N-Domäne von p97 (Niwa et al., 2012). PUB-Domäne und PUL-Domäne binden an den C-terminalen Bereich (Buchberger et al., 2015).

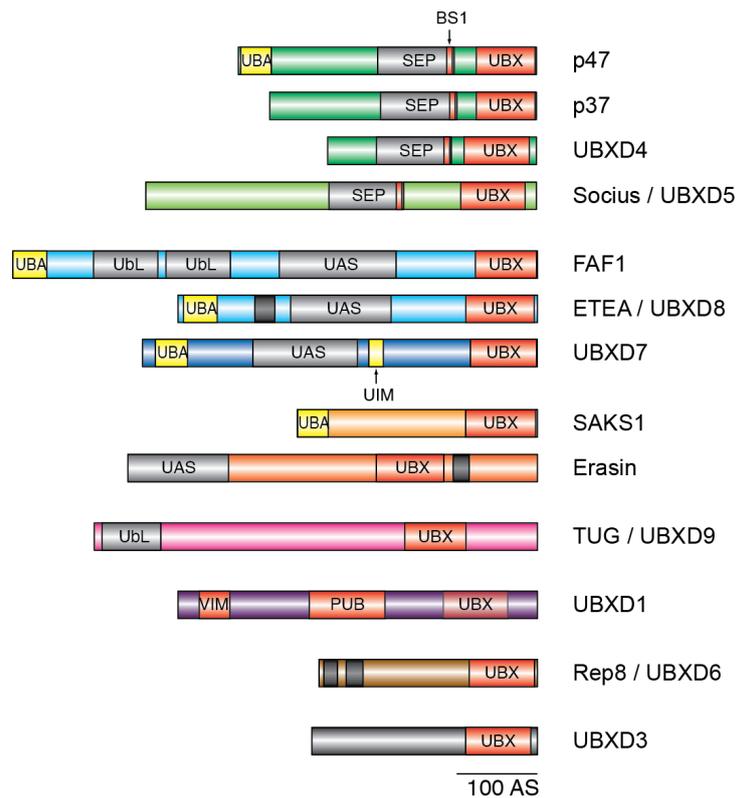
Die gleichzeitige Bindung bestimmter Kofaktoren an p97 schließt sich gegenseitig aus. Dies ist besonders gut für den Kofaktor p47 und das Kofaktoren-Heterodimer UFD1L-NPL4 untersucht. So stellen  $p97^{p47}$  und  $p97^{UFD1L-NPL4}$  zwei distinkte Komplexe dar (Meyer et al., 2000; Bruderer et al., 2004). Die Bindung von p47 an ein p97-Hexamer erfolgt dabei als Trimer (Kondo et al., 1997), UFD1L-NPL4 bindet als Heterodimer (Pye et al., 2007). Diese sich gegenseitig ausschließende Bindung ist evolutionär konserviert. Funktionell scheinen sich diese Komplexe auf zwei unterschiedliche Bereiche spezialisiert zu haben. So spielt der  $p97^{UFD1L-NPL4}$ -Komplex in proteasomalen Funktionen von p97 eine Rolle, während der  $p97^{p47}$ -Komplex eher Proteasom-unabhängige Funktionen wie z.B. die Fusion von Membranen von p97 steuert (Meyer et al., 2012). Einen dritten Komplex stellt in Säugerzellen der  $p97^{UBXD1}$ -Komplex dar (Meyer et al., 2012; Buchberger et al., 2015). Dieser Komplex wurde mit der Regulierung des endolysosomalen Systems in Verbindung gebracht (Ritz et al., 2011).

Aufgrund der Hexamer-Struktur von p97 und den unterschiedlichen Bindungsmodi der Kofaktoren sind in den jeweiligen Komplexen noch Bindestellen für andere

Kofaktoren frei. Tatsächlich können sich auf diese Weise spezifische Komplexe mit mehreren unterschiedlichen Kofaktoren bilden. Beschrieben ist dies z.B. für  $p97^{UFD1L-NPL4-FAF1}$  und  $p97^{UFD1L-NPL4-UBXD7}$  (Hanzelmann et al., 2011; Meyer et al., 2012). Die Beobachtung, dass FAF1 in *in vitro*-Versuchen nur an  $p97^{UFD1L-NPL4}$  bindet, nicht aber an freies p97, hat zu der Entwicklung eines hierarchischen Bindemodells geführt (Hanzelmann et al., 2011). Diese Beobachtung kann durch zwei verschiedene potentielle Mechanismen erklärt werden. Es ist möglich, dass FAF1 nicht nur p97 bindet, sondern auch eine Interaktion zwischen FAF1 und UFD1L-NPL4 vorliegt, die für eine stabile Ausbildung des Komplexes benötigt wird (Hanzelmann et al., 2011). Alternativ könnte die Bindung von UFD1L-NPL4 zu einer Konformationsänderung des p97-Hexamers führen, die es erst möglich macht, dass FAF1 an p97 binden kann (Hanzelmann et al., 2011). Durch Ko-Immünpräzipitations-Versuche in HeLa-Zellen konnte das hierarchische Bindemodell gestützt werden, da in UFD1L-depletierten Zellen kein FAF1 mehr an p97 bindet (Lee et al., 2013). In Pulldown-Experimenten und durch Kryo-Elektronenmikroskopie konnte allerdings eine direkte Bindung von FAF1 an p97 in der Abwesenheit von UFD1L und NPL4 nachgewiesen werden (Ewens et al., 2014). Weitere Studien zur genauen Klärung der Bindung unterschiedlicher Kofaktoren an p97 sind also nötig.

### 2.4.3 Die Familie der UBX-Domänen-Proteine

Die p97-Kofaktoren, die eine UBX-Domäne haben, bilden die größte und am besten untersuchte Familie von p97-Kofaktoren. Die UBX-Domäne (für *Ubiquitin Regulatory X*-Domäne) weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Ubiquitin auf (Buchberger et al., 2001). Sie vermittelt normalerweise über ein R...FPR-Motiv innerhalb der Domäne die Bindung zu p97/Cdc48 (Buchberger et al., 2001; Dreveny et al., 2004). Die Bindung erfolgt dabei an die N-Domäne von p97 (Buchberger et al., 2015). Allerdings gibt es zwei Ausnahmen in der Familie der UBX-Domänen-Proteine. So sind die UBX-Domänen von UBXD1 und UBXD9 nicht in der Lage, p97-Bindung zu vermitteln (Madsen et al., 2008; Kern et al., 2009; Orme und Bogan, 2012). Die Familie umfasst sieben Mitglieder in *S. cerevisiae*, acht in *C. elegans* und 13 in Säugern (Schuberth und Buchberger, 2008). Auf Basis ihrer Domänen-Struktur lassen sich die unterschiedlichen UBX-Proteine noch weiter in Unterfamilien einordnen (Abb. 7).



**Abbildung 7: Übersicht über die unterschiedlichen UBX-Domänen-Proteine in Säugern.** Die namensgebende UBX-Domäne und andere p97-bindende Domänen bzw. Motive (PUB-Domäne und BS1) sind in rot dargestellt. Ubiquitin-bindende Domänen (UBA und UIM) sind gelb gekennzeichnet. Die SEP-Domänen der p47-Subfamilie, sowie die UAS-Domänen und die Ubiquitin-ähnlichen UbL (*Ubiquitin-Like*)-Domänen sind grau dargestellt. (modifiziert nach Stolz et al., 2011)

Die Unterfamilie der p47-ähnlichen UBX-Domänen-Proteine umfasst in Säugern die vier Mitglieder p47, p37, UBXD4 und Socius/UBXD5 (Schuberth und Buchberger, 2008; Stolz et al., 2011). Sie zeichnen sich neben einer C-terminalen UBX-Domäne und eines BS1-Motivs durch eine SEP-Domäne aus, die für die Trimerisierung der Kofaktoren verantwortlich ist (Yuan et al., 2004; Schuberth und Buchberger, 2008). Funktionell am besten beschrieben ist p47. So reguliert p47 die p97-abhängige Fusion der ER-Membran und der Assemblierung des Golgis und des ERs nach der Mitose (Kondo et al., 1997; Uchiyama und Kondo, 2005). Das Hefe-Homolog Shp1 spielt eine Rolle in der Autophagosomen-Biogenese (Krick et al., 2010) und im Zellzyklus (Bohm und Buchberger, 2013). p37 spielt eine Rolle für den Aufbau des Golgi-Apparates und des ER nach der Mitose (Uchiyama et al., 2006) bzw. dem Abbau des Golgis während der Mitose (Kaneko et al., 2010). UBXD4 reguliert die zelluläre Lokalisation von Untereinheiten des neuronalen nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors (Rezvani et al., 2009).

Die FAF1-Unterfamilie besteht in Säugern aus den drei Mitgliedern FAF1, UBXD8 und UBXD7. Neben einer C-terminalen UBX-Domäne und einer N-terminalen UBA-Domäne besitzen sie alle eine zentrale UAS-Domäne (Schuberth und

Buchberger, 2008). Diese Domäne kann die lipidabhängige Polymerisation von FAF1 und UBXD8 vermitteln (Kim et al., 2013a). FAF1 spielt unter anderem im NF- $\kappa$ B-Signalweg (Park et al., 2007; Elmetwali et al., 2014), im Wnt-Signalweg (Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2012) und in der Apoptose (Chu et al., 1995; De Zio et al., 2008) eine Rolle. UBXD8 lokalisiert im ER und an *Lipid Droplets* und reguliert dort neben der Aktivität der ATG-Lipase (Olzmann et al., 2013) auch die Lokalisation von ubiquitinierten ApoB (Suzuki et al., 2012). Auch für das Hefe-Homolog Ubx2 wurde eine regulierende Funktion für *Lipid Droplets* gezeigt (Wang und Lee, 2012). UBXD7 kann sowohl die Transkriptionsfaktoren-Untereinheit HIF1 $\alpha$  und dessen Ubiquitinligase-Komplex CUL2/VHL binden und p97 rekrutieren, was unter physiologischen Sauerstoffkonzentration zur anschließenden Degradation von HIF1 $\alpha$  führt (Alexandru et al., 2008; Bandau et al., 2012).

Mitglieder der SAKS1-Unterfamilie (in Säugern SAKS1 und Erasin) besitzen eine zentrale, homologe Region, die in UBX-Proteinen nur in ihrer Unterfamilie vorkommt (Schuberth und Buchberger, 2008). Für SAKS1 und Erasin wurden Funktionen in ERAD beschrieben (Liang et al., 2006; Lim et al., 2009; LaLonde und Bretscher, 2011).

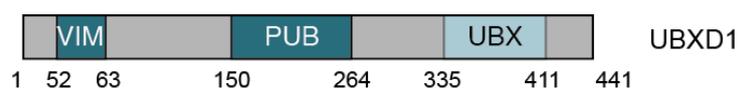
Vier Unterfamilien bestehen in Säugern jeweils aus dem namensgebende Mitglied, besitzen aber mit einer Ausnahme homologe Proteine in andern Organismen, die ebenfalls der Unterfamilie zugeordnet werden. Die Unterfamilie der TUG/UBXD9-Proteine besitzt eine zentrale UBX-Domäne, ein BS1-Motiv und je nach Organismus noch eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (Schuberth und Buchberger, 2008; Stolz et al., 2011). UBXD9 wurde mit unterschiedlichen Funktionen wie der Regulation des Oligomerisierungszustandes von p97 (Rancour et al., 2004; Orme und Bogan, 2012) und der Glukoseaufnahme in Verbindung gebracht (Bogan et al., 2003; Habtemichael et al., 2015). Sein Hefe-Homolog Ubx4 reguliert ERAD (Alberts et al., 2009; Madsen et al., 2014) und die Degradation der RNA-Polymerase II-Untereinheit Rpb1 nach UV-Bestrahlung (Verma et al., 2011).

Rep8/UBXD6-ähnliche Proteine haben eine C-terminale UBX-Domäne und eine N-terminale Transmembran-Domäne (Schuberth und Buchberger, 2008; Stolz et al., 2011). UBXD3, das ausschließlich in Säugern zu finden ist, besitzt eine C-terminale UBX-Domäne (Schuberth und Buchberger, 2008; Stolz et al., 2011). Kürzlich wurde gezeigt, dass UBXD3 die Ziliogenese reguliert (Raman et al., 2015).

Mitglieder der UBXD1-Familie, die neben einer C-terminalen UBX-Domäne zusätzlich eine zentral-gelegene PUB-Domäne haben, kommen erst in höheren Eukaryoten vor (Schuberth und Buchberger, 2008).

#### 2.4.4 Das UBX-Domänen-Protein UBXD1

Der p97-Kofaktor UBXD1 kommt in allen Eukaryoten außer Pilzen vor und ist stark konserviert (Carim-Todd et al., 2001). Bisher konnte eine Expression in allen getesteten Geweben nachgewiesen werden (Carim-Todd et al., 2001; Madsen et al., 2008). Dies lässt darauf schließen, dass UBXD1 an der Regulation einer allgemeinen Rolle von p97 beteiligt ist und nicht ausschließlich Zelltyp-spezifische Funktionen hat. UBXD1 hat eine Gesamtlänge von 441 Aminosäureresten (Madsen et al., 2008). UBXD1 gehört aufgrund seiner UBX-Domäne zwar zur Familie der UBX-Domänen-Proteine, bindet p97 aber über seine PUB-Domäne (Aminosäuren 150-264) und ein VIM (Aminosäuren 52-63) (Kern et al., 2009; Stapf et al., 2011). Die UBX-Domäne (Aminosäuren 335-411) vermittelt dagegen aufgrund fehlender Aminosäurereste im R...FPR-Motiv keine Bindung an p97 (Madsen et al., 2008; Kern et al., 2009). Die PUB-Domäne bindet wie die PUB-Domänen von anderen Proteinen an die zehn C-terminalen Aminosäuren von p97, wenn das Tyrosin 805 unphosphoryliert ist (Zhao et al., 2007; Madsen et al., 2008; Kern et al., 2009). Für das VIM (Aminosäuren 52-63) konnte hingegen gezeigt werden, dass es an die N-Domäne von p97 bindet (Kern et al., 2009; Stapf et al., 2011). UBXD1 konkurriert dabei unter anderem mit p47 um diese Bindestelle (Madsen et al., 2008; Kern et al., 2009). *In vitro* konnte mit dem isolierten N-Terminus von UBXD1 kürzlich gezeigt werden, dass UBXD1 vermutlich noch über eine dritte Bindungsstelle an die N-Domäne von p97 binden kann (Trusch et al., 2015). Während der isolierte N-Terminus von UBXD1 die ATPase-Aktivität von p97 reduziert (Trusch et al., 2015), hat das Vollängen-Protein allerdings keine Auswirkungen auf die ATPase-Aktivität von p97 (Madsen et al., 2008).



**Abbildung 8: Schematische Übersicht über die Domänenstruktur von UBXD1.** Die beiden p97-Bindestellen (VIM und PUB) sind türkis dargestellt. Die UBX-Domäne, die keine Bindung an p97 vermittelt, ist hellblau. Unter dem Schema sind die Aminosäurereste der Domänengrenzen als Zahl angegeben.

Der Komplex aus p97 und UBXD1 definiert neben  $p97^{UFD1L-NPL4}$  und  $p97^{p47}$  eine wichtige Subpopulation von p97-Komplexen (Ritz et al., 2011; Buchberger et al., 2015). Bis jetzt konnte durch massenspektroskopische Untersuchungen nur UBXD9 als zusätzlicher p97-Kofaktor, der diesen Komplex bindet, identifiziert werden (Haines et al., 2012; Wollny, unveröffentlicht).

Es sind einige Proteine beschrieben, die mit UBXD1 oder dem  $p97^{UBXD1}$ -Komplex interagieren. So wurde durch Ko-Immunopräzipitationen eine Interaktion von UBXD1

mit den beiden ERAD-Komponenten Hrd1 und HERP beobachtet, die allerdings nicht mit aufgereinigten Proteinen verifizierbar ist (Madsen et al., 2008). Die Ko-Immünpräzipitation könnte also auf eine gemeinsame Interaktion mit p97 zurückzuführen sein. In einer anderen Studie wurde durch Pull-Down-Experimente aus Zelllysaten eine Interaktion zwischen UBXD1 und Derlin-1 nachgewiesen, das ebenfalls eine Rolle in ERAD spielt (Nagahama et al., 2009). Über eine mögliche Funktion von UBXD1 in ERAD machen die beiden Studien allerdings widersprüchliche Aussagen. So ist das ERAD-Modellsubstrat CD-3 $\delta$  in UBXD1-depletierten Zellen nicht stabilisiert (Madsen et al., 2008), das Modellsubstrat CFTR allerdings schon (Nagahama et al., 2009). In massenspektrometrischen Untersuchungen konnte bis jetzt keine dieser ERAD-Komponenten als Interaktionspartner von UBXD1 bestätigt werden (Schäfer, 2007; Haines et al., 2012; Raman et al., 2015). Allerdings wurde in diesen Untersuchungen Ergic-53 als Interaktionspartner von UBXD1 identifiziert (Schäfer, 2007; Haines et al., 2012). Durch Ko-Immünpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass die zehn N-terminalen Aminosäuren von UBXD1 als Bindungsstelle von Ergic-53 dienen (Haines et al., 2012). Ob UBXD1 auch eine Rolle in den Funktionen von Ergic-53 im Transport von Proteinen zwischen dem ER und Golgi spielt, wurde allerdings nicht beschrieben. Einen weiteren Bindepartner des p97<sup>UBXD1</sup>-Komplexes stellt Cav1 dar (Ritz et al., 2011; Kirchner et al., 2013). Die Interaktion von p97 und Cav1 ist nicht von UBXD1 abhängig, sondern auch in UBXD1-depletierten Zellen nachweisbar (Ritz et al., 2011). Allerdings scheint diese Interaktion trotzdem mit einer zellulären Funktion von UBXD1 in Zusammenhang zu stehen, da UBXD1 nach der Überexpression von Cav1 an die Membran von Endosomen rekrutiert wird (Ritz et al., 2011; Kirchner et al., 2013; Trusch et al., 2015). Nach Depletion von UBXD1 akkumuliert Cav1 an vergrößerten Endosomen, anstatt lysosomal abgebaut zu werden (Ritz et al., 2011). Dies lässt darauf schließen, dass UBXD1 möglicherweise eine Rolle in der Reifung von Endosomen hat. Die genaue molekulare Funktion und weitere Bindungspartner im endolysosomalen System sind allerdings noch unbekannt.

## 2.5 Ziel der Arbeit

Die zellulären Funktionen des p97<sup>UBXD1</sup>-Komplexes sind noch weitgehend unbekannt. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit neue zelluläre Funktionen von UBXD1 identifiziert werden. Ausgangspunkt stellten Kandidaten aus einem Yeast-Two-Hybrid-Screen mit UBXD1 dar, deren Interaktion mit UBXD1 zunächst in Säugerzellen untersucht werden sollte. Die dabei verifizierten neuen Interaktionspartner sollten dann Hinweise auf die zelluläre Funktion von UBXD1 geben.

## 3 Ergebnisse

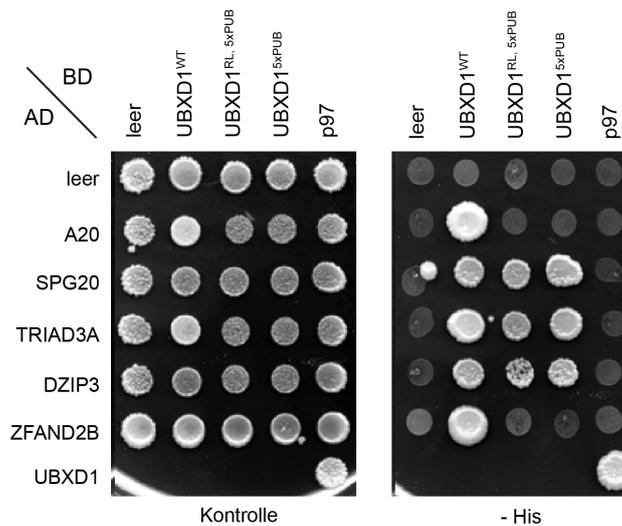
### 3.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner von UBXD1

Für eine funktionelle Charakterisierung von UBXD1 wurde im Vorfeld dieser Arbeit ein Yeast-Two-Hybrid-Screen mit UBXD1 als *bait* durchgeführt (Kern, 2008). Die Identifikation von neuen Interaktoren sollte Aufschluss über mögliche zelluläre Funktionen von UBXD1 geben. Die gesamten kodierenden Sequenzen interessanter Kandidaten aus diesem Screen, die schon mit Ubiquitin-abhängigen Prozessen in Zusammenhang gebracht worden sind, wurden kloniert und in gerichteten Yeast-Two-Hybrid-Versuchen auf ihre Interaktion mit UBXD1 getestet. Dabei handelt es sich um A20, das als Ubiquitin-editierendes Protein bezeichnet wird, da es sowohl eine N-terminale OTU-Domäne mit DUB-Aktivität besitzt (Wertz et al., 2004; Komander und Barford, 2008; Lin et al., 2008) als auch über sieben C-terminale Zinkfinger-Motive die Ubiquitinierung von anderen Proteinen fördert (Wertz et al., 2004); SPG20, das mit den Ubiquitin-E3-Ligasen AIP4 und AIP5 interagiert (Edwards et al., 2009; Hooper et al., 2010); die Ubiquitin-Ligasen TRIAD3A (Nakhaei et al., 2009) und DZIP3 (Kreft und Nassal, 2003) sowie ZFAND2B, das mit dem Proteasom interagiert (Yun et al., 2008).

#### 3.1.1 Bestätigung neuer Interaktoren von UBXD1

Das Yeast-Two-Hybrid-System ist ein sensitives System zur Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Allerdings führen Screens mit diesem System aus unterschiedlichen Gründen auch häufig zu falsch positiven Ergebnissen. Die DNA-Sequenzen der verwendeten cDNA-Bibliotheken von Gal4-AD-Fusionsproteinen kodieren manchmal nur für unvollständige Proteinfragmente, die unspezifisch mit dem *bait*-Protein interagieren können. Da diese Fragmente in der Bibliothek unabhängig von der Domänenstruktur der Proteine sind, sind auch Fehlfaltungen sehr häufig, die ebenfalls zu unspezifischen Interaktionen mit dem *bait*-Protein führen können. Ausgehend von den Ergebnissen des Yeast-Two-Hybrid-Screens wurden daher für alle interessanten Kandidaten Yeast-Two-Hybrid-Konstrukte mit der gesamten kodierenden Sequenz der Proteine hergestellt. Diese wurden dann auf Interaktion mit verschiedenen UBXD1-Varianten getestet. Die Interaktion mit UBXD1<sup>WT</sup> wurde zur Verifizierung der Ergebnisse mit dem Kandidaten untersucht. Zusätzlich wurde untersucht, ob der Kandidat mit UBXD1<sup>5xPUB</sup> interagiert, um eine mögliche Beteiligung der PUB-Domäne von UBXD1 zu ermitteln. Auf eine Interaktion mit UBXD1<sup>RL,5xPUB</sup> wurde getestet, da es manchmal zu einer Yeast-Two-Hybrid-Interaktion zweier Proteine kommt, die durch gleichzeitige Wechselwirkung der untersuchten Proteine mit endogenen Proteinen

der Hefe vermittelt wird. So hat p97 eine hohe Ähnlichkeit zu seinem Hefe-Homolog Cdc48, das ebenfalls mit UBXD1 interagieren kann. Bei einer gleichzeitigen Interaktion von Cdc48 mit UBXD1 und einem Kandidaten käme es zu einem positiven Ergebnis im gerichteten Yeast-Two-Hybrid-Versuch mit UBXD1<sup>WT</sup>. Da UBXD1<sup>RL,5xPUB</sup> nicht mehr mit p97 und somit auch nicht mehr mit Cdc48 interagieren kann, würde ein Wegfallen der Interaktion in diesem Ansatz eventuell für eine gleichzeitige Wechselwirkung von UBXD1 und des Kandidaten mit Cdc48 sprechen. Als zusätzliche Kontrolle, ob eine mögliche Interaktion mit UBXD1<sup>WT</sup> vielleicht nur auf gemeinsame Interaktion mit Cdc48 zurückzuführen ist, wurden alle Kandidaten auch auf eine Interaktion mit p97 getestet.



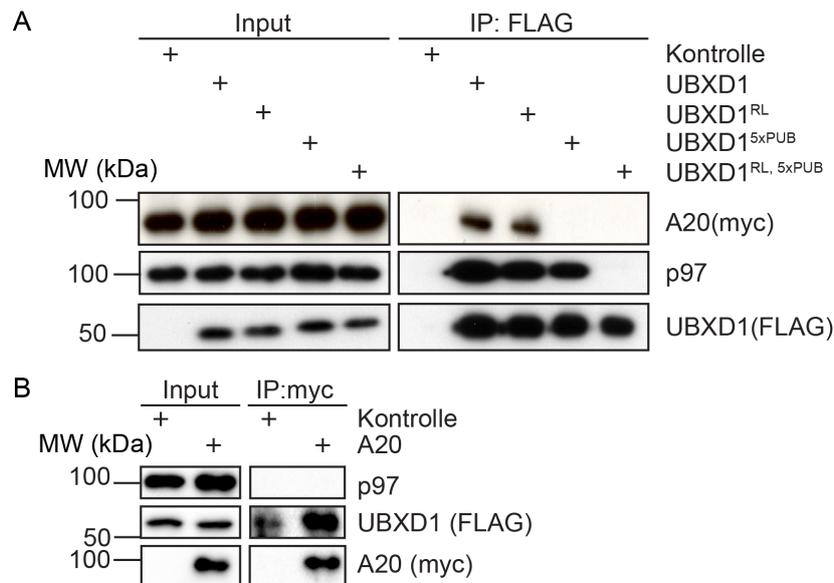
**Abbildung 9: Yeast-Two-Hybrid-Interaktionen zwischen UBXD1 und Kandidaten aus einem Yeast-Two-Hybrid-Screen.** Die die angegebenen Gal4-AD- und Gal4-BD-Fusionsproteine exprimierenden Hefezellen des Reporter-Stammes PJ69-4a wurden auf Kontroll- und Reporterplatten getüpfelt. Die linke Platte (Kontrolle) dient als Wachstumskontrolle, während Wachstum auf der rechten Reporterplatte (-His) auf Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen ist. Die Platten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert.

Im gerichteten Yeast-Two-Hybrid-Experiment wurde die Bindung aller Kandidaten an UBXD1<sup>WT</sup> bestätigt (Abb. 9). Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die Interaktion im Yeast-Two-Hybrid-Screen nur auf unspezifische Wechselwirkungen einzelner isolierter, vielleicht fehlgefalteter Proteinfragmente zurückzuführen war. SPG20, TRIAD3A und DZIP interagieren, neben UBXD1<sup>WT</sup>, auch mit den beiden Varianten UBXD1<sup>RL,5xPUB</sup> und UBXD1<sup>5xPUB</sup> (Abb. 9). Für diese drei Proteine ist also auszuschließen, dass ihre Interaktion mit UBXD1 durch endogenes Cdc48 vermittelt wird. Dagegen interagieren A20 und ZFAND2B nur mit wildtypischem UBXD1 (Abb. 9). Bei diesen beiden Proteinen ist somit aufgrund der Yeast-Two-Hybrid-Daten nicht auszuschließen, dass sie gemeinsam mit UBXD1 an endogenes Cdc48 binden. Da A20 keine Interaktion mit p97 zeigt, ist jedoch eine direkte Interaktion mit UBXD1 wahrscheinlicher. Für ZFAND2B konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass es direkt mit p97 über ein VIM (*VCP-Interacting Motif*) interagiert (Stapf et al.,

2011; Glinka et al., 2014), hier ist also nicht auszuschließen, dass die Interaktion mit UBXD1<sup>WT</sup> nur über eine Bindung von ZFAND2B an Cdc48 vermittelt ist. Allerdings ist aufgrund des VIM eine Interaktion zwischen ZFAND2B und p97 im gerichteten Yeast-Two-Hybrid zu erwarten, die in diesen Versuchen nicht beobachtet werden konnte.

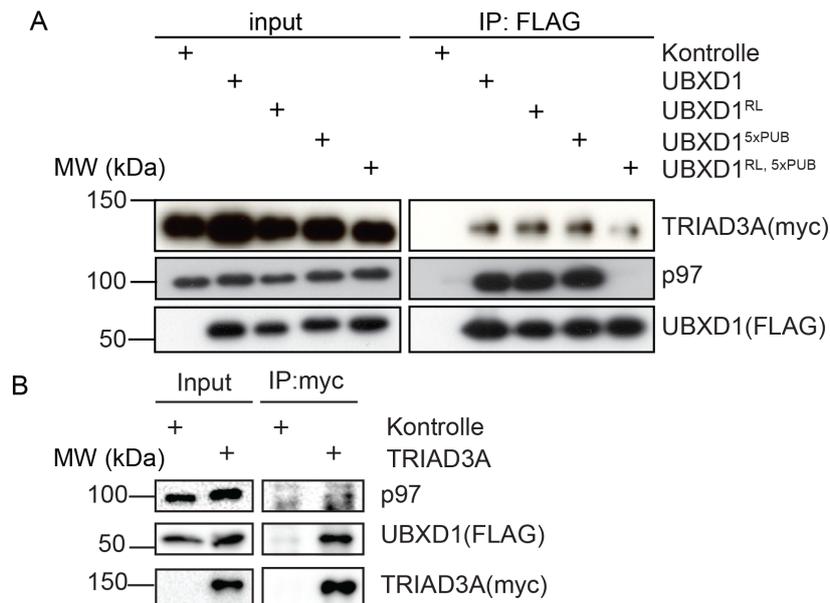
### 3.1.2 Interaktion von UBXD1 und den Kandidaten in HEK293T-Zellen

Zusätzlich zu den oben erwähnten Gründen für falsch-positive Resultate aus Yeast-Two-Hybrid-Screens, gibt es noch weitere mögliche Ursachen: Die massive Überexpression der Fusionsproteine kann durch das Fehlen von Interaktionspartnern zu Fehlfaltungen führen, außerdem kann es bei der Untersuchungen von Proteinen, die nicht aus der Hefe stammen, dazu kommen, dass wichtige post-translationale Modifikationen fehlen, die eine Interaktion normalerweise verhindern würden. Des Weiteren kann die Expression der zu untersuchenden Proteine als Fusion mit Teilen des Gal4-Transkriptionsfaktors und die damit verbundenen Kolokalisation der Proteine im Zellkern dazu führen, dass die beiden Proteine dort miteinander interagieren, obwohl sie unter natürlichen Bedingungen nicht im selben Gewebe, Zellkompartiment oder zeitlich z.B. im selben Zellzyklus-Abschnitt exprimiert werden bzw. lokalisiert sind. Daher wurden die Interaktionen der Kandidaten des Yeast-Two-Hybrid-Screens mit UBXD1 auch in Säugerzellen überprüft, was eher den physiologischen Bedingungen entspricht. Dafür wurden verschiedene Varianten von UBXD1 als FLAG-Fusions-Proteine zusammen mit den myc-Epitop-markierten Kandidaten in HEK293T-Zellen überexprimiert und aus den Zelllysaten durch eine FLAG- bzw. myc-Immunpräzipitation angereichert. Die erhaltenen Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im anschließenden Western Blot auf die myc- bzw. FLAG-Epitop-markierten Interaktionspartner untersucht.



**Abbildung 10: UBXD1 interagiert mit A20 in HEK293T-Zellen.** **A** HEK293T-Zellen wurden mit unterschiedlichen pCMV-2B-UBXD1-Plasmiden und mit pCMV-3B-A20-Plasmid transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Epitop-markierten Proteine über Nacht mit anti-FLAG-Agarose präzipitiert. Die erhaltenen Proteinkomplexe wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und per Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Patrik Kehler durchgeführt (Kehler, 2012). **B** wie **A**, aber die Präzipitation erfolgte mit anti-myc-beads. Die Detektion von FLAG-UBXD1 erfolgte mit einem sekundären Antikörper, der spezifisch an die leichte Kette des primären Antikörpers bindet.

Die Ergebnisse der Ko-Immünpräzipitation zeigen, dass UBXD1 mit A20 in Abhängigkeit einer funktionellen PUB-Domäne interagiert (Abb. 10A). Es konnte zum ersten Mal eine stabile Interaktion zwischen UBXD1 und A20 in Säugerzellen nachgewiesen werden. Während A20 mit UBXD1<sup>WT</sup> und UBXD1<sup>RL</sup> interagiert, konnte keine Bindung von A20 zu UBXD1<sup>5xPUB</sup> oder UBXD1<sup>RL,5xPUB</sup> detektiert werden. Dass auch eine Interaktion von UBXD1<sup>WT</sup> mit immunpräzipitierten A20 nachweisbar ist, bestätigt die Spezifität dieser Interaktion (Abb. 10B). Die Ko-Immünpräzipitationen bestätigen weiter die Ergebnisse der Yeast-Two-Hybrid-Versuche (Abb. 9). Der Verlust der Interaktion von A20 mit UBXD1<sup>5xPUB</sup> und UBXD1<sup>RL,5xPUB</sup> lässt mehrere Interpretationsmöglichkeiten offen. Es könnte sein, dass A20 direkt an die PUB-Domäne von UBXD1 bindet oder die Bindestelle Teile der PUB-Domäne umfasst und eine der Mutationen diese Bindestelle zerstört. Weiter ist möglich, dass A20 nur an einen Komplex von UBXD1 und p97 bindet, wenn p97 an die PUB-Domäne von UBXD1 gebunden ist und den Komplex so stabilisiert. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass in der Immunpräzipitation von A20 kein p97 nachweisbar ist (Abb. 10B).



**Abbildung 11: UBXD1 interagiert mit TRIAD3A in HEK293T-Zellen.** **A** HEK293T-Zellen wurden mit unterschiedlichen pCMV-2B-UBXD1-Plasmiden und mit pCMV-3B-TRIAD3A-Plasmid transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Epitop-markierten Proteine über Nacht mit anti-FLAG-Agarose präzipitiert. Die erhaltenen Proteinkomplexe wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und per Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Patrik Kehler durchgeführt (Kehler, 2012). **B** wie **A**, aber die Präzipitation erfolgte mit anti-myc-beads. Die Detektion von FLAG-UBXD1 erfolgte mit einem sekundären Antikörper, der spezifisch an die leichte Kette des primären Antikörpers bindet.

Im Gegensatz zu A20, interagiert TRIAD3A mit allen getesteten UBXD1-Varianten im Säugersystem (Abb. 11A). Auch hier wurde zum ersten Mal eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen und die Ergebnisse der Yeast-Two-Hybrid-Experimente bestätigt (Abb. 9). Dadurch, dass die Interaktion sowohl mit UBXD1<sup>WT</sup> als auch mit UBXD1<sup>5xPUB</sup>, UBXD1<sup>RL</sup> und UBXD1<sup>RL,5xPUB</sup> stattfindet und keine Abhängigkeit einer p97-Bindung vorhanden ist, ist die Interaktion von TRIAD3A zu UBXD1 wahrscheinlich direkt. Wie auch für A20 war es möglich die Interaktion zu verifizieren, indem gezeigt werden konnte, dass auch UBXD1 mit immunpräzipitierten TRIAD3A interagiert (Abb. 11B)

Für ZFAND2B lies sich eine Interaktion des FLAG-Epitop-markierten Proteins mit endogenem p97 in FLAG-Immunpräzipitationen zeigen (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt die bekannte Interaktion zwischen ZFAND2B und p97 (Glinka et al., 2014) über ein VIM (Stapf et al., 2011). UBXD1 konnte in diesem Komplex nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Für SPG20 konnte als myc-Fusionsprotein eine Interaktion mit FLAG-UBXD1 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

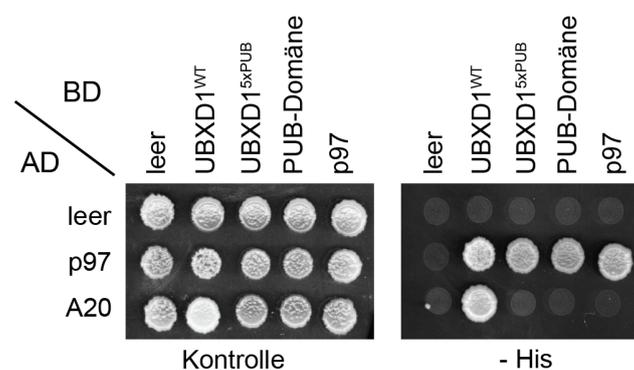
DZIP3 interagiert unter Standard-Zellkultur-Bedingungen nicht mit UBXD1 oder p97 in HEK293T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Es ist trotzdem nicht auszuschließen, dass DZIP3 und UBXD1 unter anderen Bedingungen oder in anderen Zelllinien

miteinander interagieren oder dass eine Interaktion nur transient erfolgt bzw. nur so wenige Moleküle interagieren, dass dies im Western Blot nicht nachweisbar ist.

Insgesamt wurden mit diesen Versuchen drei neue Bindungspartner von UBXD1 identifiziert bzw. verifiziert. Aufgrund der interessanten Interaktionsmuster (Abb. 9 und Abb. 10) von A20 mit UBXD1 wurde in weiteren Versuchen die Interaktion dieser beiden Proteine näher charakterisiert.

### 3.1.3 Rolle der PUB-Domäne für die Bindung von UBXD1 an A20

Durch die Ergebnisse des direkten Yeast-Two-Hybrid-Experiments und der Ko-Immunpräzitationen lag die Vermutung nahe, dass A20 mit der PUB-Domäne von UBXD1 interagiert. PUB-Domänen binden normalerweise an den C-Terminus von p97 (Allen et al., 2006; Kern et al., 2009), es wurde aber z.B. für HOIP gezeigt, dass es über seine PUB-Domäne auch mit Otulin (Elliott et al., 2014; Schaeffer et al., 2014; Takiuchi et al., 2014) und CYLD (Takiuchi et al., 2014) interagiert. Die Affinität von HOIP für Otulin ist dabei wesentlich höher als für p97 (Elliott et al., 2014). Es ist also durchaus vorstellbar, dass UBXD1 über seine PUB-Domäne neben p97 auch andere Interaktionspartnern bindet. Da es nicht möglich war, die isolierte PUB-Domäne FLAG-Epitop-markiert in HEK293T-Zellen zu exprimieren und zu immunpräzipitieren (Daten nicht gezeigt), wurden entsprechende Untersuchungen in Yeast-Two-Hybrid-Experimenten gemacht.



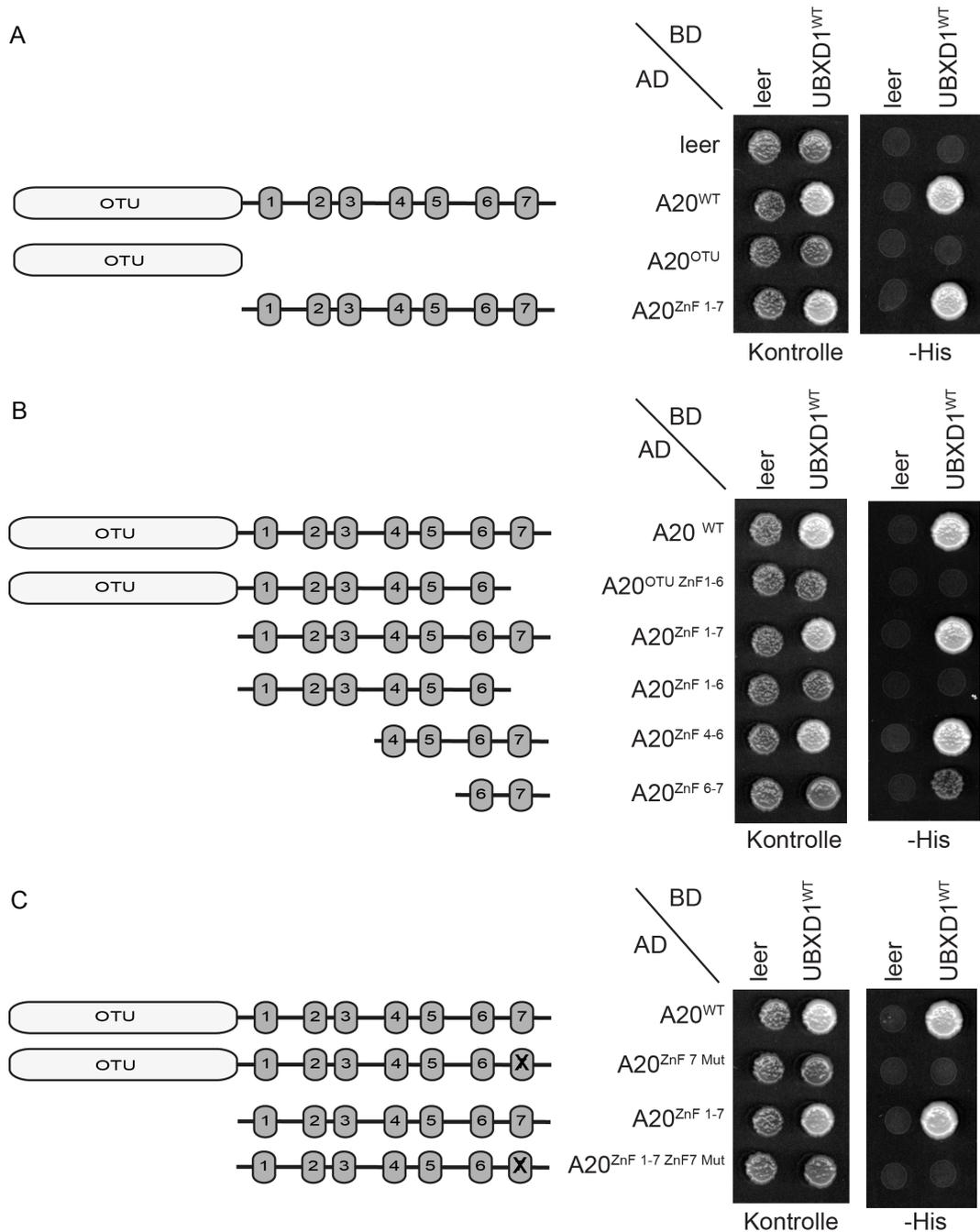
**Abbildung 12: Die PUB-Domäne von UBXD1 interagiert nicht mit A20.** Die die angegebenen Gal4-AD- und Gal4-BD-Fusionsproteine exprimierenden Hefezellen des Reporter-Stammes PJ69-4a wurden auf Kontroll- und Reporterplatten getüpfelt. Die linke Platte (Kontrolle) dient als Wachstumskontrolle, während Wachstum auf der rechten Platte (-His) auf Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen ist. Die Platten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert.

A20 interagiert in gerichteten Yeast-Two-Hybrid-Versuchen wie zu erwarten mit wildtypischen UBXD1 und nicht mit UBXD1<sup>5xPUB</sup>, aber nicht mit der isolierten PUB-Domäne (Abb. 12). Die Ergebnisse zeigen, dass die PUB-Domäne von UBXD1 für eine Interaktion mit A20 notwendig, aber nicht hinreichend ist. Eine Fehlfaltung

der isolierten PUB-Domäne in der Hefe ist unwahrscheinlich, da eine Interaktion der PUB-Domäne mit p97 nachweisbar ist (Abb. 12).

#### **3.1.4 Charakterisierung der Interaktion zwischen A20 und UBXD1**

Um die Interaktion zwischen UBXD1 und A20 weiter zu charakterisieren, wurde als nächstes die mögliche Interaktionsregion von A20 näher untersucht. A20 verfügt über eine N-terminale OTU-Domäne (Wertz et al., 2004; Lin et al., 2008), sowie über sieben charakteristische Zinkfinger-Motive (Opiari et al., 1990). Um zu bestimmen, an welche Region von A20 UBXD1 bindet, wurden verschiedene trunkierte Varianten von A20 hergestellt und auf ihre Interaktionsfähigkeit mit UBXD1<sup>WT</sup> im Yeast-Two-Hybrid-Versuch getestet.



**Abbildung 13: UBXD1 bindet das siebte Zinkfinger-Motiv von A20.** Die die angegebenen Gal4-AD- und Gal4-BD-Fusionsproteine exprimierenden Hefezellen des Reporter-Stammes PJ69-4a wurden auf Kontroll- und Reporterplatten getüpfelt. Die linke Platte (Kontrolle) dient als Wachstumskontrolle, während Wachstum auf der rechten Platte (-His) auf Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen ist. Die Platten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert. (Diese Experimente wurden von Michael Enders im Rahmen einer Bachelor-Arbeit durchgeführt (Enders, 2015)).

Mittels dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass UBXD1 spezifisch an die Zinkfinger-Motive von A20 bindet, nicht jedoch an die N-terminale OTU-Domäne (Abb. 13A). Innerhalb der Zinkfinger-Motive führt eine Verkürzung um das letzte, siebte Motiv dazu, dass die Interaktion mit UBXD1 verloren geht (Abb. 13B). Kürzere Fragmente, die nur die Zinkfinger-Motive vier bis sieben bzw. sechs und sieben enthalten, binden noch an UBXD1 (Abb. 13B). Zusätzlich wurden A20-Varianten

hergestellt, bei denen zwei der Cysteine des letzten Zinkfingers gegen Alanin ausgetauscht wurden. Das strukturstabilisierende Zink-Ion kann dadurch nicht mehr gebunden werden und das siebte Zinkfinger-Motiv verliert so seine Struktur. In Übereinstimmung mit den Deletionsmutanten A20<sup>OTU Znf1-6</sup> und A20<sup>Znf1-6</sup> (Abb. 13B) ist auch diese A20-Variante bzw. eine verkürzte Variante ohne die OTU-Domäne nicht mehr in der Lage UBXD1 zu binden (Abb. 13C). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass das siebte Zinkfinger-Motiv von A20 notwendig ist, um eine Interaktion zwischen A20 und UBXD1 zu vermitteln.

### **3.2 Rolle von p97 und unterschiedlichen p97-Kofaktoren im NF- $\kappa$ B-Signalweg**

Da sowohl TRIAD3A als auch A20 unterschiedliche Funktionen im NF- $\kappa$ B-Signalweg haben (Song et al., 1996; Chen et al., 2002; Mauro et al., 2006; Shembade et al., 2009; Bosanac et al., 2010; Miah et al., 2011; Skaug et al., 2011), stellte sich die Frage, ob auch UBXD1 eine Rolle in diesem Signalweg spielt.

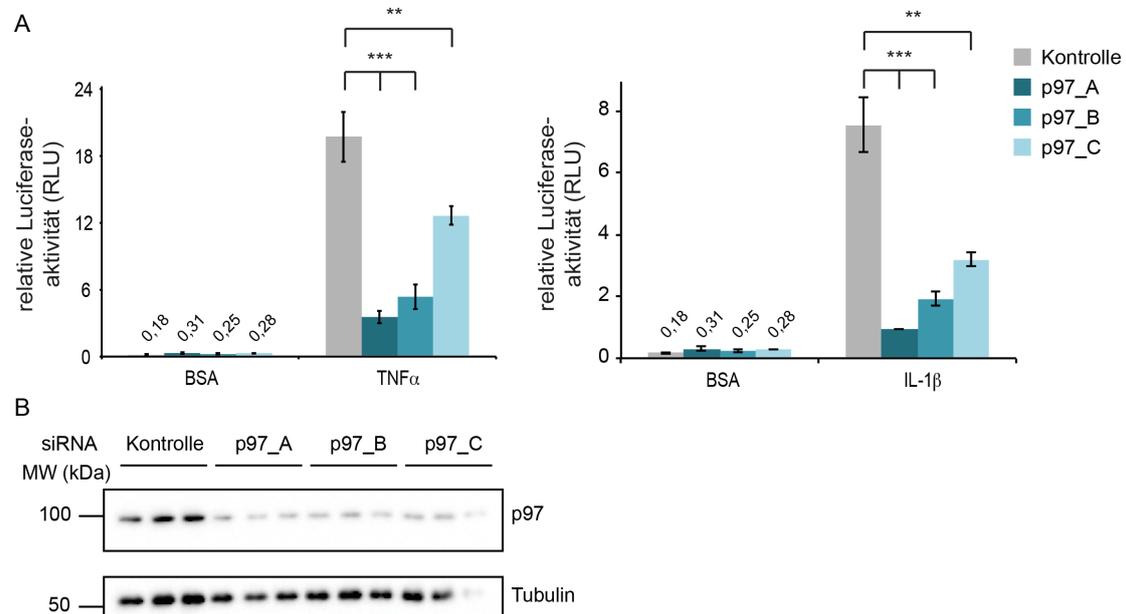
Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde als erstes ein Reporter-gen-System daraufhin untersucht, ob es geeignet ist, die Einflüsse von p97 und seinen Kofaktoren auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg zuverlässig zu analysieren.

In Säugerzellen führt die siRNA-vermittelte Depletion von p97 zur Beeinträchtigung der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges (Li et al., 2014). p97 bindet dabei an I $\kappa$ B $\alpha$ , wenn dieses in ubiquitinierte Form vorliegt, und vermittelt so den proteasomalen Abbau des Inhibitors (Dai et al., 1998; Li et al., 2014). Im Folgenden sollte dieser Befund anhand von Reporter-gen-Experimenten überprüft werden. Dafür wurde die Zelllinie HeLa 57A verwendet. Diese Zelllinie exprimiert stabil das Reportgen Luciferase, das durch einen NF- $\kappa$ B-abhängigen Promotor reguliert wird (Rodriguez et al., 1999). Im Promoter befinden sich hierfür drei synthetische Kopien der NF- $\kappa$ B-Bindestelle aus dem Promoter der Immunglobulin- $\kappa$ -Kette (Arenzana-Seisdedos et al., 1993). Zusätzlich exprimieren diese Zellen konstitutiv  $\beta$ -Galaktosidase, deren Aktivitätsbestimmung somit eine Normalisierung des Luciferase-Signals erlaubt (Rodriguez et al., 1999).

#### **3.2.1 Einfluss von p97 auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges**

Zur Überprüfung der Bedeutung von p97 bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges wurden HeLa 57A-Zellen mit unterschiedlichen siRNAs gegen p97 transfiziert. Anschließend wurde die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach Stimulation mit

TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch die Messung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase-Expression bestimmt. Durch die Verwendung unterschiedlicher siRNAs gegen p97 sollten zudem *off-target*-Effekte einer einzelnen siRNA ausgeschlossen werden (Petri und Meister, 2013).



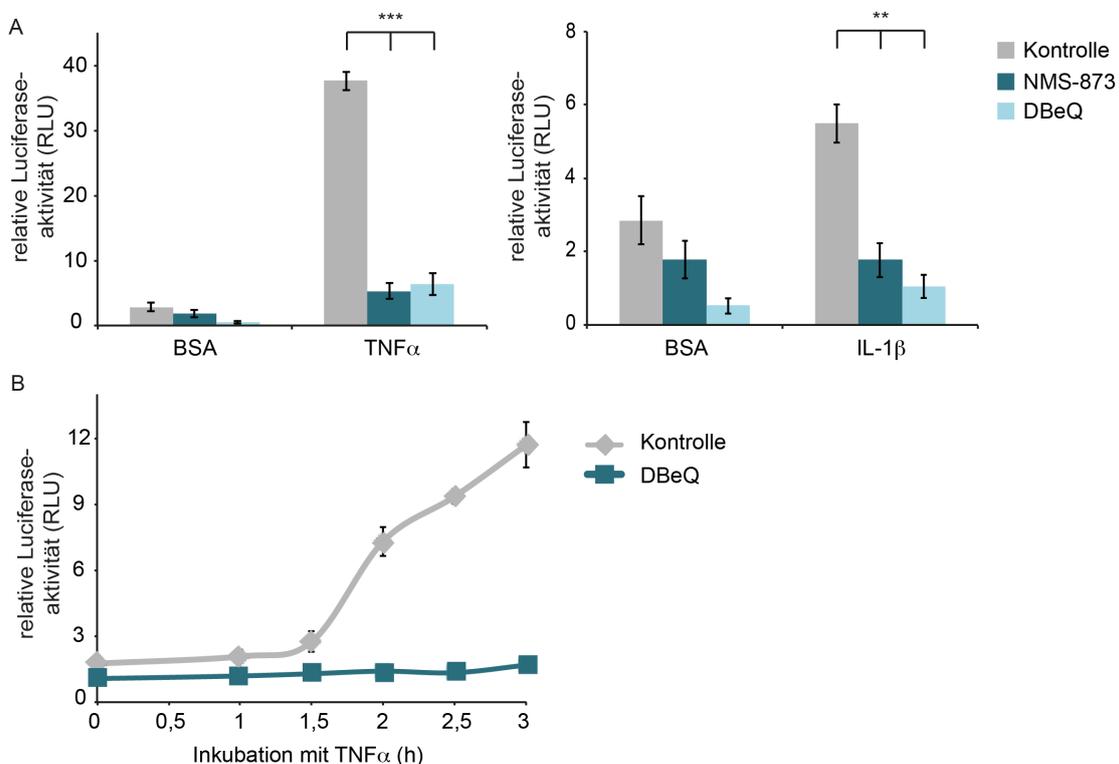
**Abbildung 14: SiRNA-vermittelte Depletion von p97 reduziert die Expression der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase nach Stimulation mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  in HeLa 57A-Zellen. A** HeLa 57A-Zellen wurden mit unterschiedlichen siRNAs gegen p97 bzw. GFP (Kontrolle) transfiziert (25-nM). 72 Stunden später wurden die Zellen für sechs Stunden mit 20-ng/ml TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  stimuliert und dann lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001. **B** Nachweis der Depletion von p97 durch Western Blot von Gesamtextrakten aus Versuch A. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die TNF $\alpha$ -induzierte Expression des Reportergens ist nach Depletion von p97 stark reduziert (Abb. 14). Dies ist aufgrund der Beeinträchtigung der  $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation nach siRNA vermittelter Depletion von p97 zu erwarten (Li et al., 2014) und bestätigt Ergebnisse aus transienten Reportergen-Experimenten (Blenski, 2014; Li et al., 2014). Zellen, die mit unterschiedlichen siRNAs gegen p97 transfiziert wurden, zeigen alle eine Reduktion der Reportergenexpression (Abb. 14), daher kann nahezu ausgeschlossen werden, dass es sich um einen *off-target*-Effekt handelt. Zusätzlich zeigen p97-depletierte HeLa 57A-Zellen auch eine Beeinträchtigung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Reportergenexpression nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  (Abb. 14). Dieses Ergebnis bestätigt erstmals auf transkriptioneller Ebene eine reduzierte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach IL-1 $\beta$ -Stimulation, was vermutlich ebenfalls auf die Akkumulation von ubiquitiniertem  $\kappa$ B $\alpha$  nach IL-1 $\beta$ -Stimulation bei Depletion von p97 zurückzuführen ist (Li et al., 2014). Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse eine essenzielle Rolle von p97 bei der Aktivierung des

NF- $\kappa$ B-Signalweges. Außerdem zeigen sie, dass Messungen der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferaseexpression in HeLa 57A-Zellen robust und reproduzierbar auch nach siRNA-vermittelter Depletion von Proteinen funktionieren.

### 3.2.2 Einfluss der chemischen Inhibition von p97 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg

Bislang wurde der Einfluss von p97 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg nur durch Experimente nach siRNA-vermittelter Depletion von p97 untersucht. Verringerte zelluläre Level von p97 haben aber unter Umständen negative Auswirkungen auf Zellwachstum und Lebensfähigkeit (Daten nicht gezeigt; Blenski, 2004), da p97 zahlreiche essenzielle Funktionen in der Zelle erfüllt. Es ist also möglich, dass manche Versuchsergebnisse mit solchen Zellen auf sekundäre Effekte zurückzuführen sind. Als Alternative kann die ATPase-Aktivität von p97 chemisch durch den reversiblen Inhibitor DBeQ (Chou et al., 2011) oder den allosterischen Inhibitor NMS-873 (Magnaghi et al., 2013) gehemmt werden. Dies hat den Vorteil, dass kurzzeitige Effekte untersucht werden können, während bei einer siRNA-vermittelten Depletion über mehrere Tage hin weg sekundäre Effekte in den Zellen akkumulieren können. Daher wurde als nächstes die NF- $\kappa$ B-abhängige Luciferaseaktivität in HeLa 57A-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen p97-Inhibitoren untersucht.



**Abbildung 15: Kurzzeitige Inhibition von p97 beeinflusst den NF- $\kappa$ B-Signalweg.** A HeLa 57A-Zellen wurden für 1,5 Stunden mit den beiden p97-Inhibitoren NMS-873 (5  $\mu$ M) und DBeQ (10  $\mu$ M) bzw.

DMSO (Kontrolle) behandelt und anschließend zusätzlich mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  (links) oder 10 ng/ml IL-1 $\beta$  (rechts) für 3 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 **B** HeLa 57A-Zellen wurden 1,5 Stunden mit DBeQ (10  $\mu$ M) bzw. DMSO behandelt und danach zusätzlich über den angegebenen Zeitraum mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. Anschließend wie unter **A**.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen nach Depletion von p97 (Abb. 14), kommt es auch nach kurzzeitiger p97-Inhibition zu einer Beeinträchtigung des NF- $\kappa$ B-Signalweges, sowohl nach Stimulation mit TNF $\alpha$  als auch mit IL-1 $\beta$  (Abb. 15A). Dies konnte mit zwei unterschiedlich wirkenden Inhibitoren gezeigt werden. Die Inhibition von p97 mit 10 $\mu$ M NMS-873 hatte eine noch deutlichere Reduktion der Reporterexpression zur Folge (Daten nicht gezeigt). Hiermit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der negative Effekt einer p97-Depletion auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nicht auf sekundäre Effekte zurückzuführen ist, sondern direkt durch das Fehlen der Aktivität von p97 hervorgerufen wird.

Beobachtet man die NF- $\kappa$ B-abhängige Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer mit TNF $\alpha$ , so fällt auf, dass diese in Kontrollzellen bereits nach 1,5 bis zwei Stunden deutlich ansteigt (Abb. 15B). HeLa 57A-Zellen, die mit DBeQ behandelt wurden, zeigen dagegen über einen Zeitraum von drei Stunden keinen merklichen Anstieg in der Expression des NF- $\kappa$ B-abhängigen Reportergen (Abb. 15B). Das zeigt, dass p97 direkt die Signalstärke des NF- $\kappa$ B-Signalweges beeinflusst, aber keinen Effekt auf die Kinetik der Aktivierung hat.

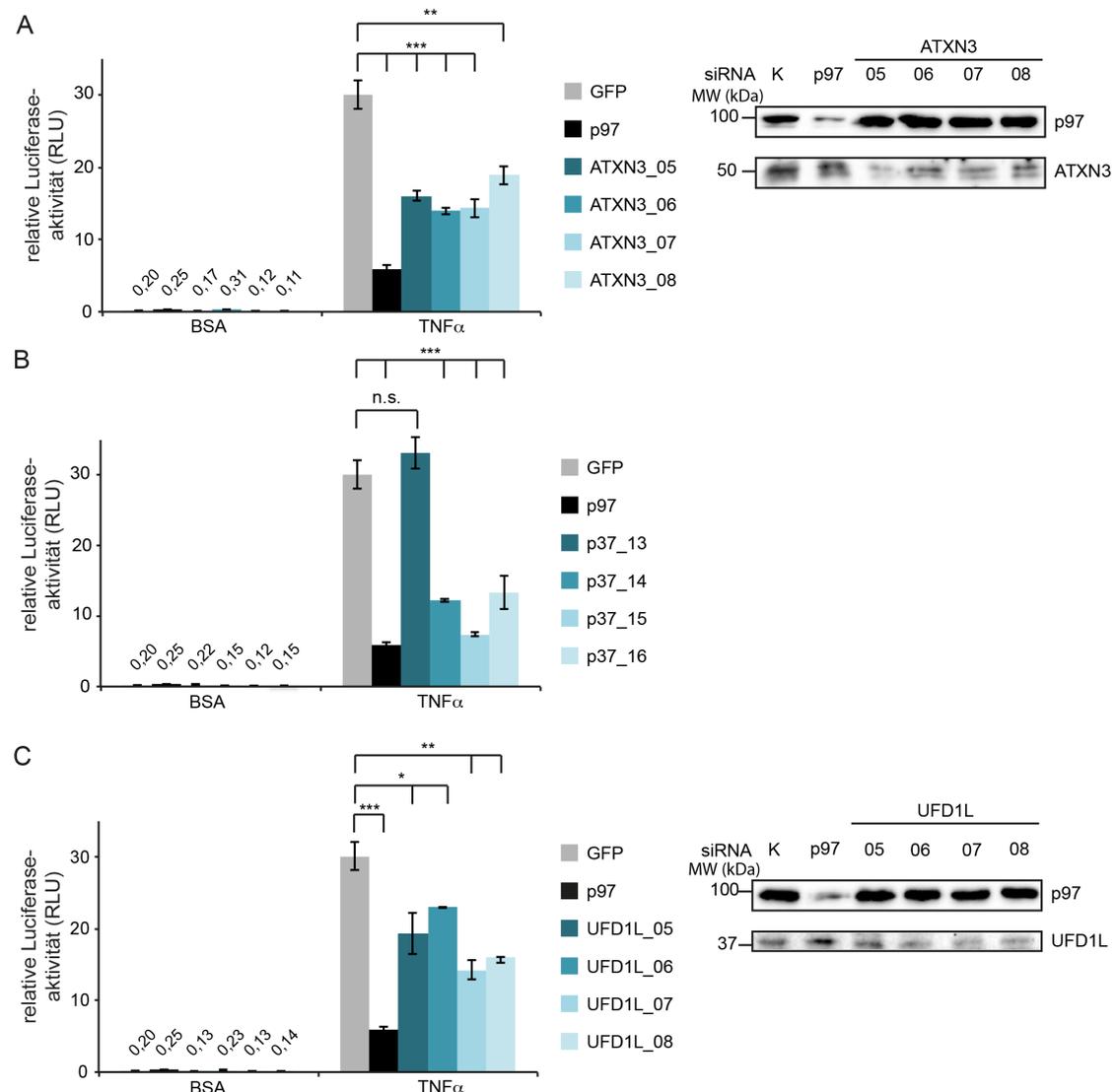
Insgesamt bestätigen die Ergebnisse, dass p97 eine essenzielle Rolle in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges spielt und dass hierfür die ATPase-Aktivität von p97 benötigt wird.

### **3.2.3 Einfluss unterschiedlicher Kofaktoren von p97 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg**

In einem Mikroskopie-basierten siRNA-Screen zur Identifikation von p97-Kofaktoren, die einen Einfluss auf die Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors p65 nach Stimulation mit TNF $\alpha$  haben, wurden mehrere p97-Kofaktoren ermittelt, die diese Kerntranslokation positiv beeinflussen (Blenski, 2014). Die beiden stärksten Kandidaten aus diesem Screen waren Ataxin-3 und p37. Bei Ataxin-3 handelt es sich um ein DUB, von dem gezeigt worden ist, dass es zusammen mit p97 eine Funktion in der Retrotranslokation von ERAD-Substraten hat (Wang et al., 2006; Zhong und Pittman, 2006). Der Kofaktor p37 wurde bisher in Zusammenhang mit dem Aufbau des Golgi-Apparates und des ER nach der Mitose (Uchiyama et al., 2006) bzw. dem Abbau des Golgis während der Mitose (Kaneko et al., 2010) beschrieben. UFD1L

und NPL4 sind die beiden p97-Kofaktoren, die die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  vermitteln (Li et al., 2014). Allerdings führte die Depletion einer dieser beiden Kofaktoren im Mikroskopie-basierten siRNA-Screen zu keiner signifikanten Reduktion der Kerntranslokation von p65 (Blenski, 2014). Um die vorhandenen siRNAs zu validieren, sollte auch für die Depletion von UFD1L der Effekt auf die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression des Reportergens in HeLa 57A-Zellen bestimmt werden.

Der Einfluss von Ataxin-3, p37 und UFD1L auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges wurde nach Stimulation mit TNF $\alpha$  in HeLa 57A-Zellen untersucht. Dabei wurden jeweils vier unterschiedliche siRNAs verwendet, um *off-target*-Effekte des im Screen verwendeten siRNA-pools aus vier unterschiedlichen siRNAs auszuschließen. Als Positiv-Kontrolle wurde parallel auch p97 depletiert.



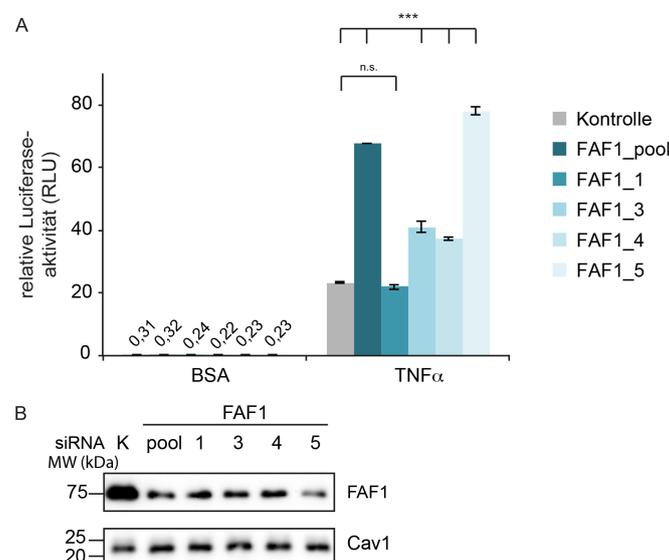
**Abbildung 16: Der NF- $\kappa$ B-Signalweg wird von unterschiedlichen p97-Kofaktoren reguliert.** A HeLa 57A-Zellen wurden mit unterschiedlichen siRNAs gegen Ataxin-3 (ATXN3), p97 (siRNA A und B) oder GFP (Kontrolle) transfiziert (25 nM) und nach 3 Tagen mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert und

anschließend lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (links). Die Depletion von p97 und Ataxin-3 wurde im Western Blot kontrolliert (rechts). **B** wie unter **A**, aber mit siRNAs gegen p37. Ein Antikörper gegen p37 für einen Western Blot stand nicht zur Verfügung. **C** wie unter **A**, aber mit siRNAs gegen UFD1L.

Die Ergebnisse der Western Blots zeigen, dass die gegen Ataxin-3 und UFD1L verwendeten siRNAs alle zu einer Reduktion des entsprechenden Proteins in den transfizierten HeLa 57A-Zellen geführt haben (Abb. 16A und Abb. 16C). Dabei war die Depletion von Ataxin-3 nach Verwendung der siRNA ATXN3\_05 etwas stärker als nach den anderen siRNAs gegen Ataxin-3. Für die Depletion von UFD1L war die siRNA UFD1L\_05 weniger geeignet als die anderen drei verwendeten siRNAs. Insgesamt war die erreichte Reduktion des Proteinlevels von UFD1L auch weniger stark als für Ataxin-3. Für die Analyse der p37-Depletion konnte kein Western Blot angefertigt werden, da kein funktionierender Antikörper zu Verfügung stand.

Die Depletion von den beiden Kandidaten Ataxin-3 und p37 führte in den Reporter-Experimenten für die Mehrheit der verwendeten siRNAs zu einer deutliche Reduzierung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression der Luciferase nach TNF $\alpha$ -Stimulation (Abb. 16A und 16B). Für p37 zeigte eine siRNA (p37\_13) keine Reduzierung der Expression des Reportergens. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die siRNA nicht funktionell ist und somit zu keiner ausreichenden Reduzierung der Proteinlevels von p37 führt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass beide Kandidaten aus dem Mikroskopie-basierten siRNA-Screen an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges beteiligt sind. Die Transfektion mit einem Gemisch aus den aktiven siRNAs gegen beide Kandidaten führte auch nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu einem verminderten Luciferasesignal im Vergleich zu Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt). Für beide Kandidaten ist also anzunehmen, dass sie eine generelle Funktion in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges haben. Dies konnte durch die Reporter-Versuche mit unterschiedlichen siRNAs zum ersten Mal gezeigt werden. Für UFD1L wurde publiziert, dass es an der Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  beteiligt ist (Li et al., 2014). Wie im siRNA-Screen führte eine Depletion allerdings auch in den Reporter-Experimenten zu einem geringen Unterschied in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges (Abb. 16C). Dies korreliert mit einer insgesamt schlechten Effizienz der Depletion, wie die noch vorhandenen Proteinmengen von UFD1L im Western Blot zeigen. Wahrscheinlich sind auch die unerwartet niedrigen Einflüsse auf die p65-Kerntranslokation im siRNA-Screen auf eine geringe Depletion von UFD1L zurückzuführen. Ob dies an einer zu geringen Konzentration der siRNA oder der Proteininstabilität von UFD1L liegt, kann aufgrund von den durchgeführten Experimenten nicht entschieden werden.

Zusätzlich zu UFD1L und NPL4 wurden auch für den p97-Kofaktor FAF1 Funktionen im NF- $\kappa$ B-Signalweg postuliert: FAF1 reguliert die Aktivität des IKK und hat so einen direkten Einfluss auf die Phosphorylierung und damit Degradation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  (Park et al., 2007). Zusätzlich wurde gezeigt, dass FAF1 nach Stimulation von Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  mit p65 interagiert (Park et al., 2004). FAF1 reguliert den NF- $\kappa$ B-Signalweg negativ. Im Mikroskopie-basierten siRNA-Screen war die Kerntranslokation von p65 nach Stimulation der Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  und gleichzeitiger Depletion von FAF1 nur minimal höher als die Kerntranslokation von p65 in Kontrollzellen (Blenski, 2014). Daher wurde auch FAF1 in HeLa 57A-Zellen depletiert und die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression der Luciferase bestimmt.



**Abbildung 17: FAF1 hat einen inhibitorischen Effekt auf den  $\text{TNF}\alpha$ -aktivierten NF- $\kappa$ B-Signalweg.** **A** HeLa 57A Zellen wurden mit unterschiedlichen siRNAs gegen FAF1 bzw. GFP (Kontrolle) transfiziert (50 nM) und 48 Stunden später mit 10 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  für 6 Stunden stimuliert. Anschließend wurden Lysate hergestellt. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . **B** Western Blot zur Kontrolle der FAF1-Depletion.

Eine siRNA-vermittelte Depletion von FAF1 führt zu einer erhöhte NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression der Luciferase in HeLa 57A-Zellen nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  (Abb. 17A). Dies gilt allerdings nicht für die Depletion von FAF1 durch die siRNA FAF1\_1, obwohl auch in diesem Fall der Western Blot zeigt, dass die Menge an FAF1 in den Zelllysaten reduziert war (Abb. 17B). Für die Stimulation mit  $\text{IL-1}\beta$  zeigte sich dagegen kein durchgängiger Trend für die unterschiedlichen siRNAs (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse des Reporter-gen-Experiments bestätigen somit, dass FAF1 ein negativer Regulator des  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten NF- $\kappa$ B-Signalweges ist.

Mit diesen Ergebnissen (Abb. 16 und Abb. 17) konnte erstmals gezeigt werden, dass unterschiedliche zusätzliche Kofaktoren von p97 an der Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges beteiligt sind.

Als positive Regulatoren wirken neben dem schon bekannten Kofaktor UFD1L auch die beiden p97-Kofaktoren p37 und Ataxin-3. Für FAF1 konnte dagegen eine negativ-regulierende Rolle nach Stimulation mit TNF $\alpha$  bestätigt werden. Daraus lässt sich folgern, dass p97 im Komplex mit unterschiedlichen Kofaktoren vielfältige Funktionen im NF- $\kappa$ B-Signalweg hat, die wahrscheinlich über die Degradation von ubiquitinierten I $\kappa$ B $\alpha$  (Li et al., 2014) hinausgehen.

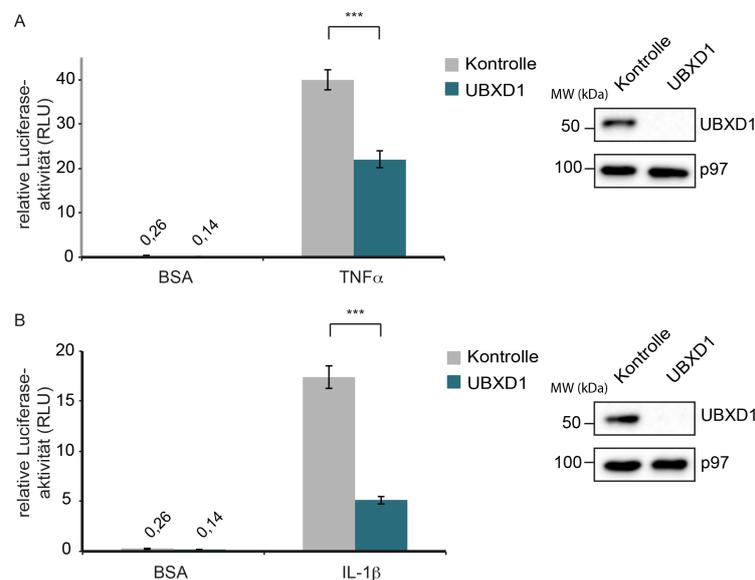
### 3.3 Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch UBXD1

Interessanterweise konnte mit A20 und TRIAD3A zwei neue Bindungspartner von UBXD1 identifiziert werden, die beide eine Rolle im NF- $\kappa$ B-Signalweg spielen. Die Transkription von A20 wird nach Stimulation von Zellen mit TNF $\alpha$  induziert (Opipari et al., 1990), A20 selbst spielt dann eine Rolle bei der Deaktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Song et al., 1996; Mauro et al., 2006; Shembade et al., 2009; Bosanac et al., 2010; Skaug et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass A20 mit unterschiedlichen Proteinen der Signalkaskade interagiert, hierzu gehören RIP1, TRAF6, TRAF2 und NEMO (Boone et al., 2004; Li et al., 2008a; Lin et al., 2008; Wertz und Dixit, 2010; Skaug et al., 2011). Der genaue molekulare Mechanismus, wie A20 den NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich werden unterschiedliche Schritte der Signalkaskade von A20 beeinflusst. Die E3-Ubiquitin-Ligase TRIAD3A inaktiviert ebenfalls den NF- $\kappa$ B-Signalweg nach Stimulation mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Chen et al., 2002; Miah et al., 2011), indem sie den proteolytischen Abbau von TRAF3 (Nakhaei et al., 2009) und unterschiedlichen Rezeptoren wie den *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) TLR4 und TLR9 sowie dem *killer-cell-Immunoglobulin-like*-Rezeptor fördert (Miah et al., 2011). Daher stellte sich die Frage, ob auch UBXD1 den NF- $\kappa$ B-Signalweg reguliert. Durch die Charakterisierung der Reportergergen-Zelllinie HeLa 57A war es möglich, diese Fragestellung anhand von Messungen der NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression der Luciferase zu bearbeiten.

#### 3.3.1 Einfluss von UBXD1 auf den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg

Um zu ermitteln, ob UBXD1 eine Rolle im kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt, wurde UBXD1 in HeLa 57A-Zellen durch siRNA depletiert. Anschließend wurden die

Zellen mit TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  stimuliert, um die NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression des Reportergens zu aktivieren.

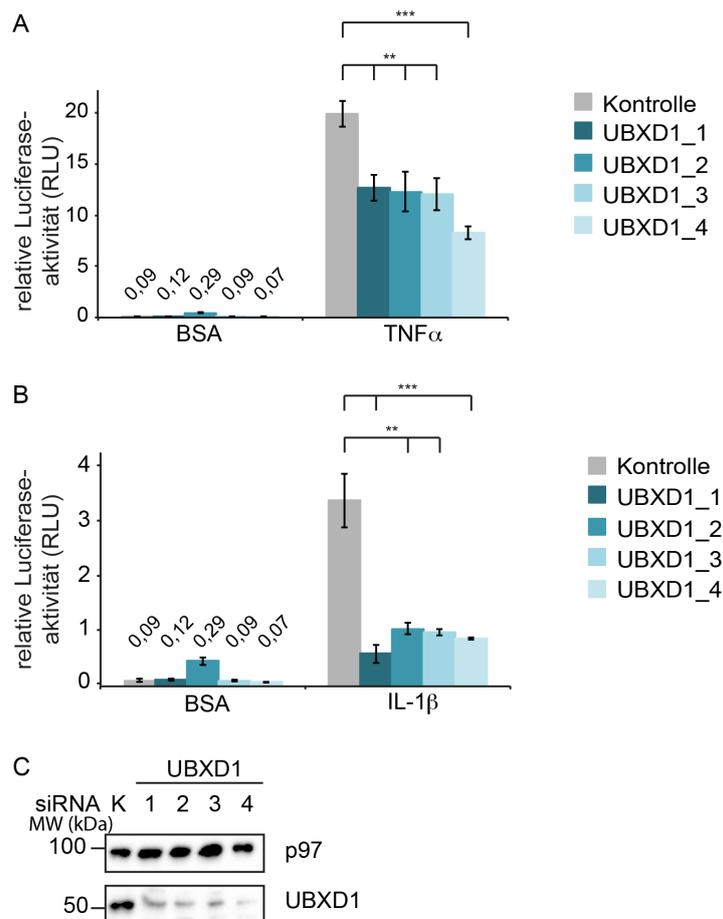


**Abbildung 18: UBXD1 reguliert den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg.** **A** HeLa 57A-Zellen wurden mit siRNA 3 und 4 gegen UBXD1 bzw. GFP (Kontrolle) transfiziert (10 nM) und drei Tage später mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  für 6 Stunden stimuliert und anschließend lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidase normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001. Die Depletion von UBXD1 wurde im Westen Blot analysiert. **B** wie **A**, aber die Stimulation erfolgte mit 20 ng/ml IL-1 $\beta$ .

HeLa 57A Zellen aktivierten nach Stimulation mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  wie zu erwarten den NF- $\kappa$ B-Signalweg. Die Depletion von UBXD1 hingegen führte jeweils zu einer signifikanten Reduktion der Expression des Reportergens (Abb. 18). Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass eine effiziente Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges in UBXD1-depletierten Zellen nicht möglich ist und legen nahe, dass UBXD1 eine aktivierende Rolle im kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg erfüllt.

### 3.3.2 Spezifität des Einflusses von UBXD1 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg

Um einen *off-target*-Effekt der verwendeten siRNAs auszuschließen, wurden die Reportergen-Versuche mit unterschiedlichen siRNAs gegen UBXD1 wiederholt.

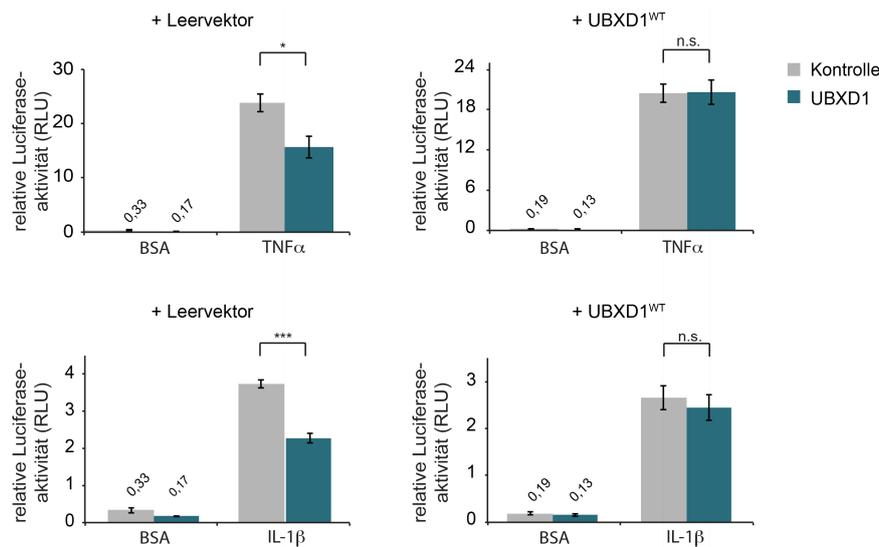


**Abbildung 19: Spezifität des Effektes der Depletion von UBXD1 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg.** **A** HeLa 57A Zellen wurden mit unterschiedlichen siRNAs gegen UBXD1 bzw. GFP (Kontrolle) transfiziert (20 nM). Nach 52 Stunden wurden die Zellen mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  für 6 Stunden stimuliert und anschließend lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde gegen  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . **B** wie A, aber die Stimulation erfolgte mit 20 ng/ml IL-1 $\beta$ . **C** Western Blot zur Kontrolle der Depletion von UBXD1, p97 diente als Ladekontrolle.

Transfektion von HeLa 57A-Zellen mit jeweils einer von vier unterschiedlichen siRNAs gegen UBXD1 führte in allen Fällen zu einer Reduktion von UBXD1 in den Zelllysaten (Abb. 19). Die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression der Luciferase war in UBXD1-depletierten Zellen deutlich geringer als in Kontrollzellen (Abb. 19). Dies war sowohl nach Stimulation mit TNF $\alpha$  als auch mit IL-1 $\beta$  der Fall. Damit konnte gezeigt werden, dass die Depletion von UBXD1 spezifisch zu einer verminderten Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg führt und keine *off-target*-Effekte für diese Reduktion verantwortlich sind.

Die Spezifität des beobachteten Effekts für UBXD1 sollte zusätzlich durch ein Komplementierungs-Experiment belegt werden (Petri und Meister, 2013). Dafür wurden durch die Einführung stiller Mutationen UBXD1-Plasmide hergestellt, die für

eine siRNA-resistente mRNA von UBXD1 kodieren. Ihre mRNA-Sequenz kodiert für dieselbe Aminosäure-Abfolge im Protein, wird aber durch die Mutation nicht mehr von den siRNAs erkannt und abgebaut. Nach Transfektion von HeLa 57A-Zellen mit einer siRNA gegen UBXD1 wurden die Zellen am Folgetag mit den entsprechenden UBXD1-Plasmid oder einem Leervektor als Negativkontrolle transfiziert. 48 Stunden später wurde die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression der Luciferase nach Stimulation mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bestimmt.



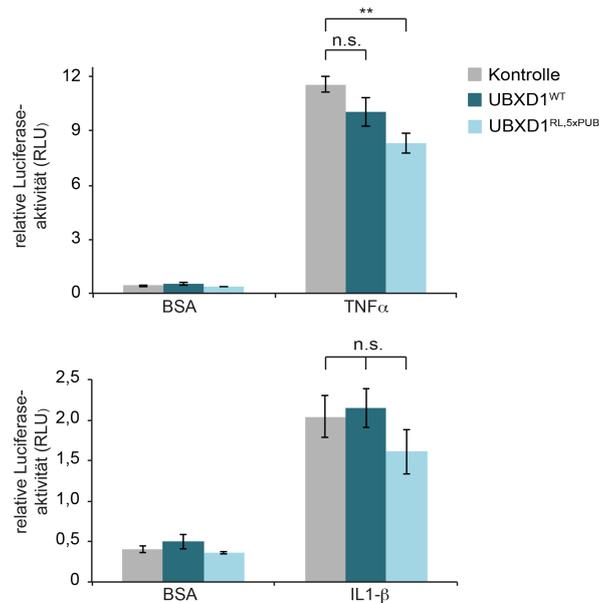
**Abbildung 20: Spezifität des Effektes der Depletion von UBXD1 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg.** A HeLa 57A Zellen wurden mit siRNA 4 gegen UBXD1 bzw. GFP (Kontrolle) transfiziert (20 nM). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Leervektor oder N-SF-TAP-UBXD1 transfiziert. Weitere 48 Stunden später wurden die Zellen mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  oder 20 ng/ml IL-1 $\beta$  für 6 Stunden stimuliert und anschließend lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001, n.s., kein signifikanter Unterschied.

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg in HeLa 57A-Zellen konnte nach der Depletion von UBXD1 wieder vollständig aktiviert werden, wenn die Zellen UBXD1<sup>WT</sup> von einer siRNA-resistenten mRNA exprimierten (Abb. 20). Dies galt sowohl für die Stimulation mit TNF $\alpha$  als auch mit IL-1 $\beta$ . Kontrollzellen, die mit Leervektor transfiziert wurden, zeigten weiterhin eine reduzierte Expression des Reportergens (Abb. 20). Dieses Experiment bestätigt die vorherigen Versuche (Abb. 18 und 19) und zeigt formal eindeutig, dass der Effekt der Depletion von UBXD1 spezifisch ist und kein *off-target*-Effekt der verwendeten siRNAs ist.

### 3.3.3 Einfluss der Überexpression von UBXD1 auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg

Die Überexpression eines Proteins hat häufig den gegenteiligen zellulären Effekt wie die Depletion des Proteins. Um festzustellen, ob die Überexpression von UBXD1<sup>WT</sup>

oder  $UBXD1^{RL,5xPUB}$  einen Einfluss auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges hat, wurden HeLa 57A-Zellen mit entsprechenden Plasmiden transfiziert und mit TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  stimuliert. Die Überexpression von  $UBXD1^{RL,5xPUB}$  sollte dabei als Indikator für eine mögliche Beteiligung von p97 dienen. Für den Fall, dass UBXD1 ein Substrat bindet, dann p97 rekrutiert und p97 auf dieses Substrat wirkt, sollte die Überexpression von  $UBXD1^{RL,5xPUB}$  einen dominant-negativen Effekt haben und den NF- $\kappa$ B-Signalweg ähnlich beeinflussen wie eine Depletion von UBXD1.



**Abbildung 21: Die Überexpression von  $UBXD1^{WT}$  hat keine Auswirkungen auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg.** HeLa 57A-Zellen wurden mit pCMV-2B-UBXD1-Plasmiden transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  oder 20 ng/ml IL-1 $\beta$  für 6 Stunden stimuliert und anschließend lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; n.s., kein signifikanter Unterschied.

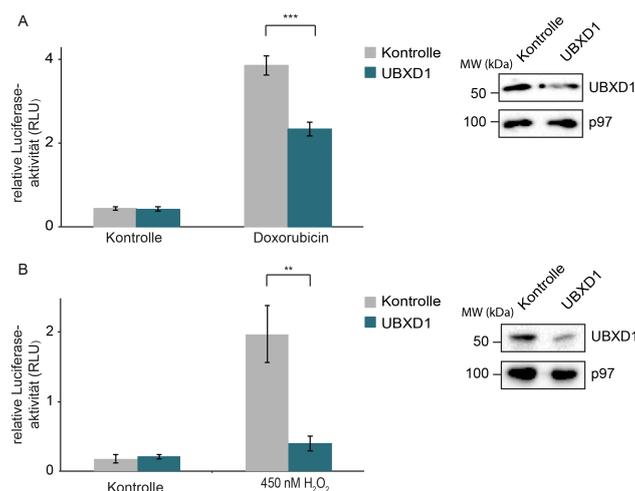
Die Überexpression von wildtypischen  $UBXD1^{WT}$  führte zu keiner Veränderung in der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferaseaktivität nach Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  (Abb. 21). Es ist also wahrscheinlich, dass UBXD1 alleine keine aktivierende Rolle im NF- $\kappa$ B-Signalweg hat, sondern einen Faktor oder Komplex reguliert könnte, der wiederum aktivierende oder inhibierende Funktion hat. Die Überexpression von  $UBXD1^{RL,5xPUB}$  führte im gezeigten Experiment zu einer leichten Reduktion in der Aktivität der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase nach Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$ . Dieser Effekt war aber nicht reproduzierbar (Kehler, 2012).

### 3.4 Nähere Charakterisierung der Rolle von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg

Im vorherigen Abschnitt konnte erstmalig eine Rolle für den p97-Kofaktor UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg nachgewiesen werden. Um mechanistische Aufschlüsse über die Funktion von UBXD1 in diesem Signalweg zu erlangen, wurde der Einfluss von UBXD1 auf unterschiedliche Schritte in der Signalkaskade untersucht.

#### 3.4.1 Einfluss von UBXD1 auf die Aktivierung des atypischen NF- $\kappa$ B-Signalweges

UBXD1 hat eine noch nicht vollständig charakterisierte Funktion im endolysosomalen System. Nach der Depletion von UBXD1 und gleichzeitiger Überexpression von Caveolin1, akkumuliert Caveolin1 in vergrößerten Endosomen anstatt wie in Kontrollzellen lysosomal abgebaut zu werden (Ritz et al., 2011; Kirchner et al., 2013). Durch die Verbindung von UBXD1 mit dem endolysosomalen System wäre es möglich, dass die reduzierte NF- $\kappa$ B-abhängige Expression des Reportergens nach Stimulation mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in UBXD1-depletierten Zellen auf Störungen in der Rezeptor-Endocytose zurückzuführen ist. Alternativ lässt sich der NF- $\kappa$ B-Signalweg aber auch unabhängig von Membran-Rezeptoren aktivieren. Solche Aktivierungswege werden als atypischer NF- $\kappa$ B-Signalweg zusammengefasst. Um den Einfluss von UBXD1 auf den atypischen NF- $\kappa$ B-Signalweg zu untersuchen, wurden HeLa 57A-Zellen nach siRNA vermittelter Depletion von UBXD1 mit Doxorubicin (Panta et al., 2004) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Storz und Toker, 2003) behandelt.



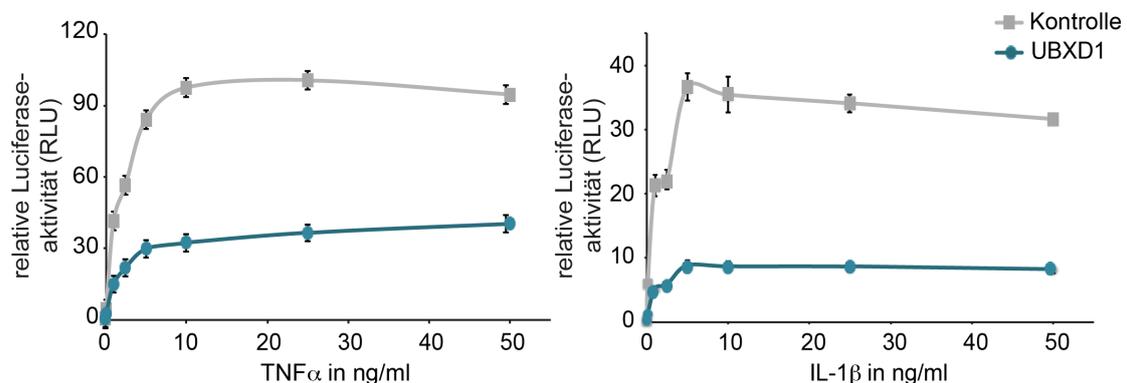
**Abbildung 22: UBXD1 reguliert den atypischen NF- $\kappa$ B-Signalweg.** **A** HeLa 57A-Zellen wurden mit siRNA 3 und 4 gegen UBXD1 bzw. GFP (Kontrolle) transfiziert (10 nM). Nach 52 Stunden wurden die Zellen für 20 Stunden mit Doxorubicin behandelt und anschließend lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,

$p < 0,001$  (links). Die Depletion von UBXD1 wurde im Western Blot kontrolliert (rechts). **B** wie unter **A**, aber die Behandlung erfolgte über 8 Stunden mit 450 nM  $H_2O_2$ .

Die Depletion von UBXD1 durch siRNA führte auch nach Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch Doxorubicin und  $H_2O_2$  zu einer signifikanten Reduktion der Expression der Luciferase (Abb. 22). Dies belegt, dass UBXD1 eine allgemeine Funktion im NF- $\kappa$ B-Signalweg hat und die verminderte Reporterogenaktivität nach TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Stimulation nicht auf sekundäre Effekte durch Störungen des endolysosomalen Systems, die sich auf die Rezeptoren ausgewirkt haben, zurückzuführen ist.

### 3.4.2 Dose-response-Kurven und zeitliche Abhängigkeit der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach UBXD1-Depletion

Um festzustellen, ob die schlechtere Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach UBXD1-Depletion mit einer höheren Konzentration an TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  ausgleichbar ist, wurden für beide Zytokine *Dose-Response*-Kurven hergestellt.

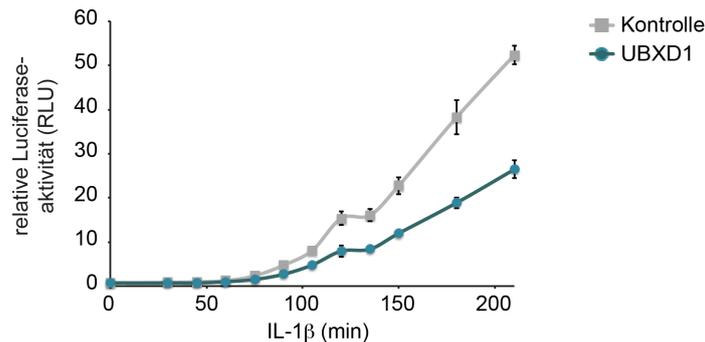


**Abbildung 23: Konzentrationsabhängige Beeinträchtigung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach der Depletion von UBXD1.** HeLa 57A-Zellen wurden mit siRNA 3 und 4 gegen UBXD1 bzw. GFP (Kontrolle) transfiziert (10 nM). Nach 52 Stunden wurden die Zellen für 6 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von TNF $\alpha$  (links) bzw. IL-1 $\beta$  stimuliert, anschließend wurden Lysate hergestellt. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidase normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Die Depletion von UBXD1 führte nach Stimulation mit TNF $\alpha$  und mit IL-1 $\beta$  in unterschiedlichen Konzentrationen zu einer deutlich geringeren NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression der Luciferase im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 23). Die Konzentrationen, die im Fall von TNF $\alpha$ -Stimulation nötig sind, um die maximale Expression des Reportergens zu erhalten, liegen sowohl in UBXD1-depletierten Zellen als auch in Kontrollzellen bei etwa 10 ng/ml. Für IL-1 $\beta$  liegt die entsprechende Konzentration bei jeweils etwa 5 ng/ml. Der negative Effekt der Depletion von UBXD1 auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung lässt sich also nicht mit höheren Konzentrationen

an Zytokinen ausgleichen, die maximale relative Expression des Reportergens der Kontrollzellen wurde von den UBXD1-depletierten Zellen unter keiner der getesteten Bedingungen erreicht.

Um festzustellen, ob es sich bei dem Effekt der UBXD1-Depletion auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges in Reporter-Experimenten um einen Defekt in der Aktivierung oder um ein verfrühtes Abschalten des Signalweges handelt, wurde die Luciferase-Expression in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit IL-1 $\beta$  beobachtet.



**Abbildung 24: Zeitliche Abhängigkeit der Aktivität der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase nach der Depletion von UBXD1.** HeLa 57A-Zellen wurden mit siRNA 3 und 4 gegen UBXD1 bzw. GFP (Kontrolle) transfiziert (10 nM). Nach 52 Stunden wurden die Zellen für den angegebenen Zeitraum mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$  stimuliert und anschließend Lysate hergestellt. Die Luciferaseaktivität wurde gegen die jeweilige  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten, gezeigt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

Betrachtet man die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression der Luciferase in HeLa 57A-Zellen nach der Depletion von UBXD1 über drei Stunden nach IL-1 $\beta$ -Zugabe, so ist diese im Vergleich zu Kontrollzellen über den ganzen Zeitraum reduziert (Abb. 24). Obwohl die Signalstärke über den Verlauf von drei Stunden in UBXD1-depletierten Zellen deutlich reduziert ist, scheint die Kinetik ähnlich zu sein wie in Kontrollzellen. Allerdings kann über die frühen Zeitpunkte unter zwei Stunden keine Aussage gemacht werden, da sich das Luciferase-Signal erst etwa zwei Stunden nach Zugabe von IL-1 $\beta$  deutlich von der Expression des Reportergens am Anfangszeitpunkt abhebt.

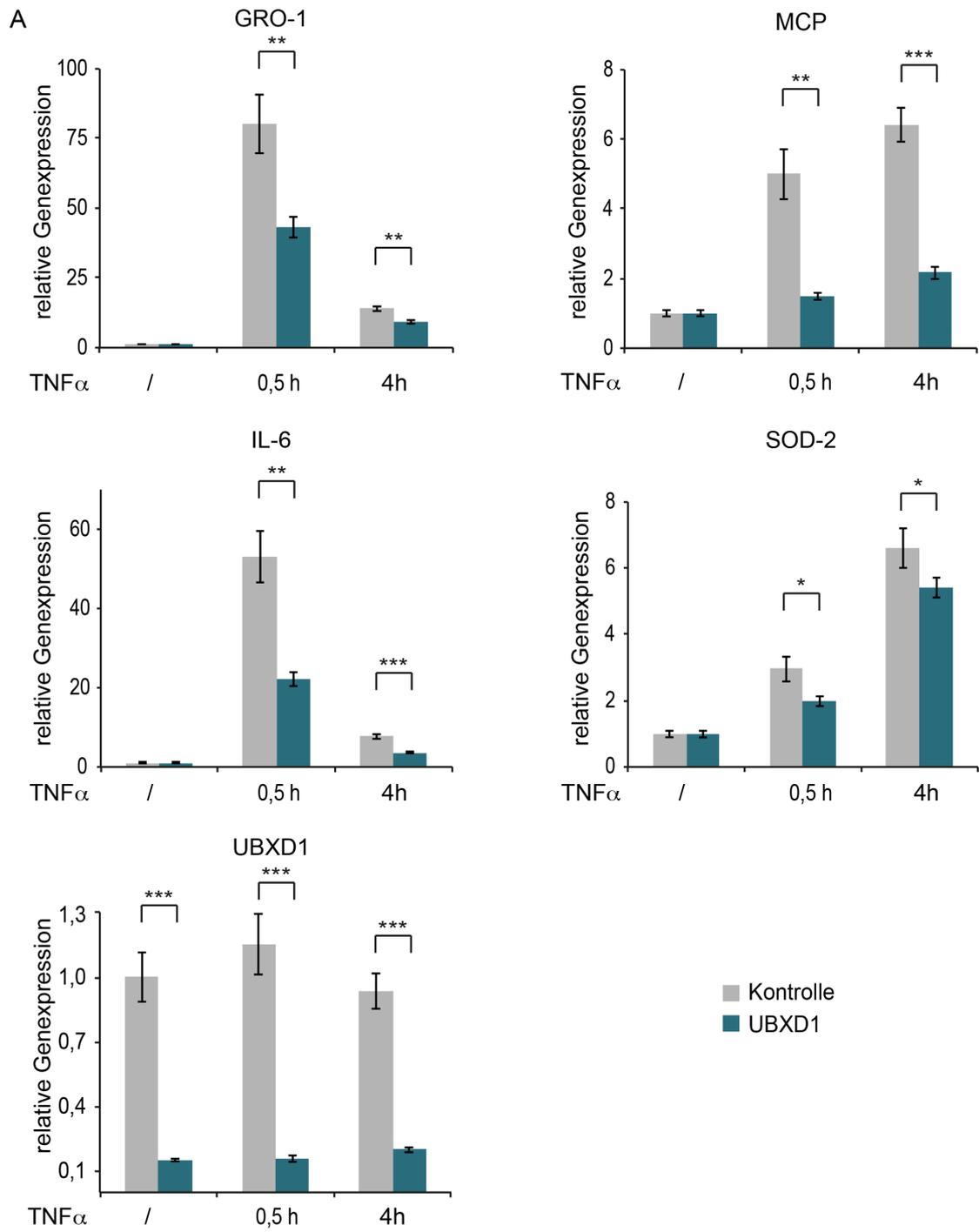
### 3.4.3 Einfluss von UBXD1 auf die Expression von endogenen NF- $\kappa$ B-Zielgenen

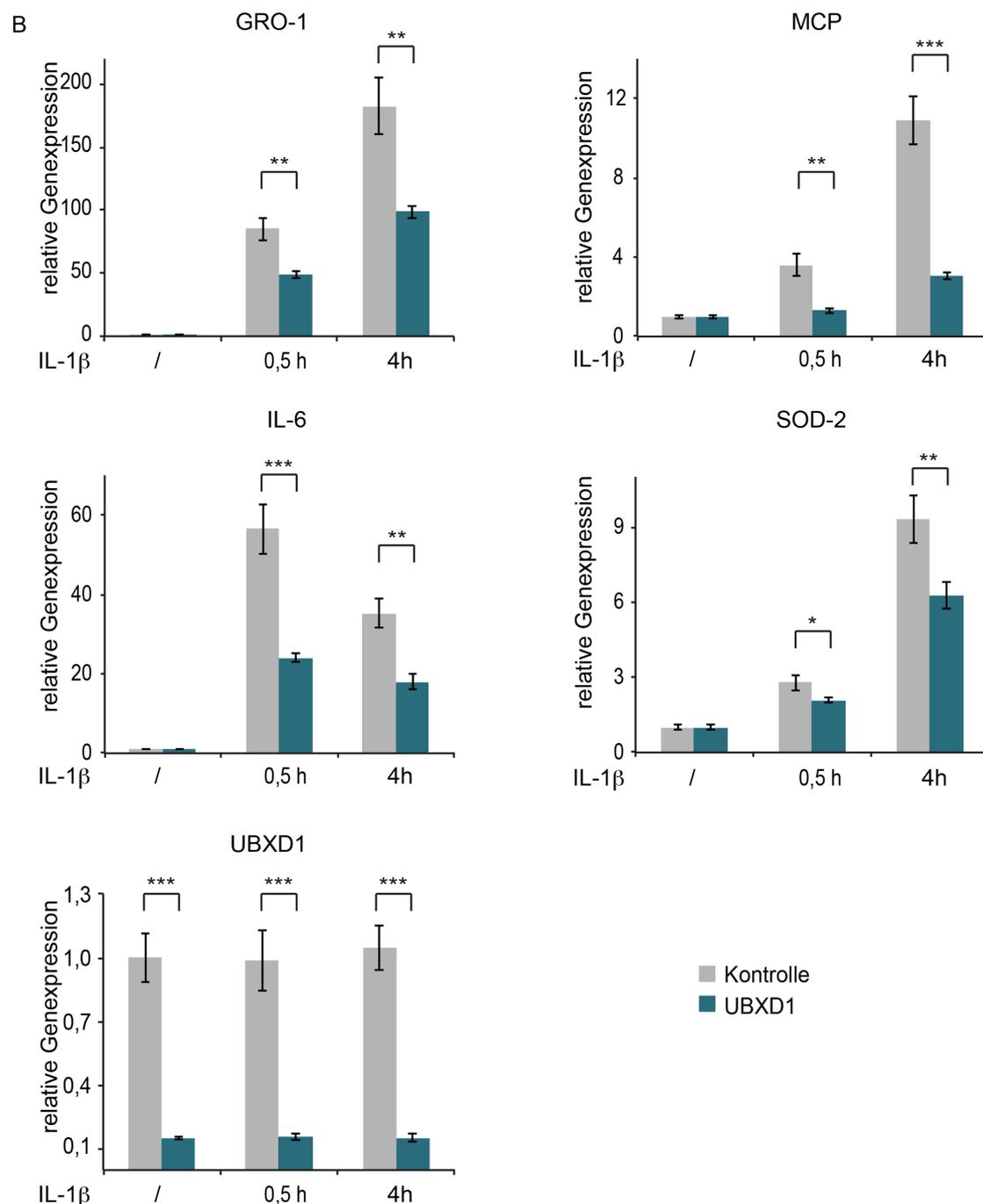
Da über die frühen Zeitpunkte der NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit der Kinetik im Reporter-Experiment nach IL-1 $\beta$ -Stimulation keine Aussagen über einen Einfluss von UBXD1 gemacht werden konnten, wurden quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) für unterschiedliche, endogene NF- $\kappa$ B-Zielgene durchgeführt. Die NF- $\kappa$ B-abhängige

Genexpression erfolgt in unterschiedlichen Phasen (Saccani et al., 2001; Tian et al., 2005). Dabei unterscheidet man vor allem zwischen Genen der frühen Antwort, die nach 30-minütiger Stimulation deutlich und nach vier Stunden kaum exprimiert werden, und Genen der späten Antwort, deren Expression langsamer und erst nach einiger Zeit nachweisbar ist. Manche Gene werden auch schon in der frühen Phase aktiviert und die mRNA Mengen behalten ein relativ konstantes Niveau bei (Zhou et al., 2003).

Die qPCR-Experimente sollten zeigen, ob UBXD1 spezifisch an der frühen oder späteren Phase der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges beteiligt ist. Dabei wurden als Indikatoren der frühen Phase die mRNA-Menge der Zytokine GRO-1 und IL-6 und als Indikatoren der späten Phase die mRNA-Level des Zytokins MCP und der Superoxiddismutase SOD-2 untersucht.

Dafür wurden HeLa-Zellen 30 Minuten oder vier Stunden mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  behandelt, die gesamte RNA isoliert und diese in cDNA revers transkribiert. Anschließend wurde die mRNA-Menge der NF- $\kappa$ B-Zielgene bestimmt und auf die mRNA-Menge von zwei unabhängig vom NF- $\kappa$ B-Signalweg exprimierten Haushaltsgenen normiert.





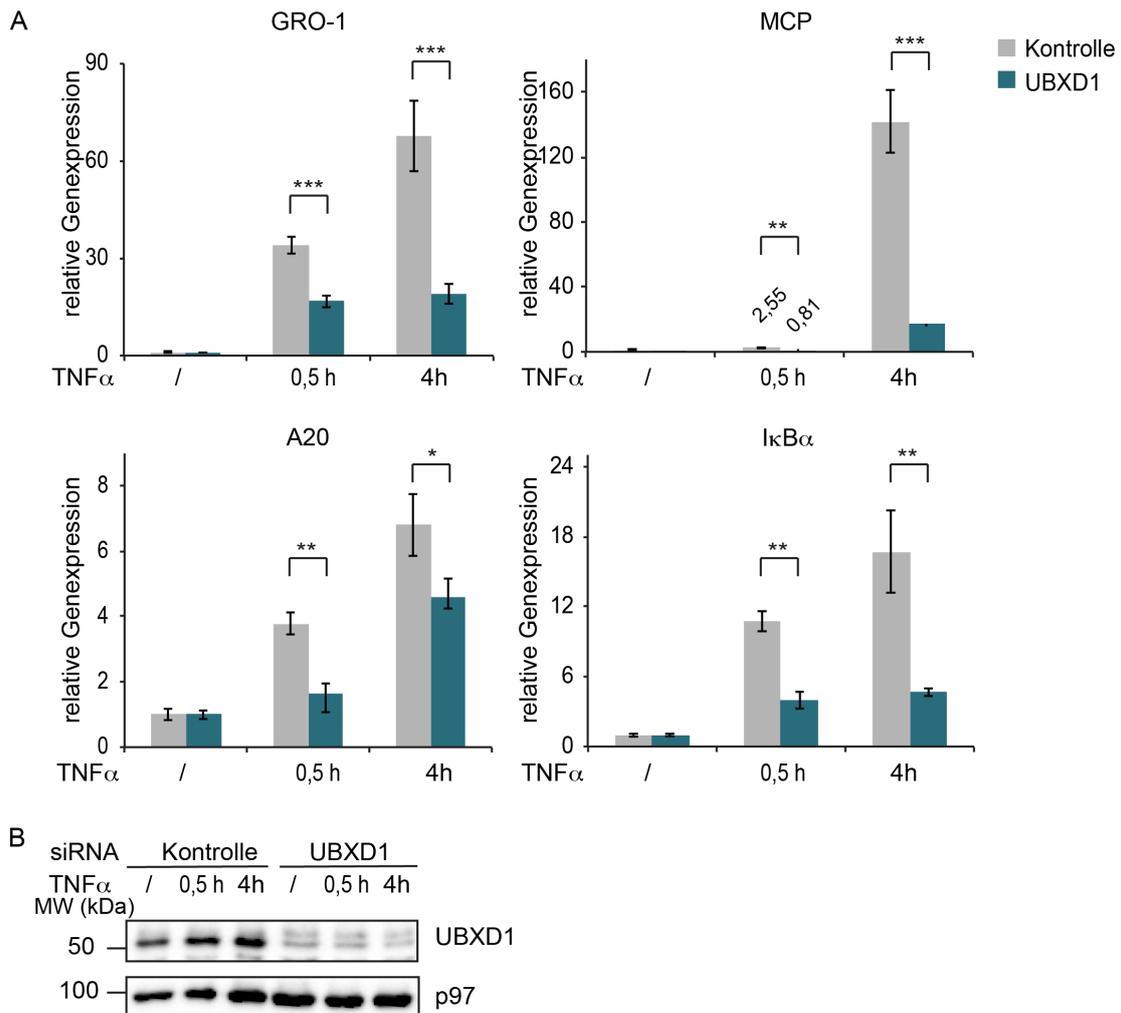
**Abbildung 25: UBXD1 hat einen Einfluss auf die Transkription von endogenen Zielgenen des NF- $\kappa$ B-Signalweges in HeLa-Zellen.** **A** HeLa-Zellen wurden mit siRNA 3 und 4 gegen UBXD1 bzw. siRNA gegen Luciferase (Kontrolle) transfiziert (10 nM). Nach 72 Stunden wurden die Zellen für 30 Minuten oder vier Stunden mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Danach wurden die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen, anschließend lysiert und die RNA extrahiert, 500 ng Gesamt-RNA wurde für eine reverse Transkription mit Oligo-dT-Primern eingesetzt. Die erhaltenen cDNA wurden 1:10 verdünnt und davon 2 $\mu$ l in einer qPCR mit Primern für die angegeben Gene und zwei NF- $\kappa$ B-unabhängigen Gene zur Normalisierung der mRNA-Menge eingesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die relative Genexpression, wobei die Genexpression in unstimulierten Zellen eins entspricht. Die qPCR erfolgte in technischen Triplikaten, gezeigt ist der relative Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Zur Kontrolle der Depletion wurde ebenso die Menge an UBXD1-mRNA bestimmt. Unterschiede zwischen den relativen Genexpressionen wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 **B** wie **A**, aber die Stimulation erfolgte mit 20 ng/ml IL-1 $\beta$ .

Die qPCR-Versuche zeigen, dass nach einer Depletion von UBXD1 die Expression von endogenen NF- $\kappa$ B-Zielgenen nach TNF $\alpha$ - und IL1 $\beta$ -Stimulation sowohl nach 30 Minuten als auch nach vier Stunden verringert ist (Abb. 25). Dabei ist nach der Depletion von UBXD1 in TNF $\alpha$ - oder IL1 $\beta$ -stimulierten Zellen besonders die Menge an mRNA für GRO-1, MCP und IL-6 verringert. Auf die mRNA-Level von SOD-2 hatte die Depletion von UBXD1 nur einen geringeren Einfluss (Abb. 25). Es lässt sich außerdem feststellen, dass die Stabilität der mRNA in UBXD1-depletierten Zellen der Stabilität der mRNA in Kontrollzellen gleicht. So nimmt die Menge der mRNA für GRO-1 und IL-6 nach vier stündiger Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$  im Vergleich zu 30-minütiger Stimulation sowohl für die Kontrollzellen als auch für die UBXD1-depletierten Zellen wieder ab (Abb. 25). Die Kinetik der Expression der NF- $\kappa$ B-Zielgene scheint also gleich zu sein.

Das bedeutet, dass UBXD1 einen generellen Effekt auf Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges hat und bestätigt somit die Ergebnisse der Reporter-gen-Versuche. Wäre die Reduktion der NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase in UBXD1-depletierten Zellen auf ein verfrühtes Abschalten des NF- $\kappa$ B-Signalweges zurückzuführen gewesen, so hätte man in den qPCR-Experimenten eine normale Expression der NF- $\kappa$ B-Zielgene nach 30-minütiger Stimulation in UBXD1-depletierten Zellen sehen können. Da aber auch zu diesem Zeitpunkt die mRNA-Menge der unterschiedlichen NF- $\kappa$ B-Zielgene reduziert war, kann man davon ausgehen, dass UBXD1 eine Funktion bei der Aktivierung des Signalweges hat. Da sowohl Gene der frühen als auch der späten Antwort betroffen sind, ist die Reduktion der Expression nach UBXD1-Depletion nicht auf Gene beschränkt, die zu einer bestimmten Gruppe gehören. Zusätzlich zeigt dieses Experiment, dass die Genexpression von NF- $\kappa$ B-Zielgenen nach UBXD1-Depletion inhibiert ist und nicht etwa die Proteinsynthese reduziert ist.

#### **3.4.4 Der Einfluss von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg HEK293T-Zellen**

Um festzustellen, ob es sich bei dem Einfluss, den UBXD1 auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung hat, um einen Zelltyp-spezifischen Effekt in HeLa-Zellen handelt, wurde auch die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription in HEK293T-Zellen untersucht. Da man in HEK293T-Zellen kaum eine Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges mit IL-1 $\beta$  erreicht (Daten nicht gezeigt; Prof. K. Iwai, persönliche Kommunikation), wurde dieses Experiment nur nach Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$  durchgeführt. Da für SOD-2 und IL-6 keine NF- $\kappa$ B-abhängige Aktivierung der Genexpression festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt) wurden stattdessen die mRNA-Level von A20 und I $\kappa$ B $\alpha$  bestimmt.



**Abbildung 26: Regulation der Genexpression nach Stimulation mit TNF $\alpha$  in HEK293T-Zellen.**  
**A** HEK293T-Zellen wurden mit siRNA 3 und 4 gegen UBXD1 bzw. siRNA gegen Luciferase (Kontrolle) transfiziert (25 nM). Nach 72 Stunden wurden die Zellen für 30 Minuten oder vier Stunden mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Danach wurden die Zellen auf Eis mit PBS gewaschen, anschließend lysiert und die RNA extrahiert, 2,5  $\mu$ g Gesamt-RNA wurde für eine reverse Transkription mit Oligo-dT-Primern eingesetzt. Die erhaltenen cDNA wurden 1:10 verdünnt und davon 2  $\mu$ l in einer qPCR mit Primern für die angegebenen Gene und zwei NF- $\kappa$ B-unabhängigen Genen zur Normalisierung der mRNA-Menge eingesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die relative Genexpression, wobei die Genexpression in unstimulierten Zellen eins entspricht. Die qPCR erfolgte in technischen Triplikaten, gezeigt ist der relative Mittelwert mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Unterschiede zwischen den relativen Genexpressionen wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  **B** Zur Kontrolle der Depletion von UBXD1 wurden die Proteine im Durchfluss der RNA-Aufreinigung aus A mittels Aceton gefällt und anschließend in SDS-Gel-Ladepuffer aufgenommen und ein Western Blot durchgeführt.

Wie die HeLa-Zellen zeigten auch HEK293T-Zellen eine reduzierte Antwort in der Expression von endogenen NF- $\kappa$ B-Zielgenen nach Stimulation mit TNF $\alpha$ , wenn UBXD1 durch siRNA depletiert wurde (Abb. 26). Auch in HEK293T-Zellen sind sowohl nach 30-minütiger als auch nach vier stündiger Stimulation der Zellen die mRNA-Mengen in UBXD1-depletierten Zellen niedriger als in Kontrollzellen (Abb. 26). Dabei ist die Reduktion für die mRNA-Menge von A20 weniger stark als für die mRNA-Menge von MCP, GRO-1 und I $\kappa$ B $\alpha$  (Abb. 26).

Dies bestätigt weiter die Hypothese, dass UBXD1 eine allgemeine Rolle bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges spielt und schließt aus, dass es sich um eine zelltyp-spezifische Rolle in HeLa-Zellen handelt.

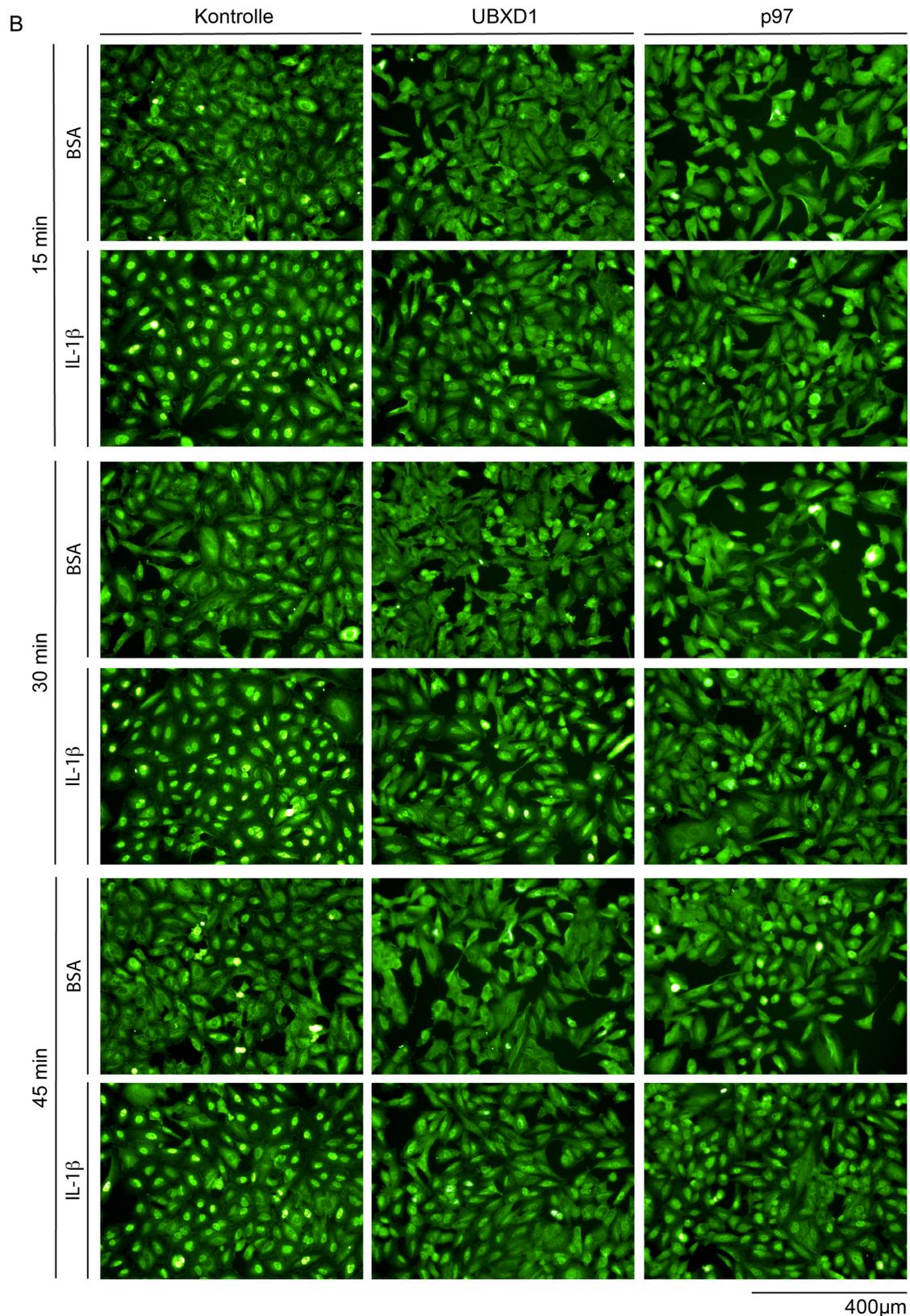
#### **3.4.5 Einfluss von UBXD1 auf die Kerntranslokation von p65**

Da aufgrund der Untersuchungen zur Expression von endogenen Zielgenen des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach UBXD1-Depletion ausgeschlossen werden konnte, dass UBXD1 eine Rolle in der Translation der Proteine spielt, stellte sich die Frage, ob UBXD1 für die Kerntranslokation von p65 notwendig ist.

Die Kerntranslokation von p65 nach Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges lässt sich mit unterschiedlichen Mitteln untersuchen. So kann durch Immunfluoreszenz-Versuche nachgewiesen werden, in welchem Zellkompartiment p65 sich unter den untersuchten Bedingungen befindet. Alternativ können mikroskopische Experimente mit GFP-markierten p65 durchgeführt werden. Biochemisch können Zellen fraktioniert werden und so cytoplasmatische von nukleären Proteinen getrennt werden. Der Nachweis der Kerntranslokation per Immunfluoreszenz hat den Vorteil, dass eine große Anzahl von Ansätzen parallel bearbeitet werden kann, wenn die Zellen in Zellkulturplatten ausgesät werden, die direkt zum Mikroskopieren verwenden können.

Es wurden HeLa-Zellen in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät und zusätzlich zur siRNA gegen UBXD1 und Luciferase (Kontrolle) mit siRNA gegen p97 transfiziert. Da p97 nachweislich eine Rolle in dem Abbau von ubiquitinierten I $\kappa$ B $\alpha$  spielt (Li et al., 2014) und daher essenziell für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges ist, diente dies als Positivkontrolle und sollte eine Einordnung der Kerntranslokation von p65 nach UBXD1-Depletion erlauben. Die Zellen auf einer Platte wurden jeweils in Triplikaten für 15 Minuten, 30 Minuten und 45 Minuten mit 20 ng/ml TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  bzw. zur Kontrolle mit BSA stimuliert. Danach wurde p65 in den Zellen durch Immunfluoreszenz angefärbt und mikroskopische Aufnahmen gemacht. Pro Well wurden etwa 1000 Zellen erfasst. Dabei wurde eine Kolokalisation des p65-Signals mit der Hoechst-gefärbten DNA als kernlokalisiertes p65 gewertet. Für die Bestimmung der Menge an p65 im Cytoplasma wurde im Abstand von 1 Pixel vom Zellkern eine 9 Pixel-breiter Ring gewählt und das Signal für p65 in diesem Ring erfasst.

Zum Nachweis der Depletion von UBXD1 wurden zusätzlich Zellen von jeweils drei Wells mit siRNA gegen UBXD1 bzw. Luciferase (Kontrolle) transfiziert und mit SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Menge an UBXD1 im Zelllysate konnte so im Western Blot analysiert werden.



**Abbildung 27: UBXD1 hat einen Einfluss auf die Kerntranslokation von p65.** **A** Beispielhafte Mikroskopische Bildaufnahmen der Immunfluoreszenz zur Darstellung des Unterschiedes zwischen der Translokation von p65 bei Kontroll-, UBXD1- und p97-Depletion unter Stimulation mit BSA bzw. TNF $\alpha$  für der angegebenen Zeit. Die Anfärbung von p65 erfolgte mit Alexa Fluor 488, die Anfärbung der DNA mit Hoechst 33342. **B** wie A, aber mit IL-1 $\beta$  statt TNF $\alpha$ . **C** statistische Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen und Western Blot zur Kontrolle der Depletion von UBXD1. Unterschiede zwischen den

relativen Kernlokalisationen wurden mit dem zweiseitigen Student-t-test analysiert. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$

Wie erwartet nimmt die Intensität von p65 im Kern im Vergleich zur Gesamtintensität nach Stimulation der Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  oder  $\text{IL-1}\beta$  deutlich zu. Im Vergleich zu Kontrollzellen ist die Anreicherung im Kern nach der Depletion von UBXD1 jedoch signifikant geringer (Abb. 27). Die Kerntranslokation von p65 in p97-depletierten Zellen ist nochmal geringer (Abb. 27). UBXD1 erfüllt also eine wichtige Funktion im  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Signalweg, wobei es jedoch nicht im gleichen Maß wie p97 benötigt wird. Interessanter Weise nimmt die relative Menge an Kern-lokalisiertem p65 nach 45-minütiger Stimulation der Zellen mit  $\text{TNF}\alpha$  oder  $\text{IL-1}\beta$  wieder ab. Dies ist wahrscheinlich auf die Expression des Inhibitors  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  zurückzuführen, die schon in einer frühen Phase der  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung nachweisbar ist (Zhou et al., 2003).  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  bindet dann freies p65 im Kern und vermittelt den Transport zurück ins Cytoplasma (Ganchi et al., 1992; Arenzana-Seisdedos et al., 1995; Arenzana-Seisdedos et al., 1997). Auch hier zeigen die UBXD1-depletierten Zellen eine ähnliche Kinetik wie die Kontrollzellen.

Es ist insgesamt davon auszugehen, dass die limitierende Menge von p65 im Kern für die reduzierte Expression der  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Zielgene in UBXD1-depletierten Zellen verantwortlich ist. Dadurch dass unterschiedliche Zeiten untersucht worden sind, konnte auch hier nochmals gezeigt werden, dass die Aktivierung des Signalweges nach UBXD1-Depletion nicht nur verzögert ist, sondern es zu einem generellen Defekt in der Aktivierung kommt.

#### **3.4.6 Einfluss von UBXD1 auf die Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$**

Da UBXD1-depletierte Zellen eine reduzierte Kerntranslokation von p65 zeigen, stellte sich die Frage, ob UBXD1 an der Degradation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  beteiligt ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Kinetik des Abbaus von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  in HeLa-Zellen untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen mit siRNA gegen UBXD1 oder Luciferase (Kontrolle) transfiziert und unterschiedlich lange mit  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert. Die Zelllysate wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im anschließenden Western Blot auf die Stabilität von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  untersucht. Die Menge an  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wurde auf die Menge des im Zelllysate vorhandenen Caveolin1 normiert.

**Abbildung 28: UBXD1 hat keinen Einfluss auf die Degradation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ .** HeLa Zellen wurden mit siRNA 3 und 4 gegen UBXD1 bzw. gegen Luciferase transfiziert (10 nM). Nach 52 oder 76 Stunden wurden die Zellen 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten mit 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert, dann auf Eis geerntet und in Probenpuffer aufgenommen. Als Referenz wurden unstimulierte Zellen (0) verwendet. Die verbleibende Menge an  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  wurde per Western Blot nachgewiesen, auf die Menge an Caveolin1 in den Zelllysaten normiert und für unstimulierte Zellen auf eins gesetzt. Das Experiment erfolgte in Triplikaten. **A** Repräsentative Western Blots. **B** Auswertung der drei Experimente als Mittelwert der relativen  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Menge mit der Standardabweichung als Fehlerbalken.

HeLa-Zellen zeigten nach UBXD1-Depletion keinen Unterschied in der Degradation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  (Abb. 28) oder Stimulation mit  $\text{IL-1}\beta$  (Daten nicht gezeigt). In beiden Ansätzen ist nach zehn Minuten Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  nur noch 10 % der Ausgangsmenge an  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  nachweisbar. Auch kürzere Inkubationszeiten mit  $\text{IL-1}\beta$  führten zu keinem Unterschied in der Degradationskinetik (Daten nicht gezeigt). Das ist nicht überraschend, da UBXD1 eine Rolle in der Kerntranslokation von p65 (Abb. 27) spielt und die Kerntranslokation von p65 hauptsächlich von der Degradation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  beeinflusst wird (Palombella et al., 1994; Hayden und Ghosh, 2004).

## 4 Diskussion

Die AAA ATPase p97 ist ein essenzieller Regulator zahlreicher zellulärer Prozesse. Die Spezifität für verschiedene Funktionen wird durch die Bindung unterschiedlicher Kofaktoren reguliert. Für den in höheren Eukaryoten stark konservierten Kofaktor UBXD1 wurden bislang mögliche Rollen im ERAD-Abbauweg und im endolysosomalen System beschrieben, die jedoch noch nicht molekular charakterisiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden A20 und TRIAD3A als neue Bindungspartner von UBXD1 identifiziert und ihr Bindeverhalten näher untersucht. Da sowohl A20 als auch TRIAD3A einen negativ-regulierenden Effekt auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg ausüben, lag die Vermutung nahe, dass auch UBXD1 eine Funktion in diesem Signalweg hat. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Reporter-gen-Experimente und qPCR-Experimente in UBXD1-depletierten Zellen durchgeführt. Es konnte so gezeigt werden, dass die Depletion von UBXD1 zu einer reduzierten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges führt. Dies ist auf eine verminderte Kerntranslokation des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor p65 zurückzuführen, die durch Immunfluoreszenz-Studien in UBXD1-depletierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich konnte eine essenzielle Funktion von p97 im NF- $\kappa$ B-Signalweg bestätigt werden und gezeigt werden, dass neben UBXD1 weitere p97-Kofaktoren an der Regulation des Signalweges beteiligt sind.

### 4.1 p97 und p97-Kofaktoren besitzen mehrere Rollen im

#### NF- $\kappa$ B-Signalweg

Während der Entstehung der vorliegenden Arbeit wurde durch eine konkurrierende Gruppe gezeigt, dass p97 eine essenzielle Funktion im NF- $\kappa$ B-Signalweg besitzt, indem es ubiquitiniertes I $\kappa$ B $\alpha$  bindet und den proteasomalen Abbau des Inhibitors vermittelt (Dai et al., 1998; Li et al., 2014). Durch siRNA-vermittelte Depletion konnte weiter gezeigt werden, dass der heterodimere Kofaktor UFD1L-NPL4 diese Funktion von p97 reguliert (Li et al., 2014). Allerdings zeigten in der Arbeitsgruppe von Prof. Buchberger durchgeführte Immunfluoreszenz-Studien zur Untersuchung der TNF $\alpha$ -induzierten Kerntranslokation des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors p65 einen überraschend geringen Unterschied zwischen p97-depletierten Zellen und Kontrollzellen (Blenski, 2014). Untersuchungen zum Einfluss von p97 auf die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression des Reportergens Luciferase führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (Shibata et al., 2012; Li et al., 2014). Daher wurde zur Klärung dieser Fragestellung in dieser Arbeit die Zelllinie HeLa 57A verwendet, die das chromosomal integrierte Reporter-gen Luciferase unter der Kontrolle eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Promotor exprimiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich

die Depletion von p97 sowohl nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  als auch mit  $\text{IL-1}\beta$  negativ auf die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression des Reportergens auswirkt (Abb. 14). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch die kurzzeitige pharmakologische Inhibition von p97 durch die Inhibitoren DeBQ und NMS-873 einen negativen Effekt auf die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges hat (Abb. 15). Dies zeigt, dass die reduzierte Aktivierung des Signalweges nach der siRNA-vermittelten Depletion von p97 nicht durch sekundäre Effekte aufgrund langfristiger Inhibition anderer essenzieller Funktionen von p97 entstanden ist und unterstreicht die Bedeutung von p97 im NF- $\kappa$ B-Signalweg.

In der Vergangenheit wurden bereits unterschiedliche p97-Kofaktoren mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg in Verbindung gebracht (Tab. 1). So wurde der p97<sup>UFD1L-NPL4</sup>-Komplex als entscheidender Faktor für die Degradation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  beschrieben (Li et al., 2014). Ebenfalls essenziell für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges ist HOIP, das über seine PUB-Domäne p97 binden kann (Elliott et al., 2014; Schaeffer et al., 2014; Takiuchi et al., 2014). HOIP spielt als katalytische Untereinheit des LUBAC-Komplexes eine wichtige Rolle in der Verknüpfung linearer Ubiquitin-Ketten an NEMO, was wiederum zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges führt (Kirisako et al., 2006; Tokunaga et al., 2009; Fujita et al., 2014). Die p97-Kofaktoren p47, SAKS1 und FAF1 regulieren den NF- $\kappa$ B-Signalweg negativ. Nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  oder  $\text{IL-1}\beta$  bindet p47 an NEMO und fördert so den lysosomalen Abbau von NEMO (Shibata et al., 2012). Aufgrund der essenziellen Rolle von NEMO bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges kommt es so zur Inhibition der Signalkaskade. Shibata et al. postulieren, dass diese Funktion von p47 unabhängig von p97 ist. Diese Hypothese wurde allerdings aufgrund des experimentellen Ansatzes der Studie noch nicht eindeutig belegt. Für die Untersuchung der Beteiligung von p97 verwendeten die Autoren trunkierte p47-Varianten, denen die p97-bindende UBX-Domäne fehlt (Shibata et al., 2012). Allerdings kann p47 zusätzlich über ein BS1-Motiv an p97 binden (Bruderer et al., 2004), das in diesem Experiment noch funktionell war. Der p97-Kofaktor SAKS1 wurde erst kürzlich als negativer Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalweges identifiziert (Wang et al., 2015). Durch die Bindung von SAKS1 an cIAP1 wird cIAP1 aus dem *signaling*-Komplex am TNF-Rezeptor ins Cytoplasma freigesetzt und dadurch die Ubiquitinierung von RIP1 inhibiert (Wang et al., 2015). Für FAF1 ist ebenfalls eine inhibitorische Rolle im NF- $\kappa$ B-Signalweg beschrieben. Durch GST-Pulldowns wurde gezeigt, dass FAF1 an die Leucin-Zipper-Domäne von  $\text{IKK}\beta$  bindet (Park et al., 2007). Die siRNA-vermittelte Depletion von FAF1 führte zu einem erhöhten Level an aktiviertem  $\text{IKK}\beta$  und somit auch an phosphoryliertem  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , während Überexpression von FAF1 den entgegengesetzten Effekt hatte (Park et al., 2007). Die Autoren zeigten auch, dass die Depletion von FAF1 in Reporter-Experimenten nach unterschiedlichen Stimuli zu einer erhöhten

Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges führt (Park et al., 2007). Zusätzlich wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass FAF1 in Fibroblasten und HEK293T-Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$  in einem Komplex mit p65 vorliegt (Park et al., 2004). Die Autoren postulieren eine zusätzliche Rolle für FAF1 in der Kerntranslokation von p65, da diese nach Überexpression von FAF1 verringert ist (Park et al., 2004).

**Tabelle 1: Übersicht über die bekannten Funktionen von p97-Kofaktoren im NF- $\kappa$ B-Signalweg**

p97-Kofaktor	Art der Regulation	Interagierendes Protein der Signalkaskade	Funktion	Referenz
UFD1L-NPL4	Positiv	I $\kappa$ B $\alpha$	Proteasomaler Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$	Li et al. (2014)
HOIP	Positiv	NEMO	Lineare Ubiquitinierung von NEMO	Kirisako et al. (2006), Tokunaga et al. (2009)
p47	Negativ	NEMO	Lysosomaler Abbau von NEMO	Shibata et al. (2012)
SAKS1	Negativ	clAP1	Entfernung von clAP1 aus dem <i>signaling</i> -Komplex	Wang et al. (2015)
FAF1	Negativ	IKK $\beta$	Deaktivierung von IKK $\beta$	Park et al. (2007)
		p65	Kerntranslokation von p65	Park et al. (2004)

In dieser Arbeit konnten neben UBXD1 für zwei zusätzliche Kofaktoren von p97 zum ersten Mal eine Funktion im NF- $\kappa$ B-Signalweg gezeigt werden. In Reportergergen-Experimenten konnte für die beiden stärksten Kandidaten aus einem Screen zur Identifikation neuer Regulatoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges (Blenski, 2014), Ataxin-3 und p37, eine Rolle im NF- $\kappa$ B-Signalweg validiert werden. Für beide Proteine führte die Depletion mit jeweils unterschiedlichen siRNAs zu einer reduzierten NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression des Reportergergens Luciferase (Abb. 16). Die Möglichkeit, dass die im Screen beobachtete reduzierte Kern-Translokation von p65 nach Depletion dieser Kandidaten technische Ursachen hatte, konnte so ausgeschlossen werden. Auffälligerweise waren nämlich für beide Kandidaten Funktionen im Zusammenhang mit dem Golgi-Apparat, der Aufrechterhaltung des ERs oder dem Abbau von fehlgefalteten Proteinen im ER beschrieben (Uchiyama et al., 2006; Kaneko et al., 2010; Hubener et al., 2011). Es bestand deshalb die Möglichkeit, dass nach deren Depletion die Zellmorphologie so verändert war, dass

der Antikörper, der zur Immun-Detektion von p65 eingesetzt wurde, unspezifisch an Membranen gebunden wurde und so ein falsch-negatives Ergebnis entstand. Dies ist aber durch die Verifizierung im Reporter-gen-Experiment unwahrscheinlich. Somit wurden mit Ataxin-3 und p37 zwei zusätzliche Kofaktoren von p97 identifiziert, die den NF- $\kappa$ B-Signalweg positiv regulieren, was darauf hindeutet, dass p97 im Komplex mit unterschiedlichen Kofaktoren wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen im NF- $\kappa$ B-Signalweg besitzt. So wäre es für die beiden neuen Kandidaten Ataxin-3 und p37 interessant zu klären, ob sie vor oder nach der Aktivierung des IKK-Komplexes eine Rolle spielen. Da Ataxin-3 ein deubiquitinierendes Enzym (DUB) ist (Kuhlbrodt et al., 2011), ist eine Interaktion mit ubiquitinierten Zielproteinen sehr wahrscheinlich. Für Ataxin-3 wurde eine hohe Aktivität für lineare und K29-verknüpfte Ubiquitinketten festgestellt (McGouran et al., 2013). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Ataxin-3 zwar K48- und K63-verknüpfte Ubiquitinketten bindet, aber eine höhere DUB-Aktivität für K63-verknüpfte Ubiquitinketten zeigt (Winborn et al., 2008). Da Ubiquitin eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges spielt, sind die möglichen Substrate für Ataxin-3 vielfältig. Daher wäre es für weiterführende Arbeiten sinnvoll, genauer einzugrenzen, an welchen Schritt der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges Ataxin-3 eine Rolle spielt. p37 weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zu p47 auf, besitzt allerdings nicht die N-terminale UBA-Domäne von p47 (Uchiyama et al., 2006), die im NF- $\kappa$ B-Signalweg den lysosomalen Abbau von NEMO vermittelt (Shibata et al., 2012). Da die UBA-Domäne notwendig für die Bindung von p47 an NEMO ist (Shibata et al., 2012), ist es unwahrscheinlich, dass p37 ebenfalls in diesen Prozess involviert ist. Aufgrund der beschriebenen Funktionen von p37 bei der Biogenese des Golgi-Apparates (Uchiyama et al., 2006) könnte es aber sein, dass eine Depletion von p37 Effekte auf die Glykosylierung und die Lokalisation von Rezeptoren auf der Plasmamembran hat.

FAF1 war in dieser Arbeit der einzige p97-Kofaktor, dessen Depletion zu einer erhöhten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges führte (Abb. 17). Dies bestätigt die bekannte inhibitorische Funktion von FAF1 (Park et al., 2004; Park et al., 2007). Die Kerntranslokation von p65 nach Stimulation mit TNF $\alpha$  verläuft nach FAF1-Depletion jedoch normal (Blenski, 2014). Ob dies an einer geringeren Sensitivität des Mikroskopie-basierten Screens für positive Regulatoren liegt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Das Ergebnis war unerwartet, da die Überexpression von FAF1 in Zellfraktionierungsexperimenten zu einer reduzierten Kerntranslokation von p65 geführt hat (Park et al., 2004). Es ist aber auch möglich, dass die Funktion von FAF1 zwar nicht für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges gebraucht wird, FAF1 aber eine Rolle im Abschalten des Signalweges spielt. Eine länger andauernde Aktivierung des Signalweges würde das höhere Luciferase-Signal nach der Depletion von FAF1 erklären. Tatsächlich wurde für FAF1 bereits eine Rolle in der Deaktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach Stimulation des CD40-Rezeptors beschrieben (Elmetwali et al., 2014). Nach dieser Studie soll FAF1 mit TRAF6 um

eine gemeinsame Bindestelle im cytoplasmatischen Teil des CD40-Rezeptors konkurrieren, TRAF6 verdrängen und so die weitere Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges verhindern. Dies passiert erst, nachdem der Rezeptor schon einige Zeit aktiviert ist, aber nicht in der frühen Phase der Stimulation (Elmetwali et al., 2014). Eine ähnliche Funktion von FAF1 wäre auch für den TNF $\alpha$ -Rezeptor denkbar. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Funktionen der unterschiedlichen p97-Komplexe im NF- $\kappa$ B-Signalweg vielfältig sind. Die molekularen Grundlagen der unterschiedlichen Funktionen sowie die Substrate der einzelnen p97-Komplexe sind aber noch nicht vollständig ermittelt.

## 4.2 UBXD1 ist ein positiver Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalweges

Eines der zentralen Ergebnisse dieser Arbeit ist die Identifizierung einer regulatorischen Funktion von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg. UBXD1-depletierte HeLa 57A-Zellen zeigten nach Stimulation mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  eine reduzierte NF- $\kappa$ B-abhängige Expression des Reportgens Luciferase (Abb. 18). Die Spezifität dieser Ergebnisse wurde durch die Verwendung von vier unterschiedlichen siRNAs unterstrichen (Abb. 19). Durch Komplementations-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nach Depletion von UBXD1 wieder wie in Kontrollzellen verläuft, wenn UBXD1 von einem Plasmid exprimiert wird, das für eine siRNA-resistente mRNA von UBXD1 kodiert (Abb. 20). Die Depletion von UBXD1 führte auch nach Aktivierung des atypischen NF- $\kappa$ B-Signalweges durch Doxorubicin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer geringeren Expression des Reportergens (Abb. 22). Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei UBXD1 um einen allgemeinen positiven Regulator des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweges handelt, da alle durch diese unterschiedlichen Stimuli aktivierten Signalkaskaden über eine Aktivierung des IKK zur Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  führen. Der Einfluss von UBXD1 auf den nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg konnte allerdings nicht untersucht werden, da die entsprechenden Rezeptoren in HeLa-Zellen nicht exprimiert werden. Um die Funktion von UBXD1 genauer zu analysieren, wurden qPCR-Experimente durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass in UBXD1-depletierten Zellen die mRNA-Mengen von endogenen NF- $\kappa$ B-Zielgenen reduziert sind (Abb. 25). Daraus lässt sich folgern, dass die geringe Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges in den Reporter-Experimenten auf eine geringere Transkriptionsaktivität zurückzuführen ist und keine Translationsdefekte vorliegen. Zusätzlich wurde so ausgeschlossen, dass es sich bei den vorherigen Ergebnissen um ein Artefakt der verwendeten Reportgen-Zelllinie handelte. Durch qPCR-Experimente konnte außerdem gezeigt werden, dass auch in UBXD1-depletierten HEK293T-Zellen die Expression der NF- $\kappa$ B-Zielgene reduziert ist (Abb. 26). Daraus lässt sich folgern, dass UBXD1 nicht nur spezifisch in

HeLa-Zellen an der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges beteiligt ist. Um die Funktion von UBXD1 weiter einzugrenzen wurde die Kerntranslokation des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor p65 nach unterschiedlichen Stimulationszeiten mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch p65-Immunfluoreszenzen untersucht. Auch diese ist in UBXD1-depletierten Zellen reduziert (Abb. 27). Der Unterschied in der Expression der NF- $\kappa$ B-Zielgene ist also wahrscheinlich durch geringere p65-Bindung an die entsprechenden Promotoren hervorgerufen. Überraschender Weise war die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  allerdings in UBXD1-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nicht verändert (Abb. 28).

Der Befund, dass die Kerntranslokation von p65 in UBXD1-depletierten Zellen reduziert ist, obwohl I $\kappa$ B $\alpha$  anscheinend normal abgebaut wird, lässt sich auf zwei unterschiedliche Arten interpretieren. Entweder war der experimentelle Ansatz zur Bestimmung der Degradationskinetik von I $\kappa$ B $\alpha$  nicht sensitiv genug, oder UBXD1 unterstützt den Import des Transkriptionsfaktoren-Dimer in den Kern.

Die Quantifizierung von I $\kappa$ B $\alpha$  nach Zytokin-Stimulation von Zellen wird häufig benutzt, um nachzuweisen, dass Proteine in die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges involviert sind (Boisson et al., 2012; Sieber et al., 2012; Li et al., 2014). Es ist jedoch teilweise bereits schwierig einen Unterschied in Zellen zu detektieren, in denen p97 depletiert wurde (Dr. S. Alberts, persönliche Kommunikation). Auch in Zellen, in denen p97 chemisch inhibiert wurde, ist nach 30-minütiger Stimulation mit TNF $\alpha$  nur ein überraschend kleiner Anteil von I $\kappa$ B $\alpha$  stabilisiert (Schweitzer et al., 2015). Unabhängige Studien berichten ebenfalls von Schwierigkeiten, den Ubiquitinierungs-Status von I $\kappa$ B $\alpha$  in Ganzzelllysaten zu analysieren (Starokadomskyy und Burstein, 2015). Die Autoren schlagen daher als experimentellen Ansatz die Analyse von an immunpräzipitiertes p65 gebundenem I $\kappa$ B $\alpha$  vor. Diese Methode zeigte auch nach der chemischen Inhibition von p97 eine deutlichere Stabilisation von I $\kappa$ B $\alpha$  nach Stimulation mit TNF $\alpha$  als die Analyse der I $\kappa$ B $\alpha$ -Level in Ganzzelllysaten (Schweitzer et al., 2015). Da die Stabilisierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , die nach Depletion von UBXD1 zu erwarten wäre, sehr wahrscheinlich geringer wäre als die in p97-depletierten oder p97-inhibierten Zellen, wäre der Ansatz einer Immunpräzipitation von p65 und die Analyse von gebundenen I $\kappa$ B $\alpha$  nützlich für weitere Arbeiten. Dies würde eine Beteiligung von UBXD1 an der Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  zuverlässiger klären. Außerdem könnte man gleichzeitig feststellen, ob in UBXD1-depletierten Zellen ubiquitiniertes oder unmodifiziertes I $\kappa$ B $\alpha$  akkumuliert und so weitere Rückschlüsse über die Funktion von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg ziehen. Sollte die Degradationskinetik von I $\kappa$ B $\alpha$  in UBXD1-depletierten Zellen tatsächlich nicht beeinträchtigt sein, dann würde dies eine Funktion von UBXD1 im Kernimport von p65 nahelegen. Nach dem Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  wird die NLS von p65 exponiert und p65 in den Zellkern importiert (Beg et al., 1992; Ganchi et al., 1992). Der Kernimport

ist dabei von unterschiedlichen Mitgliedern der Importinfamilie abhängig. Die genaue Funktion von einzelnen Mitgliedern in der Kerntranslokation von p65 ist dabei noch nicht vollständig geklärt (Fagerlund et al., 2005; Fagerlund et al., 2008; Liang et al., 2013). Für UBXD1 wären dabei Rollen in der Regulation der Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren-Dimer und Importinen oder der Lokalisation und Stabilität der Dimerisierenden Importine denkbar. Die Rolle von UBXD1 in der Degradation von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  ist leider also noch nicht abschließend geklärt. Dass UBXD1 eine Rolle im NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt, ist über die unterschiedlichen Versuchsansätze in dieser Arbeit jedoch gut belegt. Dabei besteht durchaus die Möglichkeit, dass UBXD1 auch andere zelluläre Signalwege reguliert. Im Laufe der Anfertigung dieser Arbeit wurde eine Studie publiziert, die zeigt, dass das Drosophila-Homolog von UBXD1, Armless, eine Funktion im Wingless/Wnt-Signalweg hat (Reim et al., 2014). Fliegen, die kein Armless/UBXD1 exprimieren, haben kleinere Flügel, die am Rand Kerben aufweisen (Reim et al., 2014). Das ist ein typischer Phänotyp für Mutanten des Wingless/Wnt-Signalweges. Konsequenterweise werden Zielgene dieses Signalweges in Armless/UBXD1-losen Mutant schwächer exprimiert. Auch die Level des  $\beta$ -catenin-Homologs Armadillo ist in diesen Fliegen stark reduziert (Reim et al., 2014). Interessanter Weise ist wie  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  auch Armadillo/ $\beta$ -catenin ein Substrat des E3-Ligase-Komplex Slimb/SCF <sup>$\beta$ -TrCP</sup>. Beide Signalwege beeinflussen sich gegenseitig zusätzlich auch über andere Faktoren (Du und Geller, 2010). Auch in HEK293-Zellen ist die Gen-Expression der  $\beta$ -catenin-Zielgene nach Depletion von UBXD1 stark vermindert, die Protein-Level von  $\beta$ -catenin sind aber bestenfalls leicht reduziert (Reim et al., 2014). Mehrere Studien belegen, dass der NF- $\kappa$ B-Signalweg durch die Stabilisierung und nicht aber durch die Reduktion von  $\beta$ -catenin negativ reguliert wird (Deng et al., 2004; Du und Geller, 2010; Ma et al., 2015). Dass es durch die leicht reduzierten  $\beta$ -catenin-Level in UBXD1-depletierten Zellen zu einer negativen Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges kommt, ist also unwahrscheinlich. UBXD1 konnte also durch diese Arbeit als positiver Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalweges identifiziert werden.

### 4.3 UBXD1 bindet an die NF- $\kappa$ B-Regulatoren A20 und TRIAD3A

In dieser Arbeit konnten A20 und TRIAD3A als neue Interaktionspartner von UBXD1 identifiziert und sowohl im Yeast-Two-Hybrid-System (Abb. 9) als auch durch Ko-Immunpräzipitationen aus Säugerzelllysaten bestätigt werden (Abb 10 und Abb. 11). Dabei konnte beobachtet werden, dass für eine Bindung von A20 an UBXD1 eine funktionelle PUB-Domäne nötig, aber nicht hinreichend ist (Abb. 12). Um mehr Informationen über die molekularen Grundlagen der Interaktion zwischen A20 und UBXD1 zu erhalten, wurde die Interaktionsdomäne auf Seiten von A20 näher untersucht. A20 verfügt über eine N-terminale OTU-Domäne und sieben

charakteristische Zinkfinger-Motive. Für die Bindung von UBXD1 an A20 ist das siebte Zinkfinger-Motiv notwendig (Abb. 13) und hinreichend (S. Meyer und Prof. A. Buchberger, persönliche Kommunikation). Für TRIAD3A konnte gezeigt werden, dass es an alle getesteten UBXD1-Varianten binden kann und keine Abhängigkeit einer Bindung von einem vollständigen VIM oder einer intakten PUB-Domäne besteht (Abb. 11). Dieser (Akkon) neuer Interaktionspartner von UBXD1 im Rahmen dieser Arbeit trägt weiter zur Aufklärung neuer zellulärer Funktionen von UBXD1 bei. In früheren Studien wurde Ergic-53 durch massenspektroskopische Untersuchungen als Interaktionspartner von UBXD1 erkannt (Schäfer, 2007; Haines et al., 2012) und in dieser Arbeit per massenspektroskopische Untersuchungen und Ko-Immunpräzipitationen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Ob UBXD1 auch in der bekannten Funktion von Ergic-53 im Transport von Proteinen zwischen dem ER und dem Golgi eine Rolle spielt, blieb dabei jedoch offen. Weiterhin wurde mehrfach gezeigt, dass UBXD1 mit unterschiedlichen Komponenten des ERAD-Signalweges in einem Komplex vorliegen kann. In einer dieser Studie wird berichtet, dass die Depletion von UBXD1 nicht zu einer Stabilisierung des ERAD-Modell-Substrates CD3 $\delta$ -YFP führt (Madsen et al., 2008). In einer anderen Arbeit beobachteten die Autoren, dass sowohl die Depletion als auch die Überexpression von UBXD1 zu einer Stabilisierung des ERAD-Modell-Substrates CFTR $\delta$ F508 führt (Nagahama et al., 2009). Allerdings sind in diesen Experimenten nach Depletion oder Überexpression von UBXD1 schon die Ausgangs-Level des Modellsubstrates im Vergleich zu der Menge in Kontrollzellen stark erhöht. Ob der Abbau nach UBXD1-Depletion oder -Überexpression wirklich schlechter ist oder das ERAD-System durch die höhere Menge an Modellsubstrat überlastet ist, lässt sich deswegen schlecht abschätzen. Insgesamt ist eine Funktion von UBXD1 in ERAD also umstritten. Die bis jetzt am besten beschriebene zelluläre Funktion von UBXD1 liegt im endolysosomalen System. UBXD1 und p97 können einen Komplex mit Caveolin1 (Cav1) bilden (Ritz et al., 2011; Kirchner et al., 2013). Die Interaktion von Cav1 mit p97 ist hierbei allerdings nicht von UBXD1 abhängig, sondern auch in UBXD1-depletierten Zellen nachweisbar (Ritz et al., 2011). Funktionell konnte gezeigt werden, dass UBXD1 bei der Reifung von Endosomen zu Lysosomen beteiligt ist, wenn Cav1 überexprimiert ist und lysosomal abgebaut werden soll (Kirchner et al., 2013). Da die Lokalisation von UBXD1 selbst an *bona fide* späten Endosomen nur nachweisbar ist, wenn Cav1 überexprimiert wird (Ritz et al., 2011), ist die generelle Rolle von UBXD1 in diesem Kompartiment aber noch nicht vollständig geklärt. Als Beispiele wird deutlich, dass die Identifizierung von neuen Bindungspartnern von UBXD1 ein wichtiger Schritt zur Klärung von weiteren zellulären Funktionen ist. Neben A20 und TRIAD3A wurden auch SPG20 als neuer Interaktionspartner von UBXD1 bestätigt (Daten nicht gezeigt), allerdings nicht weiter charakterisiert. Interessanterweise sind alle drei neuen Interaktionspartner, die in Säugerzellen verifiziert werden konnten, zumindest in einem Teil ihrer Funktionen mit

dem endolysosomalen System in Verbindung gebracht worden. So wird ein Teil des in der Zelle vorhandenen A20 nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  an Vesikel rekrutiert (Li et al., 2008a), um den lysosomalen Abbau von TRAF2 zu regulieren (Li et al., 2009). Außerdem kolokalisiert A20 in Makrophagen nach Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges mit dem Lipoprotein Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> mit LC3 an der Membran von Autophagosomen (Kanayama et al., 2015). Überexpression von TRIAD3A in natürlichen Killerzellen (NK) verhindert eine Lokalisation des internalisierten NK-Zell-Rezeptors KIR2DL4 an Rab5-positiven frühe Endosomen und verhindert dessen Degradation (Miah et al., 2011). Auch SPG20 ist mit einer Funktion im endolysosomalen System in Verbindung gebracht worden. Sowohl die Depletion von SPG20 als auch die Überexpression führen zu einer schlechteren Internalisierung und Degradation von stimulierten EGF-Rezeptoren (Bakowska et al., 2007). SPG20 lokalisiert dabei sowohl an Endosomen mit internalisiertem EGF-Rezeptor als auch an vergrößerten Endosomen, die durch Überexpression einer dominant-negativen Mutante der ATPase Vps4 (*vacuolar protein sorting 4*) entstehen (Bakowska et al., 2007; Edwards et al., 2009). Diese Gemeinsamkeit zwischen den gefundenen Interaktionspartnern steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Rolle von UBXD1 im endolysosomalen System.

#### **4.4 Mögliche Modelle für den molekularen Mechanismus der UBXD1-vermittelten Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges**

Die Rolle von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg steht möglicherweise im Zusammenhang mit den gefundenen Interaktionen zwischen UBXD1 und A20 sowie TRIAD3A. Da in dieser Arbeit die Bindung zwischen A20 und UBXD1 genauer charakterisiert wurde, werden in diesem Abschnitt zwei hypothetische Modelle für die Funktion dieser Bindung im NF- $\kappa$ B-Signalweg beschrieben.

Der genaue Mechanismus der negativen Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch A20 ist noch nicht vollständig geklärt. Sehr wahrscheinlich erfüllt A20 unterschiedliche Funktionen in der Regulation des Signalweges. A20 besteht aus einer N-terminalen OTU-Domäne mit DUB-Aktivität und sieben charakteristischen Zinkfinger-Motiven. Die OTU-Domäne ist für die negativ regulierende Funktion von A20 im NF- $\kappa$ B-Signalweg in Reportergeräten-Experimenten nicht von Bedeutung (Song et al., 1996; Natoli et al., 1998; Klinkenberg et al., 2001; Evans et al., 2004; Li et al., 2008a; Lippens et al., 2011) und ist konsequenterweise auch nicht wichtig für die Inhibierung von IKK bei Überexpression von A20 (Skaug et al., 2011). Auch *Knock-In*-Mäuse, die eine DUB-inaktive Variante von A20 exprimieren, zeigen keine Auffälligkeiten wie z.B. Entzündungsreaktionen, die für eine Hyperaktivität des NF- $\kappa$ B-Signalweges sprechen (De et al., 2014). Dies war sehr überraschend, da einige Substrate wie z.B. TRAF6 (Boone et al., 2004; Lin et al., 2008) oder RIP1

(Wertz et al., 2004; Wertz et al., 2015), die von A20 de-ubiquitiniert werden können, den NF- $\kappa$ B-Signalweg regulieren. Die physiologische Relevanz für diese De-Ubiquitinierung ist also noch unklar. Zwar besteht die formale Möglichkeit, dass bei der Überexpression DUB-inaktiver A20-Varianten die Substrate von endogenen DUBs de-ubiquitiniert werden, allerdings kommen die beiden anderen DUBs, die hauptsächlich mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg in Verbindung gebracht werden, CYLD und Otulin, dafür wahrscheinlich nicht infrage. CYLD wird nach Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch Phosphorylierung inaktiviert (Reiley et al., 2005), und Otulin hat eine hohe Spezifität für lineare Ketten (Keusekotten et al., 2013), die von A20 nicht de-ubiquitiniert werden können (Mevisen et al., 2013). Tatsächlich sind die Level von ubiquitinierten TRAF6 in Makrophagen, die eine katalytisch inaktive Variante von A20 exprimieren nach Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges mit LPS erhöht (Wertz et al., 2015). Im Gegensatz zur OTU-Domäne sind die Zinkfinger-Motive vier bis sieben von A20 wichtig für die den NF- $\kappa$ B-Signalweg regulierende Aktivität von A20 (Klinkenberg et al., 2001; Li et al., 2008a). Andere Studien zeigten, dass nur der siebten Zinkfinger für die Regulation notwendig ist, wenn der NF- $\kappa$ B-Signalweg durch Überexpression von LUBAC aktiviert wird (Tokunaga et al., 2012; Verhelst et al., 2012). Außerdem schützt A20 in Abhängigkeit von dem siebten Zinkfinger Zellen vor TNF $\alpha$ /zVAD-induzierter Nekroptose (Draber et al., 2015). Dass UBXD1 mit genau einem der Zinkfinger von A20 interagiert, die wichtig für die Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges sind, ist ein Hinweis darauf, dass diese Interaktion relevant für die Rolle von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg sein könnte. Demnach könnte UBXD1 einen der beiden Prozesse regulieren, die mit diesem Zinkfinger in Zusammenhang gebracht worden sind, nämlich die Regulation von Wechselwirkungen innerhalb des *signaling*-Komplexes bzw. die lysosomale Degradation von TRAF2.

#### **4.4.1 Modell 1: UBXD1 reguliert die Bindung von A20 an lineare Ubiquitinketten**

Nach Stimulation mit TNF $\alpha$  werden wichtige Komponenten des NF- $\kappa$ B-Signalweges wie LUBAC und NEMO an den TNF-Rezeptor in einen *signaling*-Komplex rekrutiert (Haas et al., 2009). Dabei werden unterschiedliche Substrate von LUBAC mit linearen Ubiquitinketten modifiziert, die als Plattform zur Bindung anderer Faktoren der Signalkaskade dienen. Auch die Modifikation von NEMO mit linearen Ubiquitinketten ist ein essenzieller Schritt für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges (Tokunaga et al., 2009; Chen, 2012) (Abb. 29B). Das siebte Zinkfinger-Motiv von A20 bindet spezifisch an linear-verknüpfte Ubiquitinketten (Tokunaga et al., 2012; Verhelst et al., 2012; Wertz et al., 2015). A20 wird ebenfalls nach Stimulation mit TNF $\alpha$  in den Rezeptor-Komplex rekrutiert und bindet u.a. die LUBAC-Komponenten HOIL-1, HOIP und Sharpin (Tokunaga et al., 2012; Verhelst et al., 2012) (Abb. 29C).

Für die Bindung des LUBAC-Komplexes und NEMO ist der siebte Zinkfinger von A20 notwendig und hinreichend (Verhelst et al., 2012). Auch die Rekrutierung von A20 in den *signaling*-Komplex an den TNF-Rezeptor geht verloren, wenn eine verkürzte A20-Variante ohne den siebten Zinkfinger exprimiert wird (Tokunaga et al., 2012; Draber et al., 2015). Gleichzeitig kann A20 nicht in den *signaling*-Komplex rekrutiert werden, wenn Zellen eine enzymatisch inaktive Variante von HOIP exprimieren und so keine linearen Ubiquitinketten gebildet werden (Draber et al., 2015). Die Bindung von A20 an die Faktoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges über linearen Ubiquitinketten hat Folgen für den *signaling*-Komplex und die weiterführende Signalkaskade. So konkurriert A20 mit anderen Regulatoren um diese Bindestellen und fördert u.a. die Dissoziation von LUBAC und NEMO/IKK aus dem *signaling*-Komplex (Abb. 29C). Dadurch wird die weitere Signaltransduktion unterbrochen (Tokunaga et al., 2012; Draber et al., 2015). A20 verhindert außerdem nach Stimulation der Zellen mit TNF $\alpha$  gleichzeitig eine weitere Interaktion des LUBAC-Komplex mit NEMO (Verhelst et al., 2012) (Abb. 29C). Dies führt ebenfalls zu einer schlechteren Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges (Verhelst et al., 2012).

Es wäre also denkbar, dass UBXD1 eine Interaktion von A20 mit linearen Ubiquitinketten auflöst oder verhindert. So konnte gezeigt werden, dass A20 lineare Ubiquitinketten im *signaling*-Komplex vor dem Abbau durch DUBs schützt (Draber et al., 2015) (Abb. 29D). In UBXD1-depletierten Zellen wäre mehr A20 an die linearen Ketten im *signaling*-Komplex gebunden und dieser könnte schlechter wieder aufgelöst werden. Bei Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges könnten keine oder nur eine reduzierte Anzahl von Faktoren in den Komplex rekrutiert werden, da zu viele Bindestellen mit A20 besetzt wären. Die Interaktion zwischen wichtigen Komponenten des NF- $\kappa$ B-Signalweges wie LUBAC und NEMO wäre reduziert (Abb. 29C). Daher wäre eine vollständige Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nicht möglich.

**Abbildung 29: Modell zur UBXD1-abhängigen Regulation der Bindung von A20 an lineare Ubiquitinketten.** **A** In unstimulierten Zellen liegen wichtige Regulatoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges wie NEMO (N), LUBAC (L) und A20 (A20) cytoplasmatisch vor. **B** Nach Bindung von TNF $\alpha$  an den Rezeptor werden die Regulatoren in einen *signaling*-Komplex an den Rezeptor rekrutiert und LUBAC generiert lineare Ubiquitin(Ub)-Ketten. Dies führt zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges. **C** A20 bindet über das siebte Zinkfinger-Motiv lineare Ubiquitinketten und verhindert so die Interaktion zwischen dem *signaling*-Komplex und NEMO sowie LUBAC. **D** UBXD1 rekrutiert A20 aus dem *signaling*-Komplex und fördert so seine Auflösung, wodurch es zu einer erneuten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges kommen kann.

Um dieses Modell zu untersuchen wäre es möglich den *signaling*-Komplex nach Stimulation mit TNF $\alpha$  in UBXD1-depletierten Zellen durch Immunpräzipitation anzureichern und hinsichtlich der Interaktion mit A20 und anderen interessanten Komponenten wie NEMO und LUBAC zu analysieren.

#### 4.4.2 Modell 2: UBXD1 reguliert die Lokalisation von A20 an Vesikeln

A20 ist ein vorwiegend cytoplasmatisches Protein, das teilweise membran-assoziiert ist und an Vesikeln lokalisiert, die späten Endosomen entsprechen (Li et al., 2008a) (Abb. 30). Die A20-positiven Vesikel verschmelzen nach einiger Zeit mit Lysosomen (Li et al., 2008a). Die Vesikel-Assoziation von A20 verstärkt sich in TNF $\alpha$ -behandelten Zellen und ist abhängig von den beiden C-terminalen Zinkfinger-Motiven sechs und sieben (Li et al., 2008a). Die Korrelation dieser Lokalisation mit der Notwendigkeit des siebten Zinkfinger-Motivs für die Regulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges legt nahe, dass A20 den lysosomalen Abbau von Proteinen steuert, die für die Aktivierung des Signalweges eine Rolle spielen. So wurde tatsächlich gezeigt, dass A20 in Abhängigkeit von seiner Fähigkeit zur Membranassoziation den lysosomalen, Proteasom-unabhängigen Abbau von überexprimiertem TRAF2 reguliert (Li et al., 2009) (Abb. 30). Die Level von endogenem TRAF2 waren von A20 beeinflusst, wenn der lysosomale Abbau von TRAF2 durch Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch TWEAK induziert wurde (Li et al., 2009). Schon in Zusammenhang mit dem endolysosomalen System gebracht wurde (Ritz et al., 2011; Kirchner et al., 2013), wäre es denkbar, dass UBXD1 die Lokalisation von A20 an den Vesikeln reguliert. In diesem Modell bindet UBXD1 an den siebten Zinkfinger an A20 und verhindert so eine weitere Bindung von A20 an die Membran der Vesikel (Abb. 30). In UBXD1-depletierten Zellen wäre A20 länger an die Membran der Vesikel assoziiert und dadurch würde TRAF2 verstärkt abgebaut werden. So würde eine geringere Menge TRAF2 für die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges zu Verfügung stehen.

**Abbildung 30: UBXD1 reguliert die Lokalisation von A20 an Vesikeln des endolysosomalen Systems.** Nach Bindung von  $\text{TNF}\alpha$  an seinen Rezeptor TNF-R1 kommt es zur Aktivierung verschiedener Effektoren, wie z.B. TRAF2. Dies führt dann zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges. A20 bindet an die Membran von Vesikeln des endolysosomalen System, was zum lysosomalen Abbau von TRAF2 führt. Dadurch wird der NF- $\kappa$ B-Signalweg negativ reguliert. UBXD1 bindet an A20 und verhindert so eine Assoziation von A20 an die Vesikel. Der Effektor wird nicht länger lysosomal abgebaut und kann bei erneuter Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges die Signalkaskade aktivieren.

Interessanterweise interagiert TRAF2 wie der  $\text{p97}^{\text{UBXD1}}$ -Komplex auch mit Caveolin1 (Feng et al., 2001). Dies könnte auf eine gemeinsame Lokalisation an Vesikeln des endolysosomalen Systems hinweisen. A20 wird nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  an das Lysosom-assoziierte Kompartiment rekrutiert (Li et al., 2008a), allerdings wird TRAF2 nicht nach  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation abgebaut (Li et al., 2002b), sondern z.B. nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und gleichzeitiger Behandlung mit Aktinomycin D (Habelhah et al., 2002) oder nach Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges mit TWEAK (Li et al., 2009). Es ist also wahrscheinlich, dass A20 den lysosomalen Abbau von weiteren Faktoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges unter unterschiedlichen Bedingungen steuert. So wurde auch schon für TRAF6, das für den IL-1 $\beta$ -aktivierten NF- $\kappa$ B-Signalweg wichtig ist, gezeigt, dass es lysosomal abgebaut wird (Fang et al., 2012). Eine Interaktion zwischen A20 und TRAF6 wurde ebenfalls schon nachgewiesen (Heyninck und Beyaert, 1999; Garg et al., 2013); ob diese aber abhängig von einer Lokalisation an Vesikeln ist, wurde noch nicht untersucht. Da auch TRIAD3A mit einem Mitglied der TRAF-Familie, TRAF3, interagiert (Nakhaei et al., 2009), das ebenfalls lysosomal abgebaut werden kann (Xiu et al., 2014), wäre eine Analyse der Levels an den unterschiedlichen TRAF-Proteinen in UBXD1-depletierten Zellen von Interesse für weitere Arbeiten.

#### 4.4.3 Ausblick

Um die molekularen Grundlagen der Funktion von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalweg zu klären, sind noch weitere Experimente nötig. In einem ersten Schritt könnte man durch Immunfluoreszenzstudien bestimmen, wo UBXD1 und A20 innerhalb der Zelle interagieren. Eine Kolo-kalisation in Membrannähe spräche dafür, dass UBXD1 A20 aus dem *signaling*-Komplex am  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor rekrutiert. Dies ließe sich dann durch Analyse der Zusammensetzung des *signaling*-Komplexes in UBXD1-depletierten Zellen weiter untersuchen. Eine Kolo-kalisation an Vesikeln des endolysosomalen Systems wäre ein Indiz, dass UBXD1 an der Regulation der Stabilität unterschiedlicher Faktoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges beteiligt ist. Der nächste Schritt wäre dann, in UBXD1-depletierten Zellen die unterschiedlichen Level an TRAF-Proteinen oder anderer Faktoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges, die bekanntermaßen lysosomal abgebaut werden wie z.B. NEMO, zu bestimmen.

Unabhängig von den beiden Modellen ist es sinnvoll, die Degradationskinetik von I $\kappa$ B $\alpha$  nach Stimulation des NF- $\kappa$ B-Signalweges zuverlässig zu klären. Dafür wäre die vorgeschlagene Analyse von p65-gebundenem I $\kappa$ B $\alpha$  in UBXD1-depletierten Zellen hilfreich. Auch ist noch nicht abschließend geklärt, ob p97 ebenfalls in der Funktion von UBXD1 im NF- $\kappa$ B-Signalwege involviert ist. Reporter-gen-Experimente in Zellen, die UBXD1<sup>RL,5xPUB</sup>, das nicht mehr an p97 binden kann, von einem siRNA-resistenten Plasmid nach Depletion von endogenen UBXD1<sup>WT</sup> exprimieren, können diese Frage beantworten.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: BD, Fluka, Merck, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, VWR.

#### 5.1.2 Plasmide

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmidname	Insertion	Herkunft	Referenznummer
pGBDU-C1	-	James et al. (1996)	118
pGBDU-UBXD1 <sup>WT</sup>	UBXD1 <sup>WT</sup>	Kern et al. (2009)	1065
pGBDU-UBXD1 <sup>RL,5xPUB</sup>	UBXD1 <sup>RL,5xPUB</sup>	Stapf et al. (2011)	1560
pGBDU-UBXD1 <sup>5xPUB</sup>	UBXD1 <sup>5xPUB</sup>	Kern et al. (2009)	1207
pGBDU-p97	p97 <sup>WT</sup>	AG Buchberger	1184
pGBDU-PUB-Domäne	UBXD1 <sup>150-264</sup>	Kern et al. (2009)	1070
pGAD-C1	-	James et al. (1996)	94
pGAD-A20	A20	diese Arbeit	2238
pGAD-SPG20	SPG20	diese Arbeit	2264
pGAD-TRIAD3A	TRIAD3A	diese Arbeit	1932
pGAD-DZIP3	DZIP3	diese Arbeit	2262
pGAD-ZFAND2B	ZFAND2B	diese Arbeit	2263
pGAD-UBXD1	UBXD1	AG Buchberger	1064
pGAD-A20 <sup>OTU</sup>	A20 <sup>1-370</sup>	Enders (2015)	2242
pGAD-A20 <sup>ZnF 1-7</sup>	A20 <sup>370-790</sup>	Enders (2015)	2243
pGAD-A20 <sup>OTU ZnF1-6</sup>	A20 <sup>1-750</sup>	Enders (2015)	2244
pGAD-A20 <sup>ZnF 1-6</sup>	A20 <sup>370-750</sup>	Enders (2015)	2245
pGAD-A20 <sup>ZnF 4-6</sup>	A20 <sup>570-790</sup>	Enders (2015)	2246
pGAD-A20 <sup>ZnF 6-7</sup>	A20 <sup>690-790</sup>	Enders (2015)	2247
pGAD-A20 <sup>ZnF 7 Mut</sup>	A20 <sup>C779A/C782A</sup>	Enders (2015)	2249
pGAD-A20 <sup>ZnF 1-7 ZnF7 Mut</sup>	A20 <sup>370-790/C779A/C782A</sup>	Enders (2015)	2250

Plasmidname	Insertion	Herkunft	Referenznummer
pCMV-2B	-	Stratagene	413
pCMV-2B-UBXD1 <sup>WT</sup>	UBXD1 <sup>WT</sup>	AG Buchberger	895
pCMV-2B-UBXD1 <sup>RL</sup>	UBXD1 <sup>RL</sup>	Stapf et al. (2011)	1563
pCMV-2B -UBXD1 <sup>5xPUB</sup>	UBXD1 <sup>5xPUB</sup>	Kern et al. (2009)	1181
pCMV-2B UBXD1 <sup>RL,5xPUB</sup>	- UBXD1 <sup>RL,5xPUB</sup>	Stapf et al. (2011)	1566
pCMV-3B	-	Stratagene	595
pCMV-3B-A20	A20	Kehler (2012)	1919
pCMV-3B-TRIAD3A	TRIAD3A	diese Arbeit	1933
N-SF-TAP	-	Gloeckner et al. (2009)	1873
N-SF-TAP-UBXD1 <sup>WT</sup>	UBXD1 <sup>WT</sup>	diese Arbeit	2326

### 5.1.3 small interfering RNA (siRNA)

Lyophilisierte *small interfering RNAs* (siRNAs) wurden im Puffer der entsprechenden Firma gelöst (in der Regel zu 100 µM) und aliquotiert bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 3: Verwendete siRNAs**

Bezeichnung	Ziel-mRNA	Sequenz (5'→3')	Hersteller	Endkonzentration
Kontrolle	Luciferase	CGUACGCGGAAUACUUCGA	MWG	variabel
Kontrolle	GFP	GCAAGCUGACCCUGAAGUUC	MWG	variabel
p97_A	p97	CCCAAGAUGGAUGAAUUGCAGUUGU	Life technologies	25 nM
p97_B	p97	CACCUUCCAAGGGAGUUCUGUUCUA	Life technologies	25 nM
p97_C	p97	AUCUGUUUCCACCACUUUGAACUCC	Life technologies	25 nM
ATXN3_05	Ataxin-3	ACAGGAAGGUUAUUCUAUA	Dharmacon	25 nM
ATXN3_06	Ataxin-3	GGACAGAGUUCACAUCCAU	Dharmacon	25 nM
ATXN3_07	Ataxin-3	GCACUAAGUCGCCAAGAAA	Dharmacon	25 nM
ATXN3_08	Ataxin-3	GCAGGGCUAUUCAGCUAAG	Dharmacon	25 nM
UFD1L_05	UFD1L	GAGCGUCAACCUUCAAGUG	Dharmacon	25 nM
UFD1L_06	UFD1L	GGUAAGAUACUUUCAUCA	Dharmacon	25 nM
UFD1L_07	UFD1L	UGACAUGAACGUGGACUUU	Dharmacon	25 nM
UFD1L_08	UFD1L	CCCAAAGCCGUUUAGAAA	Dharmacon	25 nM
p37_13	p37	GUGCCGUAAUUAUGAGGAA	Dharmacon	25 nM

Bezeichnung	Ziel-mRNA	Sequenz (5'→3')	Hersteller	Endkonzentration
p37_14	p37	GCAAAAGGUUUAJACAGCCA	Dharmacon	25 nM
p37_15	p37	CUUCAAGAGCCCACGGACA	Dharmacon	25 nM
p37_16	p37	UGACUUCAUUUCCGAAUAA	Dharmacon	25 nM
FAF1_1	FAF1	GGACCCAAAUAAAUCAUUA	Dharmacon	50 nM
FAF1_3	FAF1	UGACGAAGCUAUUACAUUG	Dharmacon	50 nM
FAF1_4	FAF1	GAGGGAAGCUCACGAGAGA	Dharmacon	50 nM
FAF1_5	FAF1	GGAGAGACGUAACUCAACU	Dharmacon	50 nM
UBXD1_1	UBXD1	CCAAGUACCUGGACAACAU	Dharmacon	20 nM
UBXD1_2	UBXD1	GAAACCAGGUGAGAAAGGA	Dharmacon	20 nM
UBXD1_3	UBXD1	UCAUGAAGAUCUACACGUU	Dharmacon / MWG	10-25 nM
UBXD1_4	UBXD1	ACGAAACCUGGCCUUGAA	Dharmacon / MWG	10-25 nM

## 5.1.4 Antikörper

### 5.1.4.1 Primärantikörper

**Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper**

Antigen	Hersteller	Spezies	Referenznummer	Verdünnung
myc	Santa Cruz	Kaninchen	144	1:500
p97	Abcam	Maus	36	1:2.000
Flag	Sigma	Kaninchen	90	1:1.000
Tubulin	Sigma	Maus	136	1:1.000
Ataxin-3	Millipore	Maus	128	1:500
UFD1L	Ernst Jarosch	Kaninchen	155	1:500
FAF1	AG Buchberger	Kaninchen	65	1:10.000
Caveolin1	Santa Cruz	Kaninchen	142	1:2.500
UBXD1	ProteinTech Group	Kaninchen	147	1:2.000
p65	Cell signaling	Kaninchen	152	1:200
I $\kappa$ B $\alpha$	Cell Signaling	Maus	172	1:1.000

### 5.1.4.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper	Hersteller	Spezies	Reaktivität	Verwendung	Verdünnung
Alexa Fluor 488	Invitrogen	Ziege	Kaninchen	Immunfluoreszenz	1:500
Anti-Maus	Dianova	Ziege	Maus	Western Blot	1:7500
Anti-Kaninchen	Dianova	Ziege	Kaninchen	Western Blot	1:7500

### 5.1.5 Affinitätschromatographie-Matrizen

**Tabelle 6: Verwendete Affinitätschromatographie-Matrizen**

	Reaktivität	Hersteller	Verwendung
FLAG M2 Affinity Agarose Gel (Maus)	FLAG-Epitope	Sigma	Immunpräzipitation
Anti-c-Myc Agarose (Maus)	Myc-Epitope	Santa Cruz	Immunpräzipitation

### 5.1.6 p97-Inhibitoren

**Tabelle 7: Verwendete p97-Inhibitoren**

Inhibitor	Hersteller	Konzentration	Referenz
NMS-873	Sigma-Aldrich	5 µM	Magnaghi et al. (2013)
DBeQ	Sigma-Aldrich	10 µM	Chou et al. (2011)

### 5.1.7 Transfektionsreagenzien

**Tabelle 8: verwendete Transfektionsreagenzien**

Reagenz	Hersteller	Anwendung
Oligofectamine	Invitrogen	siRNA-Transfektion (HeLa)
JetPRIME	Peqlab	siRNA-Transfektion (HEK293T), DNA-Transfektion (HeLa)

### 5.1.8 Kits

**Tabelle 9: Verwendete Kits**

Kit	Hersteller	Verwendung
NucleoSpin Plasmid Extract II	Macherey-Nagel	Gelextraktion und PCR-Aufreinigung
NucleoSpin Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel	Aufreinigung von Plasmid-DNA (Miniprep)
Nucleobond PC 500	Macherey-Nagel	Aufreinigung von Plasmid-DNA (Maxiprep)
ZR Plasmid Miniprep-Classic	Zymo Research	Aufreinigung von Plasmid-DNA (Miniprep)
QuickCange Lightening	Stratagene	Mutagenese-PCR
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel	Aufreinigung von RNA
High Pure RNA Isolation Kit	Roche	Aufreinigung von RNA
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche	cDNA-Synthese
Beetle Juice BIG Kit	P.J.K.	Reportergenexperimente
β-Gal Juice PLUS KIT	P.J.K.	Reportergenexperimente

### 5.1.9 *E.coli* Stämme

Tabelle 10: Verwendete *E.coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft	Verwendung
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac- [F' proAB lacI<sup>f</sup> lacZ ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene	Herstellung von Plasmid-DNA
XL10 Gold	<i>Tetr Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacI [F' proAB lacI<sup>f</sup> lacZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene	Mutagenese-PCR

### 5.1.10 Hefestämme

Tabelle 11: Verwendete Hefestämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
PJ69-4a	<i>MATa, trp1-901, leu2-3,-112, ura3-52, his3D200,gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2::GAL1- HIS3, met2::GAL7-lacZ</i>	James et al. (1996)

### 5.1.11 Zelllinien

Tabelle 12: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Verwendung
HEK293T	American Type Culture Collection (ATCC)	Ko-Immünpräzipitation, Echtzeit-PCR
HeLa WT	American Type Culture Collection (ATCC)	Echtzeit-PCR, Immunfluoreszenz
HeLa 57a	AG Szalay (Rodriguez et al., 1999)	Reportergenexperimente

### 5.1.12 Zellkultur

Tabelle 13: Verwendete Materialien für die Zellkultur

Material	Herkunft
DMEM	Gibco, Life Technologies
FBS	Gibco, Life Technologies
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 0,53 mM EDTA)	Gibco, Life Technologies
Opti-MEM	Gibco, Life Technologies
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml	Gibco, Life Technologies
G418	Roth

### 5.1.13 Weitere Materialien

Tabelle 14: Weitere verwendete Materialien

Reagenz	Firma	Verwendung
Hoechst 33342	Invitrogen	Immunfluoreszenz
TNF $\alpha$	ImmunoTools	Stimulierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges
IL-1 $\beta$	ImmunoTools	Stimulierung des

Reagenz	Firma	Verwendung
		NF- $\kappa$ B-Signalweges
BSA	Sigma	Negativkontrolle für die Stimulierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck	Stimulierung des atypischen NF- $\kappa$ B-Signalweges
Doxorubicin	Sigma	Stimulierung des atypischen NF- $\kappa$ B-Signalweges
5x Passive Lysis Buffer	Promega	Reportergenexperimente
FastStart Essential DNA Green Master	Roche	Echtzeit-qPCR
Lachs Sperma DNA	Invitrogen	Herstellung kompetenter Hefezellen
Precision Plus Protein Standards All Blue	BioRad	Western Blot
PVDF-Membran	Millipore	Western Blot
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Rad	Western Blot
ECL	GE Healthcare	Western Blot
ECL-Hyperfilm	GE Healthcare	Western Blot
Filtermembran (Porengröße: 0,05 $\mu$ M)	Millipore	Entsalzung von Ligationsansätzen
GeneRuler DNA LadderMix	Fermentas	DNA-Elektrophorese

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 *E. coli*-Methoden

#### 5.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Zur Anzucht von Bakterien wurden Flüssigkulturen in Luria-Bertani (LB)-Medium (0,5 % w/v NaCl, 0,5 % w/v Hefeextrakt und 1 % w/v Trypton) über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Alternativ wurden Bakterien auf Agarplatten bei 37 °C über Nacht selektioniert. Um LB-Agarplatten zu erhalten, wurde dem Medium vor dem Autoklavieren Bactoagar in einer Konzentration von 2 % w/v zugegeben. Das zur Selektion genutzte Kanamycin (30 µg/ml), Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (34 µg/ml) bzw. Tetrazyklin (2,5 µg/ml) wurde für Agarplatten zum Medium dazugeben, nachdem es auf etwa 50 °C abgekühlt war. Für Flüssigkulturen wurde das Medium kurz vor der Verwendung mit dem entsprechenden Antibiotikum derselben Konzentrationen versetzt. Für die langfristige Lagerung wurden Bakterien aus einer Übernachtskultur pelletiert, in 15 % Glycerin aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

#### 5.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Um elektrokompetente XL1-blue-Bakterien herzustellen, wurde aus einer Übernachtskultur (LB-Tetrazyklin) eine 500 ml-Kultur in antibiotikafreiem LB-Medium inokuliert und zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 herangezogen. Dann wurde die Kultur für 30-60 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (4.300 g, 10 Min, 4 °C) pelletiert und mit 500 ml eiskaltem, sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 250 ml eiskaltem, sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Bakterien in 10 ml eiskaltem, sterilem 10 % Glycerin resuspendiert und erneut für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert und in 1,5 ml eiskaltem, sterilem 10 % Glycerin resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

#### 5.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Um chemisch kompetente XL1-blue-Bakterien herzustellen, wurde aus einer Übernachtskultur (LB-Tetrazyklin) eine Kultur in antibiotikafreiem LB-Medium inokuliert und zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 herangezogen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (4.300 g, 10 Min, 4 °C) pelletiert. Die Bakterien wurden in 100 mM eiskalter, steriler CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut zentrifugiert und

das Pellet in 1/10 Volumen 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurde DMSO zu einer finalen Konzentration von 10 % hinzugegeben, die Bakterienzellen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

#### 5.2.1.4 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

##### 5.2.1.4.1 Transformation von elektrokompetenten *E. coli*

Um *E. coli* mit Plasmid-DNA aus Ligationsreaktionen zu transformieren, wurden 50 µl elektrokompetenter Bakterienzellen und 1-2 µl entsalzter Ligationsansatz in einer Elektroporationsküvette (0,1 cm Spaltbreite) miteinander gemischt. Die Standardeinstellung des Mikropulsers (BioRad) betrug 1,8 kV. Direkt nach der Elektroporation wurden die Bakterien in 200 µl LB-Medium ohne Antibiotika aufgenommen und für 45 Minuten und 800 rpm bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf einer entsprechenden Selektions-Agarplatte ausgestrichen.

##### 5.2.1.4.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Für die Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA wurde 50 µl *E. coli* mit 50-100 µg Plasmid-DNA gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen und kurz auf Eis abgekühlt. Danach wurden 200 µl LB-Medium ohne Antibiotika zu den Zellen gegeben, die dann für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Der gesamte Ansatz wurde dann auf einer Selektions-Agarplatte ausgestrichen.

##### 5.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Miniprep) wurde mit Kits der Firmen Macherey-Nagel (NucleoSpin Plasmid Quick Pure) oder Zymo Research (ZR Plasmid Miniprep-Classic) nach Angaben der Hersteller aus 4 ml-Übernachtskulturen isoliert. Zur Transformation von Säugerzellen wurde zuvor Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxiprep) aus 500 ml-Übernachtskulturen mit einem Kit von Macherey-Nagel (Nucleobond PC 500) isoliert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bestimmt, wobei eine OD<sub>260</sub>=1 einer Konzentration von 50 µg/ml entsprach.

## 5.2.2 Molekular-biologische Methoden

### 5.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten von Plasmid-DNA wurde die Phusion DNA-Polymerase (NEB) verwendet. Die Anlagerung der Primer erfolgte bei einer Temperatur, die von Nukleotid-Komposition und Länge der verwendeten Primer abhing. Die Länge der Extension wurde nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes berechnet (1 Min/kb). Standardmäßig wurden 25 ng Plasmid-DNA als Matrizen-DNA verwendet.

Standardansatz PCR:

25 ng Matrizen-DNA  
10 µl 5xHF Puffer  
1 µl dNTPs (10 mM)  
1 µl 3'-Primer (10 µM)  
1 µl 5'-Primer (10 µM)  
1 µl Phusion DNA Polymerase  
ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Für die PCR wurde ein PCR-Cycler der Firma Biometra verwendet. Zur Aufreinigung des Produktes wurde das NucleoSpin Extrakt Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

### 5.2.2.2 Zielgerichtete Punktmutagenese

Basen in der kodierenden Sequenz wurden über eine PCR-basierte Methode mittels des QuickChange Lightning Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Da bei der Reaktion das gesamte Plasmid amplifiziert wurde, konnte die methylierte Matrizen-DNA anschließend durch einen DpnI-Verdau entfernt werden. Ein Teil des Produktes wurde anschließend für die Transformation von chemisch kompetenten XL-10 Gold-Bakterien (Stratagene) benutzt.

### 5.2.2.3 Restriktionsverdau

Für die sequenzspezifische Spaltung von Plasmiden oder PCR-Fragmenten wurde die DNA mit Restriktionsenzymen (Fermentas oder NEB) nach Angaben des Herstellers in dem empfohlenen Puffer inkubiert. Dabei wurden bei Klonierungen in der Regel 1-2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. PCR-Ansätze wurden nach Aufreinigung mittels Kit vollständig verdaut, nachdem 10 % des Ansatzes durch Gel-Elektrophorese auf das Vorhandensein des gewünschten PCR-Produktes kontrolliert

worden waren. Bei Restriktionsanalysen von Plasmiden wurden etwa 500 ng DNA verwendet. Die Restriktionsansätze wurden in der Regel für 2 Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 5.2.2.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld wurden 1-2%ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde zunächst die Agarose in 1xTBE-Puffer (89 mM Tris-HCl pH 8,3, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Danach wurde Ethidiumbromid (final: 0,5-1 mg/ml) dazugegeben und die Lösung in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen. Für die Aussparung der Ladekammern wurde ein entsprechender Kamm hineingehängt. Die DNA-Proben wurden mit 6xDNA-Ladepuffer (0,1 M EDTA, 1 % SDS, 20 % Glycerol, 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol) gemischt und in die Taschen des Gels geladen. Die Agarosegelelektrophorese wurde bei einer Spannung bis maximal 80-110 V in einer Horizontalkammer in 1xTBE-Puffer durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Banden unter UV-Beleuchtung identifiziert. Bei Klonierungen wurde ein Gelstück mit der zu extrahierenden DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Daraufhin wurde die DNA mithilfe des NucleoSpin Extract II Kits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte typischerweise in 30 µl Puffer.

#### 5.2.2.5 Vektor-Dephosphorylierung und Ligation

Um eine Rezirkularisation des Zielvektors zu verhindern, wurden die Enden des geschnittenen Plasmides mit Antarktischer Phosphatase (NEB) bei 37 °C für 20 Minuten dephosphoryliert. Anschließend wurde das Enzym für 10 Minuten bei 65 °C inaktiviert.

Um DNA-Fragmente in geschnittene Vektoren zu ligieren, wurde folgender Standardansatz verwendet:

- 4,5 µl Insertion
- 0,5 µl Plasmid
- 2 µl 10xT4-DNA-Ligasepuffer (NEB)
- 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB)
- 12 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Ligation wurde entweder bei Raumtemperatur für zwei Stunden oder bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz 20 Minuten auf einer Filtermembran mit einer Ausschlußgröße von 0,05 µm (Millipore) gegen ddH<sub>2</sub>O

dialysiert. Von dem entsalzten Ligationprodukt wurden dann 1-2 µl für die Transformation von elektrokompetenten *E. coli* eingesetzt.

#### 5.2.2.6 Sequenzierung

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen wurden Sequenzierungen mit Standardprimern oder insertionsspezifischen Primern von GATC Biotec durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Lasergene (DNASTAR) analysiert.

#### 5.2.2.7 cDNA-Synthese

Zelluläre RNA wurde aus Zellen eines Wells einer 6-Well-Zellkulturplatten mit einem Kit der Firma Macherey-Nagel (NucleoSpin RNA) oder Roche (High Pure RNA Isolation Kit) nach Angaben der Hersteller isoliert. Für die Analyse von Proteinen aus dem Zellysat wurden diese mit Aceton gefällt. Dafür wurde während der Aufreinigung der erste Durchfluss nach Bindung der RNA an die Säule aufgehoben und die enthaltenen Proteine mit 4 Volumen Aceton gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 1xProbenpuffer resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, wobei eine  $OD_{260}=1$  einer Konzentration von 40 µg/ml entsprach. Die RNA wurde dann bei -80 °C gelagert. Für die cDNA-Synthese mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) wurden 500-750 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde zusammen mit Oligo(dT)-Primer für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert und dann direkt auf Eis abgekühlt, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Standardansatz:

- 12 µl RNA und ddH<sub>2</sub>O
- 1 µl Oligo(dT)-Primer
- 4 µl 5xPuffer
- 0,5 µl RNase Inhibitoren
- 2 µl dNTPs
- 0,5 µl Reverse Transkriptase

Die cDNA-Synthese erfolgte bei 55 °C für eine Stunde, danach wurde die Reverse Transkriptase für 10 Minuten bei 85 °C inaktiviert.

#### 5.2.2.8 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Um die Menge einer spezifischen mRNA bzw. cDNA in einer Probe zu bestimmen, wurden quantitative Echtzeit-PCRs (qPCR) durchgeführt. Die Menge wurde normiert

auf die Mengen für die Haushaltsgene Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) und Hypoxanthine-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT).

Standardansatz:

- 4 µl cDNA (1:20 verdünnt)
- 6 µl SybrGreen (FastStart Essential DNA Green Master, Roche)
- 0,24 µl 3'-Primer (10 µM)
- 0,24 µl 5'-Primer (10 µM)
- 1,52 µl H<sub>2</sub>O

Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung	95 °C	10 Minuten	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	20 Sekunden	45 Zyklen
Anlagerung der Primer	65 °C	20 Sekunden	
Extension	72 °C	20 Sekunden	
Schmelzkurve			1 Zyklus
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Die qPCRs wurden in einem Cyler der Firma BioRad (CFX96 Touch) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem dazugehörigen Programm „CFX Manager Software“.

### 5.2.3 *S. cerevisiae*-Methoden

#### 5.2.3.1 Kultivierung und Lagerung von *S. cerevisiae*

Flüssigkulturen von *S. cerevisiae* wurden in YPD (2 % w/v Glukose, 1 % w/v Hefeextrakt, 2 % w/v Bactopepton)- oder SC-Medium (s.u.) angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm geschüttelt. Agarplatten wurde bei 30 °C für 3 Tage inkubiert. Die Dichte von Kulturen wurde photometrisch über die OD<sub>600</sub> bestimmt. Für eine langfristige Lagerung wurden Hefezellen aus Flüssigkulturen pelletiert, in 15 % Glycerin resuspendiert und direkt bei -80 °C eingefroren.

Für die Selektion von Plasmid-tragenden Hefezellen wurden Auxotrophiemarker verwendet. Dazu wurden die Hefezellen in synthetischem Kompletmedium (SC-Medium) ohne die entsprechenden Aminosäuren und Nukleobasen kultiviert. Für die Selektion auf Platten wurden Agarplatten aus SC-Medium verwendet, die durch die Zugabe von 2% w/v Agar zum entsprechenden Medium gegossen werden konnten.

SC-Medium:

- 2 % (w/v) Glukose
- 0,67 % (w/v) Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
- 0,2 % (w/v) Drop-Out-Pulver

Wenn nötig wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt

Drop-Out-Pulver für SC-Medium:

36,7 g Master-Mix-Drop-Out-Pulver und die folgenden Aminosäuren mit Ausnahme der für die Auxotrophiemarker

- 2 g Histidin
- 4 g Leucin
- 2 g Uracil
- 2 g Tryptophan
- 2 g Methionin
- 0,5 g Adenin

Master-Mix-Drop-Out-Pulver:

- 20 g Alanin
- 20 g Arginin
- 20 g Asparagin
- 20 g Aspartat
- 20 g Cystein
- 20 g Glutamin
- 20 g Glutamat
- 20 g Glyzin
- 20 g Inositol
- 20 g Isoleucin
- 20 g Lysin
- 2 g Para-Aminobenzoësäure
- 20 g Phenylalanin
- 20 g Prolin
- 20 g Serin
- 20 g Threonin
- 20 g Tryptophan
- 20 g Tyrosin
- 20 g Valin

#### 5.2.3.2 Herstellung kompetenter Hefezellen (Knop et al., 1999)

Für die Herstellung kompetenter PJ69-4a-Hefezellen wurden 50 ml YPD (+ 20 µg/ml Adenin) mit einer Übernachtskultur auf  $OD_{600}=0,1$  angeimpft und dann bei 30 °C und 180 rpm zu  $OD_{600}=0,5-0,7$  angezogen. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (500 g, 5 Min, RT) pelletiert und mit 20 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 10 ml SORB Puffer (100 mM LiOAc, 10 mM Tris-

HCl pH 8, 1 mM EDTA/NaOH pH 8, 1 M Sorbitol; pH 8) resuspendiert. Nach Zentrifugation wurden der Überstand abgenommen und das Pellet in 360 µl SORB Puffer und 40 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml, 5 Minuten bei 99 °C denaturiert, dann sofort auf Eis abgekühlt) resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert und ohne Schockgefrierung bei -80 °C gelagert.

#### 5.2.3.3 Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA (Knop et al., 1999)

Um Hefezellen mit Plasmiden zu transformieren, wurden 10 µl kompetente Hefezellen mit 2 µl Plasmid-DNA gemischt. Dann wurden 60 µl PEG Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithium Acetat, 40 % PEG3350) dazugegeben und durch vortexen gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 9 µl DMSO dazugegeben und anschließend bei 42 °C für 15 Minuten im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (500 g, 2 Min, RT), in 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen.

#### 5.2.3.4 Interaktionsstudien mittels Yeast-Two-Hybrid-Tests

Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen wurden mittels Yeast-Two-Hybrid-Interaktionstests nachgewiesen. Dafür wurde die kodierende Sequenz eines der zu untersuchenden Proteine in das Leseratern hinter das Gen für die aktivierende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors in den Vektor pGAD-C1 kloniert (James et al., 1996). Die kodierende Sequenz des anderen Proteins wurde entsprechend hinter das Gen für die DNA-bindende Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors kloniert (James et al., 1996). Danach wurden PJ69-4a-Zellen mit den gewünschten Kombinationen an Vektoren transformiert und auf den Selektionsplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubation von drei Tagen bei 30 °C wurden mehrere Kolonien in 1 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach Bestimmung der OD<sub>600</sub> wurde die Zellsuspension auf OD<sub>600</sub>=0,5 eingestellt. Davon wurden vorsichtig 5 µl auf die entsprechenden Selektionsplatten getropft und diese bei 30 °C für drei Tage inkubiert.

### 5.2.4 Zellkulturtechniken

#### 5.2.4.1 Kultivierung und Lagerung von Säuger-Zellen

Die Zelllinien HeLa und HEK293T wurden in Vollmedium (DMEM, 10 % FBS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Penicillin) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. HeLa 57A-Zellen wurden im selben Medium unter identischen Bedingungen kultiviert, das Medium wurde jedoch zur Selektion auf das NF-κB-abhängige

Reportergen Luciferase regelmäßig zusätzlich mit 500 µg/ml G418 versetzt. Alle Zelllinien wurden standardmäßig alle 3-4 Tage vereinzelt, bei Bedarf öfter. Dafür wurde die Zellkulturschale schräg gehalten und das Medium vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden Medienreste durch vorsichtiges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden durch Inkubation mit Trypsin-EDTA bei 37 °C vom Boden der Kulturschale gelöst und vereinzelt. Nach 3-5 Minuten wurde das Trypsin durch Zugabe von Vollmedium inhibiert und die Zellen durch auf- und abpipettieren weiter vereinzelt. Anschließend erfolgte die Überführung eines Teils der Zellsuspension in eine neue Kulturschale. Das Volumen wurde durch frisches Vollmedium aufgefüllt.

#### 5.2.4.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Wenn die genaue Zelldichte in einer Zellsuspension bestimmt werden musste, wurden die Zellen wie oben beschrieben von der Zellkulturschale gelöst. Nach Inhibition des Trypsins wurde ein kleiner Teil der Zellsuspension 1:4 mit Trypanblau (0,25 % w/v in PBS) vermischt. Von dieser Lösung wurden 10 µl zwischen Deckglas und Zählkammer einer Neubauer-Kammer pipettiert. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen in den 16 mittleren Felder der Neubauer-Kammer bestimmt. Tote Zellen, die sich bei dieser Behandlung durch eine deutliche Blaufärbung auszeichnen, wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Zellzahl pro ml ergibt sich dabei aus der Multiplikation der Zellen mit  $10^4$  und dem Verdünnungsfaktor 4.

#### 5.2.4.3 Transfektion von Zellen mit DNA

##### 5.2.4.3.1 Transfektion von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden durch die Calciumphosphat-Methode transfiziert. Dabei bilden sich Präzipitate aus Calciumphosphat und DNA, die von den Zellen endozytotisch aufgenommen werden. Am Vortag wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in einer ø10 cm-Kulturschale in Vollmedium ausgesät. Für die Transfektion wurde ein Gemisch von 12 µg oder 15 µg DNA in 450 µl ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Dann wurden 20 µl Chloroquine (20 mM) zu den Zellen gegeben und diese wieder in den Inkubator gestellt. Zu dem DNA-Gemisch wurden 50 µl Calciumchlorid-Lösung (2,5 M) gegeben und jeder Ansatz sofort nach Zugabe zehn Sekunden durch vortexen gut gemischt. Dann wurden langsam 500 µl 2xHBS (274 mM NaCl, 10 mM KCL, 40 mM HEPES, 1,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,05) zu dem Gemisch gegeben und das Reaktionsgefäß dabei rotiert. Nach einer Inkubation von drei Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung dann vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach fünf Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden nach weiteren 38-46 Stunden verwendet. Die Transfektionseffizienz konnte durch Ko-Transfektion eines für GFP kodierenden Plasmides und Betrachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft werden

#### 5.2.4.3.2 Transfektion von HeLa 57A-Zellen

HeLa 57A-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz JetPRIME nach Angaben des Herstellers transfiziert. Hierbei handelt es sich um ein kationisches Reagenz, das Komplexe mit der DNA bildet, die endozytotisch von den Zellen aufgenommen werden. Direkt vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit antibiotikafreiem Medium durchgeführt.

#### 5.2.4.4 Transfektion von Zellen mit siRNA

##### 5.2.4.4.1 Transfektion von HeLa 57A- und HeLa-Zellen mit siRNA

HeLa 57A- und HeLa-Zellen wurden mit siRNA durch das Transfektionsreagenz Oligofectamine transfiziert. Die finalen Konzentrationen der unterschiedlichen siRNAs sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Die Zellen wurden am Vortag in antibiotikafreiem Medium ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Dichte von 40-60 % hatten. Für die Transfektion wurden zwei Lösungen hergestellt. Lösung A enthielt die gewünschte Menge an siRNA in Opti-MEM. Lösung B enthielt Oligofectamine und Opti-MEM. Die Mengen richteten sich nach der Größe des Kulturgefäßes und sind der Tabelle 14 zu entnehmen. Nach fünfminütiger Inkubation wurde Lösung B zu Lösung A gegeben und beide durch Pipettieren gut durchmischt. Nach weiteren 20 Minuten wurde die Mischung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel zu Vollmedium.

**Tabelle 15: Zusammensetzung der Transfektionslösungen für siRNA in Abhängigkeit der Größe des Zellkulturgefäßes**

Kulturgefäß	Lösung A		Lösung B	
	siRNA	Opti-MEM	Oligofectamine	Opti-MEM
96-Well	variabel	10 µl	0,4 µl	2,6 µl
12-Well	variabel	100 µl	1 µl	24 µl
6-Well	variabel	200 µl	3 µl	48 µl

#### 5.2.4.4.2 Transfektion von HEK293T-Zellen mit siRNA

Zur Transfektion von HEK293T-Zellen mit siRNA wurde das Transfektionsreagenz JetPRIME nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 5.2.4.5 NF-κB-Reporterexperimente

Die Bestimmung der NF-κB-abhängigen Expression des Reportergens Luciferase erfolgte in Triplikaten. HeLa 57A-Zellen wurden in 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert und den Versuchsbedingungen entsprechend behandelt. Die Zellen wurden dann mit 500 µl PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurde jedem Well 250 µl *Passive Lysis Puffer* (Promega) zugegeben und die Platten für 30 Minuten auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysate wurden dann möglichst vollständig in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden die Lysate bei -80 °C gelagert. Um unlösliche Zellbestandteile zu pelletieren, wurden die Lysate nach dem Auftauen zentrifugiert (10.000 g, 10 Min, 4 °C). Für die Messung der Luciferaseaktivität wurden 20 µl oder 40 µl Zelllysate und 50 µl *Beetle Juice* (P.J.K.) verwendet. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte 2 Sekunden nach Zugabe des Substrates über einen Zeitraum von 10 Sekunden im Luminometer (TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader, Berthold). Zur Normalisierung der Luciferaseaktivität wurde die β-Galaktosidase-Aktivität in den Zellen bestimmt. Dafür wurden 5 µl Zelllysate mit 50 µl *β-Gal-Juice* (P.J.K.) in einer 96-Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion dann im Luminometer (TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader, Berthold) durch die Zugaben von 50 µl *triggering reagent* gestoppt. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten über einen Zeitraum von zwei Sekunden. Danach wurden die Lysate wieder in flüssigen Stickstoff eingefroren, sodass man die Messung bei Bedarf wiederholen konnte. Um die relative Luciferaseaktivität zu erhalten, wurde die Luciferaseaktivität durch die β-Galaktosidase-Aktivität geteilt.

#### 5.2.4.6 Herstellung von Zelllysaten für Western Blots

Die Kinetik der Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  nach Stimulation von HeLa-Zellen mit Zytokinen wurde per Western Blot untersucht. Dafür wurden Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und mit siRNA transfiziert. Die Stimulation der Zellen erfolgte dabei nicht zu einem gemeinsamen Startpunkt, sondern zeitlich so versetzt, dass sie zusammen beim Zeitpunkt „Null“ geerntet wurden. Dafür wurden die Zellen nach Ablauf der Zeit auf Eis gestellt, dann das Medium vorsichtig abgesaugt und mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde je 1 ml PBS dazugegeben, die Zellen mit einem Zellspatel abgelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Restliche Zellen wurden mit 500  $\mu$ l PBS vom Boden gelöst und ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (500 g, 5 Min, 4 °C) pelletiert. Nachdem das PBS abgesaugt wurde, wurde das Pellet in 35-50  $\mu$ l 1xProbenpuffer resuspendiert und anschließend bei 99 °C für 10 Minuten unter Schütteln aufgeköcht.

Für Western Blots im bei Experimenten im 96-Well-Format wurden die Zellen von drei Wells nacheinander im Well mit insgesamt 70  $\mu$ l 1xProbenpuffer denaturiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

#### 5.2.4.7 Immunfluoreszenz im 96-Well-Format

##### 5.2.4.7.1 siRNA-Transfektion im 96-Well-Format

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA im 96-Well-Format wurde mit dem Transfektionsreagenz Oligofectamine durchgeführt. Zellen wurden am Vortag in die inneren 60 Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte für Fluoreszenzmikroskopie (Advanced TC<sup>TM</sup> schwarze 96 Well Zellkultur Microplate  $\mu$ CLEAR Boden, Greiner Bio; Wachstumsfläche pro Well: 34 mm<sup>2</sup>) in 100  $\mu$ l antibiotikafreiem Kulturmedium ausgesät. Um Verdunstungseffekte zu vermeiden, wurden die Wells des äußeren Randes mit 150  $\mu$ l Vollmedium gefüllt. Für die Transfektion wurde pro Well eine Lösung A aus 2,5  $\mu$ l einer 1  $\mu$ M siRNA-Stocklösung und 10  $\mu$ l Opti-MEM sowie eine Lösung B aus 0,4  $\mu$ l Oligofectamine und 2,6  $\mu$ l Opti-MEM hergestellt. Im Gegensatz zur Transfektion in größeren Formaten wurde im 96-Well-Format diese Lösung mit antibiotikafreiem Medium zu einem Endvolumen von 100  $\mu$ l vermischt und direkt zu den Zellen gegeben und nicht in das Medium des Kulturgefäßes getropft. Am nächsten Tag wurde das Medium zu Vollmedium gewechselt.

#### 5.2.4.7.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die Kerntranslokation von p65 wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zytokin-Stimulation durch indirekte Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Vor Beginn der Immunfluoreszenzfärbung wurden die HeLa-Zellen für die angegebene Zeitspanne mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  stimuliert, sodass die Zeitspannen zum selben Zeitpunkt abgelaufen sind. Anstatt die Zytokine verdünnt zum Medium dazu zugeben, wurde hier Vollmedium mit der gewünschten Konzentration hergestellt und dieses durch einen Mediumwechsel zu den Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit BSA inkubiert. Für jede Bedingung wurden Triplikate angefertigt. Zum Endzeitpunkt der Stimulation wurden die Zellen auf einer eiskalten Metallplatte auf Eis gestellt. Das Medium wurde abgesaugt und durch eiskaltes PBS<sup>++</sup> (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,5; 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,49 mM MgCl<sub>2</sub>) (100  $\mu$ l/Well) ersetzt. Nach fünf Minuten wurde das PBS<sup>++</sup> ausgewechselt und erneut fünf Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen für 20 Minuten mit 3 % PFA (3 % PFA in ddH<sub>2</sub>O) fixiert (50  $\mu$ l/Well). Nachdem die PFA-Lösung durch PBS<sup>++</sup> ersetzt wurde, wurden die Zellen bei Bedarf über Nacht bei 4 °C gelagert. Die anschließende Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch eine 20-minütige Inkubation mit Permeabilisierungspuffer (0,3 % v/v Triton-X 100 in PBS<sup>++</sup>) (100  $\mu$ l/Well) bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper durch 30-minütige Inkubation mit Blocklösung (0,3 % v/v Triton-X 100, 5 % w/v BSA in PBS<sup>++</sup>) (100  $\mu$ l/Well) gesättigt. Die Zellen wurden dann über Nacht mit dem Antikörper gegen p65 (1:200 in 0,3 % v/v Triton-X 100, 1 % w/v BSA in PBS<sup>++</sup>) (50  $\mu$ l/Well) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS<sup>++</sup> bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit dem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500 in 0,3 % v/v Triton-X 100, 1 % w/v BSA in PBS<sup>++</sup>) (50  $\mu$ l/Well) erfolgte für zwei Stunden abgedeckt bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen erneut für jeweils fünf Minuten mit PBS<sup>++</sup> gewaschen. Der Zellkern wurde durch Hoechst 33342 (0,75  $\mu$ g/ml in PBS<sup>++</sup>) (50  $\mu$ l/Well) für fünf Minuten markiert. Überschüssiges Hoechst wurde durch einen zweiminütigen Inkubationsschritt mit PBS<sup>++</sup> entfernt. Zur Lagerung wurden die Wells der Mikrotiterplatte mit 100  $\mu$ l PBS<sup>++</sup> gefüllt, mit einer metallbeschichteten Folie versiegelt und bei 4 °C dunkel gelagert.

#### 5.2.4.7.3 Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in der Mikroskopieeinheit „*Core facility functional genomics*“ der AG Eilers von Frau Dr. U. Eilers mit dem Operetta *High Content Imaging* System (Perkin Elmer) erstellt. Es wurden ein 20x *long working distance* Objektiv (Exzitation: 50 %, Transmission: 0 %) sowie die Filter für Alexa Fluor 488 (Exzitation: 460-490 nm, Emission: 500-550 nm) und Hoechst 33342 (Exzitation: 360-400 nm, Emission: 410-480 nm) verwendet. Für die automatische

Auswertung der Aufnahmen wurde die „*Harmony High Content Imaging and Analysis Software*“ von PerkinElmer zur Zellenbefunden, wurden zwölf identisch positionierte Felder ausgewählt und aufgenommen.

#### 5.2.4.7.4 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen

Für die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurde zunächst die Lokalisation der Zellen anhand der Hoechst-gefärbten Zellkerne mit dem Systembefehl „*Find Nuclei*“ durch die vordefinierte Methode A der Software durchgeführt. Anschließend wurde mit dem Befehl „*Find Cytoplasm*“ mit der Methode B der Software die Begrenzungen jeder Zelle in den Aufnahmen anhand der Signale für Alexa Fluor 488 definiert. Für die weiteren Auswertungen wurde ein um den Zellkern liegender, neun Pixel breiter Ring mit einem Abstand von einem Pixel Abstand zum Zellkern definiert. Dabei wurden die Grenzen der einzelnen Zellen, die durch Methode B festgelegt worden sind, gegebenenfalls berücksichtigt. Auch Zellen, die durch ihre Randlage in der Aufnahme nicht vollständig dargestellt worden sind, wurden nicht weiter für die Auswertung berücksichtigt.

Für die Auswertung wurden die Werte „Mittelwert Intensität Zellkern“ und „Mittelwert Intensität Cytoplasma Ring“ über alle vollständigen Zellen in den zwölf ausgewählten Feldern jedes Wells bestimmt. Der „Mittelwert Intensität Zellkern“ bezieht sich dabei auf die Intensität des gemessenen Alexa Fluor 488-Signals im Zellkern, der „Mittelwert Intensität Cytoplasma Ring“ auf die Intensität der Färbung mit Alexa Fluor 488 im zuvor definierten Ring. Der Mittelwert (MW) gibt dabei die durchschnittliche Pixelintensität und nicht den Mittelwert der Zellen an und ist daher flächenunabhängig. Zusätzlich wurde für jedes Well die Anzahl der vollständig abgebildeten Zellen in allen Feldern bestimmt.

Für die weitere Berechnung wurde die „relative nukleäre Fluoreszenz“ nach folgender Formel berechnet:

$$\text{relative nukleäre Fluoreszenz} = \frac{\text{MW Intensität Zellkern}}{\text{MW Intensität Zellkern} + \text{MW Intensität Cytoplasma Ring}}$$

Anschließend wurde für jede siRNA aus den Triplikaten der BSA-Kontrolle ein Mittelwert für die relative nukleäre Fluoreszenzintensitäten gebildet und dieser als Hintergrundwert von den relativen nukleären Fluoreszenzintensitäten der Wells der verschiedenen Stimulationsbedingungen der spezifischen siRNA subtrahiert. Da die mikroskopischen Aufnahmen nicht konfokal gemacht wurden, soll diese Berechnung dazu dienen, Störungen von dem den Kern umgebenen Cytoplasma zu minimieren. Von den so berechneten Fluoreszenzintensitäten wurden ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet. Der korrigierte Mittelwert wird im weiteren Verlauf als „Mittelwert des nukleären p65 Fluoreszenzsignals“ bezeichnet und dient als Maß für

die nukleäre Lokalisation von p65.

## 5.2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 5.2.5.1 SDS-Page

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden diskontinuierliche SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt (Laemmli, 1970). Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurden 8%-, 10%- oder 12%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die Proteinproben wurden mit der entsprechenden Menge an 2x- oder 5x-Probenpuffer (s.u.) versetzt; pelletierte Zellen wurden in 1xProbenpuffer resuspendiert. Danach wurden die Proteine bei 99 °C für fünf Minuten denaturiert und vor dem Auftragen bei 14.000 g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Gelelektrophoresen wurden in einem Höfer *Mighty Small*-Gelelektrophoresesystem bei 20 mA pro Gel und einer maximalen Spannung von 150 V mit Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1 % SDS) durchgeführt. Als Größenstandard wurde der Marker *Precision Plus Protein Standards All Blue* (BioRad) aufgetragen.

2xProbenpuffer: 125 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

5xProbenpuffer: 250 mM Tris pH 6,8, 10 % SDS; 30 % Glycerin, 1 Spatelspitze Bromphenolblau

### 5.2.5.2 Western Blot

Um spezifische Proteine aus Proteingemischen nachzuweisen, wurden die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine per Western Blot auf einer PVDF-Membran immobilisiert (Towbin et al., 1979) und dann durch eine Antikörperreaktion nachgewiesen. Die auf Größe des Trenngels zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde für eine Minuten in Methanol äquilibriert. Anschließend wurde die Membran in Blotting-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,01 % SDS, 20 % Methanol) äquilibriert. Zwei Whatmanfilter derselben Größe wurden kurz in Blotting-Puffer getaucht und auf der Anode eines Semidryblotters platziert. Darauf wurde die PVDF-Membran und dann vorsichtig das Trenngel gelegt. Als Abschluss wurden zwei weitere in Blotting-Puffer getauchte Whatmanfilter über das Gel geschichtet, ohne dieses zu verschieben. Dann wurde der Semidryblotter vorsichtig mit der Kathode geschlossen. Der Elektrotransfer wurde bei einer Stromstärke von 150 mA pro Gel in einem maximalen Semidryblotter von 15 V für eine PVDF-Membran durchgeföhrt. Nach dem Transfer wurde die Membran für 15 Minuten mit 5 % Magermilchpulver in TBST (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl,

0,1 % Tween 20) inkubiert, um unspezifische Bindestellen für die Antikörper zu sättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 5 % Magermilchpulver in TBST über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran fünfmal mit TBST gewaschen (1x kurz, 1x 5 Minuten, 3x 10 Minuten) und anschließend für zwei Stunden mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in TBST inkubiert. Danach wurde wieder fünfmal mit TBST gewaschen (1x kurz, 1x 5 Minuten, 3x 10 Minuten). Zur Detektion des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde das Bio-Rad Clarity Western ECL Substrat oder ECL von GE Healthcare verwendet. Die Detektion der Lichtemission erfolgte auf Röntgenfilm der Firma GE Healthcare oder durch das Gel Doc XR+ System von Bio-Rad.

#### 5.2.5.3 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationen wurden HEK293T-Zellen nach Transfektion mit den gewünschten Plasmiden verwendet. Das Medium der Zellen wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen in drei Arbeitsschritten mit jeweils 5 ml PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,5 mit NaOH eingestellt) durch Spülen vom Boden der Zellkulturschale gelöst und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (1.400 g, 5 Min, RT) wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das PBS entfernt und das Pellet in 650 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % (v/v) Nonident P40-Substitute, 10 % Glycerin, 1 mM DTT) mit Protease-Inhibitoren (1 mM PMSF, 1x Roche complete-Proteaseinhibitormix) resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten auf Eis lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (20.000 g, 20 Min, 4 °C) pelletiert. Der lösliche Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Davon wurden 50 µl als Inputprobe abgenommen, mit 2xProbenpuffer versetzt und hitzedenaturiert. 500 µl wurden mit dem entsprechenden immobilisierten Primärantikörper über Nacht rotierend bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Matrize pelletiert (1.400 g, 4 Min, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Die Matrizen wurden zweimal mit Lysepuffer (1x kurz, 1x 5 Minuten) mit Inhibitoren und einmal mit Lysepuffer ohne Inhibitoren gewaschen (5 Minuten). Anschließend erfolgte ein kurzer Waschschrift mit TBS (137 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2,6 mM KCl). Dann wurden die immunpräzipitierten Proteine in 30 µl 1xLadepuffer hitzedenaturiert und dadurch von der Matrize gelöst.

## 6 Literaturverzeichnis

Acharyya, S., Villalta, S.A., Bakkar, N., Bupha-Intr, T., Janssen, P.M., Carathers, M., Li, Z.W., Beg, A.A., Ghosh, S., Sahenk, Z., *et al.* (2007). Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest* 117, 889-901.

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., und Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.

Adams, J. (2003). The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 29 Suppl 1, 3-9.

Alberts, S.M., Sonntag, C., Schafer, A., und Wolf, D.H. (2009). Ubx4 modulates cdc48 activity and influences degradation of misfolded proteins of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 284, 16082-16089.

Alexandru, G., Graumann, J., Smith, G.T., Kolawa, N.J., Fang, R., und Deshaies, R.J. (2008). UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. *Cell* 134, 804-816.

Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Orian, A., Ciechanover, A., und Ben-Neriah, Y. (1995). Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10599-10603.

Allen, M.D., Buchberger, A., und Bycroft, M. (2006). The PUB domain functions as a p97 binding module in human peptide N-glycanase. *J Biol Chem* 281, 25502-25508.

Arenzana-Seisdedos, F., Fernandez, B., Dominguez, I., Jacque, J.M., Thomas, D., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., und Virelizier, J.L. (1993). Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *J Virol* 67, 6596-6604.

Arenzana-Seisdedos, F., Thompson, J., Rodriguez, M.S., Bachelier, F., Thomas, D., und Hay, R.T. (1995). Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 15, 2689-2696.

Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., und Dargemont, C. (1997). Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 110 ( Pt 3), 369-378.

Arvanitakis, L., Geras-Raaka, E., und Gershengorn, M.C. (1998). Constitutively signaling G-protein-coupled receptors and human disease. *Trends Endocrinol Metab* 9, 27-31.

Baeuerle, P.A., und Baltimore, D. (1988). Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* 53, 211-217.

Bakowska, J.C., Jupille, H., Fatheddin, P., Puertollano, R., und Blackstone, C. (2007). Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking. *Mol Biol Cell* 18, 1683-1692.

Ballar, P., Shen, Y., Yang, H., und Fang, S. (2006). The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 281, 35359-35368.

- Bandau, S., Knebel, A., Gage, Z.O., Wood, N.T., und Alexandru, G. (2012). UBXN7 docks on neddylated cullin complexes using its UIM motif and causes HIF1alpha accumulation. *BMC Biol* 10, 36.
- Beg, A.A., Ruben, S.M., Scheinman, R.I., Haskill, S., Rosen, C.A., und Baldwin, A.S., Jr. (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 6, 1899-1913.
- Behrends, C., und Harper, J.W. (2011). Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nat Struct Mol Biol* 18, 520-528.
- Berndsen, C.E., und Wolberger, C. (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 21, 301-307.
- Besse, A., Lamothe, B., Campos, A.D., Webster, W.K., Maddineni, U., Lin, S.C., Wu, H., und Darnay, B.G. (2007). TAK1-dependent signaling requires functional interaction with TAB2/TAB3. *J Biol Chem* 282, 3918-3928.
- Blenski (2014). Ein siRNA-basierter Screen zur Identifikation neuer Regulatoren des NF-kB-Signalweges. Master-Arbeit, Universität Würzburg.
- Boeddrich, A., Gaumer, S., Haacke, A., Tzvetkov, N., Albrecht, M., Evert, B.O., Muller, E.C., Lurz, R., Breuer, P., Schugardt, N., *et al.* (2006). An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis. *EMBO J* 25, 1547-1558.
- Bogan, J.S., Hendon, N., McKee, A.E., Tsao, T.S., und Lodish, H.F. (2003). Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature* 425, 727-733.
- Bohm, S., und Buchberger, A. (2013). The budding yeast Cdc48(Shp1) complex promotes cell cycle progression by positive regulation of protein phosphatase 1 (Glc7). *PLoS One* 8, e56486.
- Boisson, B., Laplantine, E., Prando, C., Giliani, S., Israelsson, E., Xu, Z., Abhyankar, A., Israel, L., Trevejo-Nunez, G., Bogunovic, D., *et al.* (2012). Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. *Nat Immunol* 13, 1178-1186.
- Bonizzi, G., und Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288.
- Boone, D.L., Turer, E.E., Lee, E.G., Ahmad, R.C., Wheeler, M.T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., *et al.* (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 5, 1052-1060.
- Bosanac, I., Wertz, I.E., Pan, B., Yu, C., Kusam, S., Lam, C., Phu, L., Phung, Q., Maurer, B., Arnott, D., *et al.* (2010). Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF-kappaB signaling. *Mol Cell* 40, 548-557.
- Brach, M.A., Hass, R., Sherman, M.L., Gunji, H., Weichselbaum, R., und Kufe, D. (1991). Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 88, 691-695.
- Brazil, M. (2006). Immunotherapy - TNFR superfamily trimers. *Nat Rev Drug Discov* 5, 20-20.
- Bruderer, R.M., Bresseur, C., und Meyer, H.H. (2004). The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *J Biol Chem* 279, 49609-49616.

- Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M., Dirac, A.M., und Bernards, R. (2003). Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 424, 797-801.
- Buchberger, A. (2002). From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol* 12, 216-221.
- Buchberger, A., Howard, M.J., Proctor, M., und Bycroft, M. (2001). The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. *J Mol Biol* 307, 17-24.
- Buchberger, A., Schindelin, H., und Hanzelmann, P. (2015). Control of p97 function by cofactor binding. *FEBS Lett* 589, 2578-2589.
- Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschoop, J., und Volpe, F. (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol* 2, 346-351.
- Carim-Todd, L., Escarceller, M., Estivill, X., und Sumoy, L. (2001). Identification and characterization of UBXD1, a novel UBX domain-containing gene on human chromosome 19p13, and its mouse ortholog. *Biochim Biophys Acta* 1517, 298-301.
- Chang, L., und Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., und Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.
- Chen, D., Li, X., Zhai, Z., und Shu, H.B. (2002). A novel zinc finger protein interacts with receptor-interacting protein (RIP) and inhibits tumor necrosis factor (TNF)- and IL1-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 277, 15985-15991.
- Chen, F.E., Huang, D.B., Chen, Y.Q., und Ghosh, G. (1998). Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* 391, 410-413.
- Chen, L.F., und Greene, W.C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 392-401.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., und Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9, 1586-1597.
- Chen, Z.J. (2012). Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol Rev* 246, 95-106.
- Cheng, C.S., Feldman, K.E., Lee, J., Verma, S., Huang, D.B., Huynh, K., Chang, M., Ponomarenko, J.V., Sun, S.C., Benedict, C.A., *et al.* (2011). The specificity of innate immune responses is enforced by repression of interferon response elements by NF-kappaB p50. *Sci Signal* 4, ra11.
- Chou, T.F., Brown, S.J., Minond, D., Nordin, B.E., Li, K., Jones, A.C., Chase, P., Porubsky, P.R., Stoltz, B.M., Schoenen, F.J., *et al.* (2011). Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4834-4839.
- Chu, K., Niu, X., und Williams, L.T. (1995). A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11894-11898.
- Clague, M.J., Coulson, J.M., und Urbe, S. (2012). Cellular functions of the DUBs. *J Cell Sci* 125, 277-286.

- Clister, T., Mehta, S., und Zhang, J. (2015). Single-cell analysis of G-protein signal transduction. *J Biol Chem* 290, 6681-6688.
- Dai, R.M., Chen, E., Longo, D.L., Gorbea, C.M., und Li, C.C. (1998). Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with I $\kappa$ B $\alpha$  and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Biol Chem* 273, 3562-3573.
- Dai, R.M., und Li, C.C. (2001). Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol* 3, 740-744.
- De, A., Dainichi, T., Rathinam, C.V., und Ghosh, S. (2014). The deubiquitinase activity of A20 is dispensable for NF- $\kappa$ B signaling. *EMBO Rep* 15, 775-783.
- De Zio, D., Ferraro, E., D'Amelio, M., Simoni, V., Bordi, M., Soroldoni, D., Berghella, L., Meyer, B.I., und Cecconi, F. (2008). Faf1 is expressed during neurodevelopment and is involved in Apaf1-dependent caspase-3 activation in proneural cells. *Cell Mol Life Sci* 65, 1780-1790.
- DeLaBarre, B., und Brunger, A.T. (2003). Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. *Nat Struct Biol* 10, 856-863.
- Deng, J., Xia, W., Miller, S.A., Wen, Y., Wang, H.Y., und Hung, M.C. (2004). Crossregulation of NF- $\kappa$ B by the APC/GSK-3 $\beta$ /beta-catenin pathway. *Mol Carcinog* 39, 139-146.
- Deshai, R.J. (2014). Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biol* 12, 94.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., und Liu, Z. (2000). The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12, 419-429.
- Dobrynin, G., Popp, O., Romer, T., Bremer, S., Schmitz, M.H., Gerlich, D.W., und Meyer, H. (2011). Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 antagonizes Aurora B during chromosome segregation in HeLa cells. *J Cell Sci* 124, 1571-1580.
- Doerks, T., Copley, R.R., Schultz, J., Ponting, C.P., und Bork, P. (2002). Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res* 12, 47-56.
- Draber, P., Kupka, S., Reichert, M., Draberova, H., Lafont, E., de Miguel, D., Spilgies, L., Surinova, S., Taraborrelli, L., Hartwig, T., *et al.* (2015). LUBAC-Recruited CYLD and A20 Regulate Gene Activation and Cell Death by Exerting Opposing Effects on Linear Ubiquitin in Signaling Complexes. *Cell Rep* 13, 2258-2272.
- Dreveny, I., Kondo, H., Uchiyama, K., Shaw, A., Zhang, X., und Freemont, P.S. (2004). Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *EMBO J* 23, 1030-1039.
- Du, Q., und Geller, D.A. (2010). Cross-Regulation Between Wnt and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *For Immunopathol Dis Therap* 1, 155-181.
- Ducut Sigala, J.L., Bottero, V., Young, D.B., Shevchenko, A., Mercurio, F., und Verma, I.M. (2004). Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B requires ELKS, an I $\kappa$ B kinase regulatory subunit. *Science* 304, 1963-1967.
- Dunne, A., und O'Neill, L.A. (2003). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003, re3.
- Dynek, J.N., Goncharov, T., Dueber, E.C., Fedorova, A.V., Izrael-Tomasevic, A., Phu, L., Helgason, E., Fairbrother, W.J., Deshayes, K., Kirkpatrick, D.S., *et al.* (2010). c-IAP1 and

Ubch5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *EMBO J* 29, 4198-4209.

Ea, C.K., Deng, L., Xia, Z.P., Pineda, G., und Chen, Z.J. (2006). Activation of IKK by TNF $\alpha$  requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22, 245-257.

Edwards, T.L., Clowes, V.E., Tsang, H.T., Connell, J.W., Sanderson, C.M., Luzio, J.P., und Reid, E. (2009). Endogenous spartin (SPG20) is recruited to endosomes and lipid droplets and interacts with the ubiquitin E3 ligases AIP4 and AIP5. *Biochem J* 423, 31-39.

Elliott, P.R., Nielsen, S.V., Marco-Casanova, P., Fiil, B.K., Keusekotten, K., Mailand, N., Freund, S.M., Gyrd-Hansen, M., und Komander, D. (2014). Molecular basis and regulation of OTULIN-LUBAC interaction. *Mol Cell* 54, 335-348.

Elmetwali, T., Young, L.S., und Palmer, D.H. (2014). Fas-associated factor (Faf1) is a novel CD40 interactor that regulates CD40-induced NF- $\kappa$ B activation via a negative feedback loop. *Cell Death Dis* 5, e1213.

Emmerich, C.H., Ordureau, A., Strickson, S., Arthur, J.S., Pedrioli, P.G., Komander, D., und Cohen, P. (2013). Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15247-15252.

Enders (2015). Charakterisierung der Interaktion zwischen UBXD1 und A20. Bachelor-Arbeit, Universität Würzburg.

Evans, P.C., Ovaa, H., Hamon, M., Kilshaw, P.J., Hamm, S., Bauer, S., Ploegh, H.L., und Smith, T.S. (2004). Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *Biochem J* 378, 727-734.

Ewens, C.A., Panico, S., Kloppsteck, P., McKeown, C., Ebong, I.O., Robinson, C., Zhang, X., und Freemont, P.S. (2014). The p97-FAF1 protein complex reveals a common mode of p97 adaptor binding. *J Biol Chem* 289, 12077-12084.

Fagerlund, R., Kinnunen, L., Kohler, M., Julkunen, I., und Melen, K. (2005). NF- $\kappa$ B is transported into the nucleus by importin  $\alpha$ 3 and importin  $\alpha$ 4. *J Biol Chem* 280, 15942-15951.

Fagerlund, R., Melen, K., Cao, X., und Julkunen, I. (2008). NF- $\kappa$ B p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin  $\alpha$  molecules. *Cell Signal* 20, 1442-1451.

Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., Feuring, M., und Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52, 513-556.

Fang, J., Rhyasen, G., Bolanos, L., Rasch, C., Varney, M., Wunderlich, M., Goyama, S., Jansen, G., Cloos, J., Rigolino, C., *et al.* (2012). Cytotoxic effects of bortezomib in myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia depend on autophagy-mediated lysosomal degradation of TRAF6 and repression of PSMA1. *Blood* 120, 858-867.

Feng, X., Gaeta, M.L., Madge, L.A., Yang, J.H., Bradley, J.R., und Pober, J.S. (2001). Caveolin-1 associates with TRAF2 to form a complex that is recruited to tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem* 276, 8341-8349.

Fiil, B.K., Damgaard, R.B., Wagner, S.A., Keusekotten, K., Fritsch, M., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Choudhary, C., Komander, D., und Gyrd-Hansen, M. (2013). OTULIN restricts Met1-linked ubiquitination to control innate immune signaling. *Mol Cell* 50, 818-830.

- Fu, X., Ng, C., Feng, D., und Liang, C. (2003). Cdc48p is required for the cell cycle commitment point at Start via degradation of the G1-CDK inhibitor Far1p. *J Cell Biol* 163, 21-26.
- Fujita, H., Rahighi, S., Akita, M., Kato, R., Sasaki, Y., Wakatsuki, S., und Iwai, K. (2014). Mechanism underlying I $\kappa$ B kinase activation mediated by the linear ubiquitin chain assembly complex. *Mol Cell Biol* 34, 1322-1335.
- Ganchi, P.A., Sun, S.C., Greene, W.C., und Ballard, D.W. (1992). I $\kappa$ B/MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF- $\kappa$ B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF- $\kappa$ B p65 DNA binding. *Mol Biol Cell* 3, 1339-1352.
- Gardam, S., und Brink, R. (2014). Non-Canonical NF- $\kappa$ B Signaling Initiated by BAFF Influences B Cell Biology at Multiple Junctions. *Front Immunol* 4, 509.
- Garg, A.V., Ahmed, M., Vallejo, A.N., Ma, A., und Gaffen, S.L. (2013). The deubiquitinase A20 mediates feedback inhibition of interleukin-17 receptor signaling. *Sci Signal* 6, ra44.
- Gerlach, B., Cordier, S.M., Schmukle, A.C., Emmerich, C.H., Rieser, E., Haas, T.L., Webb, A.I., Rickard, J.A., Anderton, H., Wong, W.W., *et al.* (2011). Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* 471, 591-596.
- Glinka, T., Alter, J., Braunstein, I., Tzach, L., Wei Sheng, C., Geifman, S., Edelman, M.J., Kessler, B.M., und Stanhill, A. (2014). Signal-peptide-mediated translocation is regulated by a p97-AIRAPL complex. *Biochem J* 457, 253-261.
- Gloekner, C.J., Boldt, K., Schumacher, A., und Ueffing, M. (2009). Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag. *Methods Mol Biol* 564, 359-372.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., und Piette, J. (2006). NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 72, 1493-1505.
- Grundstrom, S., Anderson, P., Scheipers, P., und Sundstedt, A. (2004). Bcl-3 and NF $\kappa$ B p50-p50 homodimers act as transcriptional repressors in tolerant CD4<sup>+</sup> T cells. *J Biol Chem* 279, 8460-8468.
- Haas, T.L., Emmerich, C.H., Gerlach, B., Schmukle, A.C., Cordier, S.M., Rieser, E., Feltham, R., Vince, J., Warnken, U., Wenger, T., *et al.* (2009). Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell* 36, 831-844.
- Habelhah, H., Frew, I.J., Laine, A., Janes, P.W., Relaix, F., Sassoon, D., Bowtell, D.D., und Ronai, Z. (2002). Stress-induced decrease in TRAF2 stability is mediated by Siah2. *EMBO J* 21, 5756-5765.
- Habtemichael, E.N., Alcazar-Roman, A., Rubin, B.R., Grossi, L.R., Belman, J.P., Julca, O., Loffler, M.G., Li, H., Chi, N.W., Samuel, V.T., *et al.* (2015). Coordinated Regulation of Vasopressin Inactivation and Glucose Uptake by Action of TUG Protein in Muscle. *J Biol Chem* 290, 14454-14461.
- Hadian, K., Griesbach, R.A., Dornauer, S., Wanger, T.M., Nagel, D., Metlitzky, M., Beisker, W., Schmidt-Supprian, M., und Krappmann, D. (2011). NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) interaction with linear and lys-63 ubiquitin chains contributes to NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 286, 26107-26117.
- Haines, D.S., Lee, J.E., Beauparlant, S.L., Kyle, D.B., den Besten, W., Sweredoski, M.J., Graham, R.L., Hess, S., und Deshaies, R.J. (2012). Protein interaction profiling of the p97 adaptor UBXD1 points to a role for the complex in modulating ERGIC-53 trafficking. *Mol Cell Proteomics* 11, M111 016444.

- Hanson, P.I., und Whiteheart, S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 519-529.
- Hanzelmann, P., Buchberger, A., und Schindelin, H. (2011). Hierarchical binding of cofactors to the AAA ATPase p97. *Structure* 19, 833-843.
- Harhaj, E.W., und Dixit, V.M. (2011). Deubiquitinases in the regulation of NF-kappaB signaling. *Cell Res* 21, 22-39.
- Hayden, M.S., und Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224.
- Hayden, M.S., und Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappa B signaling. *Cell* 132, 344-362.
- Hetzer, M., Meyer, H.H., Walther, T.C., Bilbao-Cortes, D., Warren, G., und Mattaj, I.W. (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* 3, 1086-1091.
- Heyninck, K., und Beyaert, R. (1999). The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF-kappaB activation at the level of TRAF6. *FEBS Lett* 442, 147-150.
- Heyninck, K., De Valck, D., Vanden Berghe, W., Van Criekeing, W., Contreras, R., Fiers, W., Haegeman, G., und Beyaert, R. (1999). The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-kappaB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NF-kappaB-inhibiting protein ABIN. *J Cell Biol* 145, 1471-1482.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Hinz, M., Stilmann, M., Arslan, S.C., Khanna, K.K., Dittmar, G., und Scheiderei, C. (2010). A cytoplasmic ATM-TRAF6-clAP1 module links nuclear DNA damage signaling to ubiquitin-mediated NF-kappaB activation. *Mol Cell* 40, 63-74.
- Hitt, R., und Wolf, D.H. (2004). Der1p, a protein required for degradation of malformed soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and Der1-like proteins. *FEMS Yeast Res* 4, 721-729.
- Hooper, C., Puttamadappa, S.S., Loring, Z., Shekhtman, A., und Bakowska, J.C. (2010). Spartins activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets. *BMC Biol* 8, 72.
- Hubbard, S.R., und Miller, W.T. (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19, 117-123.
- Hubener, J., Vauti, F., Funke, C., Wolburg, H., Ye, Y., Schmidt, T., Wolburg-Buchholz, K., Schmitt, I., Gardyan, A., Driessen, S., *et al.* (2011). N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation. *Brain* 134, 1925-1942.
- Huyton, T., Pye, V.E., Briggs, L.C., Flynn, T.C., Beuron, F., Kondo, H., Ma, J., Zhang, X., und Freemont, P.S. (2003). The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å. *J Struct Biol* 144, 337-348.
- Idriss, H.T., und Naismith, J.H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 50, 184-195.
- Ikai, N., und Yanagida, M. (2006). Cdc48 is required for the stability of Cut1/separase in mitotic anaphase. *J Struct Biol* 156, 50-61.

- Ikeda, F., Deribe, Y.L., Skanland, S.S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S.J., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., *et al.* (2011). SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis. *Nature* 471, 637-641.
- Isaacson, R.L., Pye, V.E., Simpson, P., Meyer, H.H., Zhang, X., Freemont, P.S., und Matthews, S. (2007). Detailed structural insights into the p97-Npl4-Ufd1 interface. *J Biol Chem* 282, 21361-21369.
- Iwai, K. (2012). Diverse ubiquitin signaling in NF-kappaB activation. *Trends Cell Biol* 22, 355-364.
- Iwai, K. (2014). Diverse roles of the ubiquitin system in NF-kappaB activation. *Biochim Biophys Acta* 1843, 129-136.
- Iwai, K., Fujita, H., und Sasaki, Y. (2014). Linear ubiquitin chains: NF-kappaB signalling, cell death and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 503-508.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., und Aravind, L. (2004). Novel predicted peptidases with a potential role in the ubiquitin signaling pathway. *Cell Cycle* 3, 1440-1450.
- Jaattela, M., Mouritzen, H., Elling, F., und Bastholm, L. (1996). A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. *J Immunol* 156, 1166-1173.
- James, P., Halladay, J., und Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Janssens, S., und Tschopp, J. (2006). Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ* 13, 773-784.
- Jentsch, S., und Rumpf, S. (2007). Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem Sci* 32, 6-11.
- Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W., und Goeddel, D.V. (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283, 543-546.
- Jin, H.S., Lee, D.H., Kim, D.H., Chung, J.H., Lee, S.J., und Lee, T.H. (2009). cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* 69, 1782-1791.
- Ju, J.S., Fuentealba, R.A., Miller, S.E., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., Baloh, R.H., und Weihl, C.C. (2009). Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol* 187, 875-888.
- Ju, J.S., Miller, S.E., Hanson, P.I., und Weihl, C.C. (2008). Impaired protein aggregate handling and clearance underlie the pathogenesis of p97/VCP-associated disease. *J Biol Chem* 283, 30289-30299.
- Kaazempur Mofrad, M.R., Abdul-Rahim, N.A., Karcher, H., Mack, P.J., Yap, B., und Kamm, R.D. (2005). Exploring the molecular basis for mechanosensation, signal transduction, and cytoskeletal remodeling. *Acta Biomater* 1, 281-293.
- Kanarek, N., und Ben-Neriah, Y. (2012). Regulation of NF-kappaB by ubiquitination and degradation of the IkappaBs. *Immunol Rev* 246, 77-94.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.H., Deng, L., und Chen, Z.J. (2004). TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* 15, 535-548.

- Kanayama, M., Inoue, M., Danzaki, K., Hammer, G., He, Y.W., und Shinohara, M.L. (2015). Autophagy enhances NF $\kappa$ B activity in specific tissue macrophages by sequestering A20 to boost antifungal immunity. *Nat Commun* 6, 5779.
- Kaneko, Y., Tamura, K., Totsukawa, G., und Kondo, H. (2010). Phosphorylation of p37 is important for Golgi disassembly at mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 37-41.
- Karin, M., und Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[ $\kappa$ ]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.
- Kehler (2012). Einfluss des p97-Kofaktors UBXD1 auf den NF-kB-Signalweg. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Kern (2008). Structural and Functional Characterization of the p97 Cofactor UBXD1. Master-Arbeit, Technische Universität München.
- Kern, M., Fernandez-Saiz, V., Schafer, Z., und Buchberger, A. (2009). UBXD1 binds p97 through two independent binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 303-307.
- Keusekotten, K., Elliott, P.R., Glockner, L., Fiil, B.K., Damgaard, R.B., Kulathu, Y., Wauer, T., Hospenthal, M.K., Gyrd-Hansen, M., Krappmann, D., *et al.* (2013). OTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing Met1-linked polyubiquitin. *Cell* 153, 1312-1326.
- Kim, H., Zhang, H., Meng, D., Russell, G., Lee, J.N., und Ye, J. (2013a). UAS domain of Ubxd8 and FAF1 polymerizes upon interaction with long-chain unsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 54, 2144-2152.
- Kim, N.C., Tresse, E., Kolaitis, R.M., Molliex, A., Thomas, R.E., Alami, N.H., Wang, B., Joshi, A., Smith, R.B., Ritson, G.P., *et al.* (2013b). VCP is essential for mitochondrial quality control by PINK1/Parkin and this function is impaired by VCP mutations. *Neuron* 78, 65-80.
- Kirchner, P., Bug, M., und Meyer, H. (2013). Ubiquitination of the N-terminal region of caveolin-1 regulates endosomal sorting by the VCP/p97 AAA-ATPase. *J Biol Chem* 288, 7363-7372.
- Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., Sano, S., Tokunaga, F., Tanaka, K., und Iwai, K. (2006). A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J* 25, 4877-4887.
- Klinkenberg, M., Van Huffel, S., Heyninck, K., und Beyaert, R. (2001). Functional redundancy of the zinc fingers of A20 for inhibition of NF-kappaB activation and protein-protein interactions. *FEBS Lett* 498, 93-97.
- Knop, J., und Martin, M.U. (1999). Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity. *FEBS Lett* 448, 81-85.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., und Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Komander, D., und Barford, D. (2008). Structure of the A20 OTU domain and mechanistic insights into deubiquitination. *Biochem J* 409, 77-85.
- Kondo, H., Rabouille, C., Newman, R., Levine, T.P., Pappin, D., Freemont, P., und Warren, G. (1997). p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* 388, 75-78.
- Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D., und Courtois, G. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424, 801-805.

- Kreft, S.G., und Nassal, M. (2003). hRUL138, a novel human RNA-binding RING-H2 ubiquitin-protein ligase. *J Cell Sci* 116, 605-616.
- Krick, R., Bremer, S., Welter, E., Schlotterhose, P., Muehe, Y., Eskelinen, E.L., und Thumm, M. (2010). Cdc48/p97 and Shp1/p47 regulate autophagosome biogenesis in concert with ubiquitin-like Atg8. *J Cell Biol* 190, 965-973.
- Kuhlbrott, K., Janiesch, P.C., Kevei, E., Segref, A., Barikbin, R., und Hoppe, T. (2011). The Machado-Joseph disease deubiquitylase ATX-3 couples longevity and proteostasis. *Nat Cell Biol* 13, 273-281.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LaLonde, D.P., und Bretscher, A. (2011). The UBX protein SAKS1 negatively regulates endoplasmic reticulum-associated degradation and p97-dependent degradation. *J Biol Chem* 286, 4892-4901.
- Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R., und Israel, A. (1993). Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *EMBO J* 12, 5043-5049.
- Lee, E.G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S.L., Chien, M., Lodolce, J.P., und Ma, A. (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 289, 2350-2354.
- Lee, J.H., und Paull, T.T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7741-7748.
- Lee, J.J., Park, J.K., Jeong, J., Jeon, H., Yoon, J.B., Kim, E.E., und Lee, K.J. (2013). Complex of Fas-associated factor 1 (FAF1) with valosin-containing protein (VCP)-Npl4-Ufd1 and polyubiquitinated proteins promotes endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). *J Biol Chem* 288, 6998-7011.
- Lemmon, M.A., und Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117-1134.
- Li, J.M., Wu, H., Zhang, W., Blackburn, M.R., und Jin, J. (2014). The p97-UFD1L-NPL4 protein complex mediates cytokine-induced I kappa Balpha proteolysis. *Mol Cell Biol* 34, 335-347.
- Li, L., Hailey, D.W., Soetandyo, N., Li, W., Lippincott-Schwartz, J., Shu, H.B., und Ye, Y. (2008a). Localization of A20 to a lysosome-associated compartment and its role in NFkappaB signaling. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1140-1149.
- Li, L., Soetandyo, N., Wang, Q., und Ye, Y. (2009). The zinc finger protein A20 targets TRAF2 to the lysosomes for degradation. *Biochim Biophys Acta* 1793, 346-353.
- Li, S., Strelow, A., Fontana, E.J., und Wesche, H. (2002a). IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5567-5572.
- Li, W., Bengtson, M.H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V.A., Orth, A., Chanda, S.K., Batalov, S., und Joazeiro, C.A. (2008b). Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 3, e1487.
- Li, X., Yang, Y., und Ashwell, J.D. (2002b). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.

- Liang, J., Yin, C., Doong, H., Fang, S., Peterhoff, C., Nixon, R.A., und Monteiro, M.J. (2006). Characterization of erasin (UBXD2): a new ER protein that promotes ER-associated protein degradation. *J Cell Sci* 119, 4011-4024.
- Liang, P., Zhang, H., Wang, G., Li, S., Cong, S., Luo, Y., und Zhang, B. (2013). KPNB1, XPO7 and IPO8 mediate the translocation of NF-kappaB/p65 into the nucleus. *Traffic* 14, 1132-1143.
- Lim, P.J., Danner, R., Liang, J., Doong, H., Harman, C., Srinivasan, D., Rothenberg, C., Wang, H., Ye, Y., Fang, S., *et al.* (2009). Ubiquitin and p97/VCP bind erasin, forming a complex involved in ERAD. *J Cell Biol* 187, 201-217.
- Lin, S.C., Chung, J.Y., Lamothe, B., Rajashankar, K., Lu, M., Lo, Y.C., Lam, A.Y., Darnay, B.G., und Wu, H. (2008). Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20. *J Mol Biol* 376, 526-540.
- Lippens, S., Lefebvre, S., Gilbert, B., Sze, M., Devos, M., Verhelst, K., Vereecke, L., McGuire, C., Guerin, C., Vandenaabeele, P., *et al.* (2011). Keratinocyte-specific ablation of the NF-kappaB regulatory protein A20 (TNFAIP3) reveals a role in the control of epidermal homeostasis. *Cell Death Differ* 18, 1845-1853.
- Liu, H., Dai, L., Hao, Z., Huang, W., und Yang, Q. (2012). Hydrophobic cavity in C-terminus is essential for hTNF-alpha trimer conformation. *Biochimie* 94, 1001-1008.
- Livingstone, M., Ruan, H., Weiner, J., Clauser, K.R., Strack, P., Jin, S., Williams, A., Greulich, H., Gardner, J., Venere, M., *et al.* (2005). Valosin-containing protein phosphorylation at Ser784 in response to DNA damage. *Cancer Res* 65, 7533-7540.
- Loiarro, M., Gallo, G., Fanto, N., De Santis, R., Carminati, P., Ruggiero, V., und Sette, C. (2009). Identification of critical residues of the MyD88 death domain involved in the recruitment of downstream kinases. *J Biol Chem* 284, 28093-28103.
- Lu, M., Lin, S.C., Huang, Y., Kang, Y.J., Rich, R., Lo, Y.C., Myszka, D., Han, J., und Wu, H. (2007). XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell* 26, 689-702.
- Lupas, A.N., und Martin, J. (2002). AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* 12, 746-753.
- Ma, B., Fey, M., und Hottiger, M.O. (2015). WNT/beta-catenin signaling inhibits CBP-mediated RelA acetylation and expression of proinflammatory NF-kappaB target genes. *J Cell Sci* 128, 2430-2436.
- Mabb, A.M., Wuerzberger-Davis, S.M., und Miyamoto, S. (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 8, 986-993.
- Madsen, L., Andersen, K.M., Prag, S., Moos, T., Semple, C.A., Seeger, M., und Hartmann-Petersen, R. (2008). Ubx1 is a novel co-factor of the human p97 ATPase. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2927-2942.
- Madsen, L., Molbaek, K., Larsen, I.B., Nielsen, S.V., Poulsen, E.G., Walmod, P.S., Hofmann, K., Seeger, M., Chien, C.Y., Chen, R.H., *et al.* (2014). Human ASPL/TUG interacts with p97 and complements the proteasome mislocalization of a yeast ubx4 mutant, but not the ER-associated degradation defect. *BMC Cell Biol* 15, 31.
- Magnaghi, P., D'Alessio, R., Valsasina, B., Avanzi, N., Rizzi, S., Asa, D., Gasparri, F., Cozzi, L., Cucchi, U., Orrenius, C., *et al.* (2013). Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat Chem Biol* 9, 548-556.

- Malek, S., Huxford, T., und Ghosh, G. (1998). Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-kappaB. *J Biol Chem* *273*, 25427-25435.
- Maric, M., Maculins, T., De Piccoli, G., und Labib, K. (2014). Cdc48 and a ubiquitin ligase drive disassembly of the CMG helicase at the end of DNA replication. *Science* *346*, 1253596.
- Mauro, C., Pacifico, F., Lavorgna, A., Mellone, S., Iannetti, A., Acquaviva, R., Formisano, S., Vito, P., und Leonardi, A. (2006). ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. *J Biol Chem* *281*, 18482-18488.
- McCool, K.W., und Miyamoto, S. (2012). DNA damage-dependent NF-kappaB activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol Rev* *246*, 311-326.
- McGouran, J.F., Gaertner, S.R., Altun, M., Kramer, H.B., und Kessler, B.M. (2013). Deubiquitinating enzyme specificity for ubiquitin chain topology profiled by di-ubiquitin activity probes. *Chem Biol* *20*, 1447-1455.
- Meerang, M., Ritz, D., Paliwal, S., Garajova, Z., Bosshard, M., Mailand, N., Janscak, P., Hubscher, U., Meyer, H., und Ramadan, K. (2011). The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* *13*, 1376-1382.
- Mevissen, T.E., Hospenthal, M.K., Geurink, P.P., Elliott, P.R., Akutsu, M., Arnaudo, N., Ekkebus, R., Kulathu, Y., Wauer, T., El Oualid, F., *et al.* (2013). OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis. *Cell* *154*, 169-184.
- Meyer, H., Bug, M., und Bremer, S. (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol* *14*, 117-123.
- Meyer, H.H., Shorter, J.G., Seemann, J., Pappin, D., und Warren, G. (2000). A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J* *19*, 2181-2192.
- Miah, S.M., Purdy, A.K., Rodin, N.B., MacFarlane, A.W.t., Oshinsky, J., Alvarez-Arias, D.A., und Campbell, K.S. (2011). Ubiquitylation of an internalized killer cell Ig-like receptor by Triad3A disrupts sustained NF-kappaB signaling. *J Immunol* *186*, 2959-2969.
- Mikoshiba, K. (2007). IP3 receptor/Ca2+ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* *102*, 1426-1446.
- Mirshafiey, A., Ghalamfarsa, G., Asghari, B., und Azizi, G. (2014). Receptor Tyrosine Kinase and Tyrosine Kinase Inhibitors: New Hope for Success in Multiple Sclerosis Therapy. *Innov Clin Neurosci* *11*, 23-36.
- Moir, D., Stewart, S.E., Osmond, B.C., und Botstein, D. (1982). Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* *100*, 547-563.
- Moreno, S.P., Bailey, R., Campion, N., Herron, S., und Gambus, A. (2014). Polyubiquitylation drives replisome disassembly at the termination of DNA replication. *Science* *346*, 477-481.
- Morgan, M.J., und Liu, Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* *21*, 103-115.
- Morreale, G., Conforti, L., Coadwell, J., Wilbrey, A.L., und Coleman, M.P. (2009). Evolutionary divergence of valosin-containing protein/cell division cycle protein 48 binding interactions among endoplasmic reticulum-associated degradation proteins. *FEBS J* *276*, 1208-1220.

- Nagahama, M., Ohnishi, M., Kawate, Y., Matsui, T., Miyake, H., Yuasa, K., Tani, K., Tagaya, M., und Tsuji, A. (2009). UBXD1 is a VCP-interacting protein that is involved in ER-associated degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 303-308.
- Nakhaei, P., Mesplede, T., Solis, M., Sun, Q., Zhao, T., Yang, L., Chuang, T.H., Ware, C.F., Lin, R., und Hiscott, J. (2009). The E3 ubiquitin ligase Triad3A negatively regulates the RIG-I/MAVS signaling pathway by targeting TRAF3 for degradation. *PLoS Pathog* 5, e1000650.
- Natoli, G., Costanzo, A., Guido, F., Moretti, F., Bernardo, A., Burgio, V.L., Agresti, C., und Levvero, M. (1998). Nuclear factor  $\kappa$ B-independent cytoprotective pathways originating at tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J Biol Chem* 273, 31262-31272.
- Neuber, O., Jarosch, E., Volkwein, C., Walter, J., und Sommer, T. (2005). Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7, 993-998.
- Newton, K., Matsumoto, M.L., Wertz, I.E., Kirkpatrick, D.S., Lill, J.R., Tan, J., Dugger, D., Gordon, N., Sidhu, S.S., Fellouse, F.A., *et al.* (2008). Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* 134, 668-678.
- Niwa, H., Ewens, C.A., Tsang, C., Yeung, H.O., Zhang, X., und Freemont, P.S. (2012). The role of the N-domain in the ATPase activity of the mammalian AAA ATPase p97/VCP. *J Biol Chem* 287, 8561-8570.
- O'Dea, E., und Hoffmann, A. (2010). The regulatory logic of the NF- $\kappa$ B signaling system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000216.
- Oeckinghaus, A., und Ghosh, S. (2009). The NF- $\kappa$ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000034.
- Offermanns, S. (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83, 101-130.
- Olzmann, J.A., Richter, C.M., und Kopito, R.R. (2013). Spatial regulation of UBXD8 and p97/VCP controls ATGL-mediated lipid droplet turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1345-1350.
- Opipari, A.W., Jr., Boguski, M.S., und Dixit, V.M. (1990). The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 265, 14705-14708.
- Orme, C.M., und Bogan, J.S. (2012). The ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein TUG regulates the p97 ATPase and resides at the endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment. *J Biol Chem* 287, 6679-6692.
- Ossareh-Nazari, B., Bonizec, M., Cohen, M., Dokudovskaya, S., Delalande, F., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., und Dargemont, C. (2010). Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy. *EMBO Rep* 11, 548-554.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., und Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell* 78, 773-785.
- Panta, G.R., Kaur, S., Cavin, L.G., Cortes, M.L., Mercurio, F., Lothstein, L., Sweatman, T.W., Israel, M., und Arsura, M. (2004). ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF- $\kappa$ B through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol* 24, 1823-1835.
- Panyi, G., Beeton, C., und Felipe, A. (2014). Ion channels and anti-cancer immunity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130106.

- Park, H., Suzuki, T., und Lennarz, W.J. (2001). Identification of proteins that interact with mammalian peptide:N-glycanase and implicate this hydrolase in the proteasome-dependent pathway for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11163-11168.
- Park, M.Y., Jang, H.D., Lee, S.Y., Lee, K.J., und Kim, E. (2004). Fas-associated factor-1 inhibits nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activity by interfering with nuclear translocation of the RelA (p65) subunit of NF-kappaB. *J Biol Chem* 279, 2544-2549.
- Park, M.Y., Moon, J.H., Lee, K.S., Choi, H.I., Chung, J., Hong, H.J., und Kim, E. (2007). FAF1 suppresses I kappa B kinase (IKK) activation by disrupting the IKK complex assembly. *J Biol Chem* 282, 27572-27577.
- Peters, J.M., Walsh, M.J., und Franke, W.W. (1990). An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *EMBO J* 9, 1757-1767.
- Petri, S., und Meister, G. (2013). siRNA design principles and off-target effects. *Methods Mol Biol* 986, 59-71.
- Pickart, C.M., und Cohen, R.E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 177-187.
- Pleasure, I.T., Black, M.M., und Keen, J.H. (1993). Valosin-containing protein, VCP, is a ubiquitous clathrin-binding protein. *Nature* 365, 459-462.
- Puimalainen, M.R., Lessel, D., Ruthemann, P., Kaczmarek, N., Bachmann, K., Ramadan, K., und Naegeli, H. (2014). Chromatin retention of DNA damage sensors DDB2 and XPC through loss of p97 segregase causes genotoxicity. *Nat Commun* 5, 3695.
- Pye, V.E., Beuron, F., Keetch, C.A., McKeown, C., Robinson, C.V., Meyer, H.H., Zhang, X., und Freemont, P.S. (2007). Structural insights into the p97-Ufd1-Npl4 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 467-472.
- Qian, Y., Commane, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., und Li, X. (2001). IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J Biol Chem* 276, 41661-41667.
- Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K.U., Diamant, N., und Bar-Nun, S. (2002). AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Cell Biol* 22, 626-634.
- Ramadan, K., Bruderer, R., Spiga, F.M., Popp, O., Baur, T., Gotta, M., und Meyer, H.H. (2007). Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature* 450, 1258-1262.
- Raman, M., Havens, C.G., Walter, J.C., und Harper, J.W. (2011). A genome-wide screen identifies p97 as an essential regulator of DNA damage-dependent CDT1 destruction. *Mol Cell* 44, 72-84.
- Raman, M., Sergeev, M., Garnaas, M., Lydeard, J.R., Huttlin, E.L., Goessling, W., Shah, J.V., und Harper, J.W. (2015). Systematic proteomics of the VCP-UBXD adaptor network identifies a role for UBXN10 in regulating ciliogenesis. *Nat Cell Biol* 17, 1356-1369.
- Ramanathan, H.N., und Ye, Y. (2012). The p97 ATPase associates with EEA1 to regulate the size of early endosomes. *Cell Res* 22, 346-359.
- Rancour, D.M., Park, S., Knight, S.D., und Bednarek, S.Y. (2004). Plant UBX domain-containing protein 1, PUX1, regulates the oligomeric structure and activity of arabidopsis CDC48. *J Biol Chem* 279, 54264-54274.

- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., und Jentsch, S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667-677.
- Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E., und Sun, S.C. (2005). Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I $\kappa$ B kinase gamma-dependent phosphorylation. *Mol Cell Biol* 25, 3886-3895.
- Reim, G., Hruzova, M., Goetze, S., und Basler, K. (2014). Protection of armadillo/beta-Catenin by armless, a novel positive regulator of wingless signaling. *PLoS Biol* 12, e1001988.
- Rezvani, K., Teng, Y., Pan, Y., Dani, J.A., Lindstrom, J., Garcia Gras, E.A., McIntosh, J.M., und De Biasi, M. (2009). UBXD4, a UBX-containing protein, regulates the cell surface number and stability of alpha3-containing nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 29, 6883-6896.
- Riemer, A., Dobrynin, G., Dressler, A., Bremer, S., Soni, A., Iliakis, G., und Meyer, H. (2014). The p97-Ufd1-Npl4 ATPase complex ensures robustness of the G2/M checkpoint by facilitating CDC25A degradation. *Cell Cycle* 13, 919-927.
- Ritz, D., Vuk, M., Kirchner, P., Bug, M., Schutz, S., Hayer, A., Bremer, S., Lusk, C., Baloh, R.H., Lee, H., *et al.* (2011). Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. *Nat Cell Biol* 13, 1116-1123.
- Rivkin, E., Almeida, S.M., Ceccarelli, D.F., Juang, Y.C., MacLean, T.A., Srikumar, T., Huang, H., Dunham, W.H., Fukumura, R., Xie, G., *et al.* (2013). The linear ubiquitin-specific deubiquitinase gumby regulates angiogenesis. *Nature* 498, 318-324.
- Rodriguez, M.S., Thompson, J., Hay, R.T., und Dargemont, C. (1999). Nuclear retention of I $\kappa$ B $\alpha$  protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 274, 9108-9115.
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., und Goeddel, D.V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.
- Rumpf, S., und Jentsch, S. (2006). Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell* 21, 261-269.
- Saccani, S., Pantano, S., und Natoli, G. (2001). Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters. *J Exp Med* 193, 1351-1359.
- Sasaki, Y., Sano, S., Nakahara, M., Murata, S., Kometani, K., Aiba, Y., Sakamoto, S., Watanabe, Y., Tanaka, K., Kurosaki, T., *et al.* (2013). Defective immune responses in mice lacking LUBAC-mediated linear ubiquitination in B cells. *EMBO J* 32, 2463-2476.
- Sato, B.K., und Hampton, R.Y. (2006). Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis. *Yeast* 23, 1053-1064.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., und Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 1087-1095.
- Sato, Y., Goto, E., Shibata, Y., Kubota, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., Inoue, J., Takekawa, M., Tokunaga, F., *et al.* (2015). Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. *Nat Struct Mol Biol* 22, 222-229.
- Schaeffer, V., Akutsu, M., Olma, M.H., Gomes, L.C., Kawasaki, M., und Dikic, I. (2014). Binding of OTULIN to the PUB domain of HOIP controls NF-kappaB signaling. *Mol Cell* 54, 349-361.

- Schäfer (2007). Wechselwirkung von humanen PUB-Domänenproteinen mit der Ubiquitin-selektiven AAA-ATPase p97. Diplomarbeit, Universität Potsdam.
- Scherer, D.C., Brockman, J.A., Chen, Z., Maniatis, T., und Ballard, D.W. (1995). Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11259-11263.
- Schmid, J.A., und Birbach, A. (2008). IkappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKBKB)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 157-165.
- Schmitz, M.L., und Baeuerle, P.A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J* 10, 3805-3817.
- Schuberth, C., und Buchberger, A. (2005). Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7, 999-1006.
- Schuberth, C., und Buchberger, A. (2008). UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci* 65, 2360-2371.
- Schulman, B.A., und Harper, J.W. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 319-331.
- Schweitzer, K., Pralow, A., und Naumann, M. (2015). p97/VCP promotes Cullin-RING-ubiquitin-ligase/proteasome-dependent degradation of IkappaBalpha and the preceding liberation of RelA from ubiquitinated IkappaBalpha. *J Cell Mol Med*.
- Shembade, N., Parvatiyar, K., Harhaj, N.S., und Harhaj, E.W. (2009). The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF-kappaB signalling. *EMBO J* 28, 513-522.
- Shibata, Y., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Han, X., Tanaka, Y., Gohda, J., und Inoue, J. (2012). p47 negatively regulates IKK activation by inducing the lysosomal degradation of polyubiquitinated NEMO. *Nat Commun* 3, 1061.
- Sieber, S., Lange, N., Kollmorgen, G., Erhardt, A., Quaas, A., Gontarewicz, A., Sass, G., Tiegs, G., und Kreienkamp, H.J. (2012). Sharpin contributes to TNFalpha dependent NFkappaB activation and anti-apoptotic signalling in hepatocytes. *PLoS One* 7, e29993.
- Skaug, B., Chen, J., Du, F., He, J., Ma, A., und Chen, Z.J. (2011). Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. *Mol Cell* 44, 559-571.
- Skaug, B., Jiang, X., und Chen, Z.J. (2009). The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 78, 769-796.
- Song, C., Wang, Q., und Li, C.C. (2007). Characterization of the aggregation-prevention activity of p97/valosin-containing protein. *Biochemistry* 46, 14889-14898.
- Song, H.Y., Rothe, M., und Goeddel, D.V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6721-6725.
- Stapf, C., Cartwright, E., Bycroft, M., Hofmann, K., und Buchberger, A. (2011). The general definition of the p97/valosin-containing protein (VCP)-interacting motif (VIM) delineates a new family of p97 cofactors. *J Biol Chem* 286, 38670-38678.
- Starokadomskyy, P., und Burstein, E. (2015). Detection of IkappaB degradation dynamics and IkappaB-alpha ubiquitination. *Methods Mol Biol* 1280, 15-24.

- Staudt, L.M. (2010). Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000109.
- Stilmann, M., Hinz, M., Arslan, S.C., Zimmer, A., Schreiber, V., und Scheidereit, C. (2009). A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced I kappa B kinase activation. *Mol Cell* 36, 365-378.
- Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A., und Wolf, D.H. (2011). Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends Biochem Sci* 36, 515-523.
- Storz, P., Doppler, H., und Toker, A. (2004). Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol* 24, 2614-2626.
- Storz, P., und Toker, A. (2003). Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J* 22, 109-120.
- Suzuki, M., Otsuka, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Taniguchi, T., Hashimoto, H., Taniguchi, H., und Fujimoto, T. (2012). Derlin-1 and UBXD8 are engaged in dislocation and degradation of lipidated ApoB-100 at lipid droplets. *Mol Biol Cell* 23, 800-810.
- Suzuki, T., Park, H., Till, E.A., und Lennarz, W.J. (2001). The PUB domain: a putative protein-protein interaction domain implicated in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 1083-1087.
- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobayashi, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T.W., Yagita, H., Okumura, K., *et al.* (2001). Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *J Biol Chem* 276, 36530-36534.
- Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., und Matsumoto, K. (2000). TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell* 5, 649-658.
- Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Kishida, S., Li, X., Stark, G.R., und Matsumoto, K. (2001). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 21, 2475-2484.
- Takiuchi, T., Nakagawa, T., Tamiya, H., Fujita, H., Sasaki, Y., Saeki, Y., Takeda, H., Sawasaki, T., Buchberger, A., Kimura, T., *et al.* (2014). Suppression of LUBAC-mediated linear ubiquitination by a specific interaction between LUBAC and the deubiquitinases CYLD and OTULIN. *Genes Cells* 19, 254-272.
- Tang, W.K., und Xia, D. (2012). Structural and functional deviations in disease-associated p97 mutants. *J Struct Biol* 179, 83-92.
- Thoms, S. (2002). Cdc48 can distinguish between native and non-native proteins in the absence of cofactors. *FEBS Lett* 520, 107-110.
- Tian, B., Nowak, D.E., und Brasier, A.R. (2005). A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-kappaB control. *BMC Genomics* 6, 137.
- Ting, A.T., Pimentel-Muinos, F.X., und Seed, B. (1996). RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J* 15, 6189-6196.
- Tokunaga, F., Nishimasu, H., Ishitani, R., Goto, E., Noguchi, T., Mio, K., Kamei, K., Ma, A., Iwai, K., und Nureki, O. (2012). Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF-kappaB regulation. *EMBO J* 31, 3856-3870.

- Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., Nakagawa, T., Kato, M., Murata, S., Yamaoka, S., *et al.* (2009). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol* *11*, 123-132.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4350-4354.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A., und Mosialos, G. (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* *424*, 793-796.
- Trusch, F., Matena, A., Vuk, M., Koerver, L., Knaevelsrud, H., Freemont, P.S., Meyer, H., und Bayer, P. (2015). The N-terminal Region of the UBX Domain-containing Protein 1 (UBXD1) Modulates Interdomain Communication within the Valosin-containing Protein p97. *J Biol Chem*.
- Uchiyama, K., Jokitalo, E., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., Canas, B., Newman, R., Rabouille, C., Pappin, D., Freemont, P., *et al.* (2002). VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J Cell Biol* *159*, 855-866.
- Uchiyama, K., und Kondo, H. (2005). p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER. *J Biochem* *137*, 115-119.
- Uchiyama, K., Totsukawa, G., Puhka, M., Kaneko, Y., Jokitalo, E., Dreveny, I., Beuron, F., Zhang, X., Freemont, P., und Kondo, H. (2006). p37 is a p97 adaptor required for Golgi and ER biogenesis in interphase and at the end of mitosis. *Dev Cell* *11*, 803-816.
- Verhelst, K., Carpentier, I., Kreike, M., Meloni, L., Verstrepen, L., Kensche, T., Dikic, I., und Beyaert, R. (2012). A20 inhibits LUBAC-mediated NF-kappaB activation by binding linear polyubiquitin chains via its zinc finger 7. *EMBO J* *31*, 3845-3855.
- Verma, R., Oania, R., Fang, R., Smith, G.T., und Deshaies, R.J. (2011). Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II. *Mol Cell* *41*, 82-92.
- Vert, G., und Chory, J. (2011). Crosstalk in cellular signaling: background noise or the real thing? *Dev Cell* *21*, 985-991.
- Vittal, V., Stewart, M.D., Brzovic, P.S., und Klevit, R.E. (2015). Regulating the Regulators: Recent Revelations in the Control of E3 Ubiquitin Ligases. *J Biol Chem* *290*, 21244-21251.
- Wajant, H., und Scheurich, P. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol* *33*, 19-32.
- Wan, F., und Lenardo, M.J. (2009). Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a000067.
- Wang, C.W., und Lee, S.C. (2012). The ubiquitin-like (UBX)-domain-containing protein Ubx2/Ubx2d8 regulates lipid droplet homeostasis. *J Cell Sci* *125*, 2930-2939.
- Wang, Q., Li, L., und Ye, Y. (2006). Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *J Cell Biol* *174*, 963-971.
- Wang, Q., Song, C., und Li, C.C. (2004). Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J Struct Biol* *146*, 44-57.
- Wang, Y.B., Tan, B., Mu, R., Chang, Y., Wu, M., Tu, H.Q., Zhang, Y.C., Guo, S.S., Qin, X.H., Li, T., *et al.* (2015). Ubiquitin-associated domain-containing ubiquitin regulatory X (UBX)

protein UBXN1 is a negative regulator of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signaling. *J Biol Chem* 290, 10395-10405.

Wertz, I.E., und Dixit, V.M. (2010). Signaling to NF-kappaB: regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003350.

Wertz, I.E., Newton, K., Seshasayee, D., Kusam, S., Lam, C., Zhang, J., Popovych, N., Helgason, E., Schoeffler, A., Jeet, S., *et al.* (2015). Phosphorylation and linear ubiquitin direct A20 inhibition of inflammation. *Nature* 528, 370-375.

Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., *et al.* (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 430, 694-699.

Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S., und Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-847.

Winborn, B.J., Travis, S.M., Todi, S.V., Scaglione, K.M., Xu, P., Williams, A.J., Cohen, R.E., Peng, J., und Paulson, H.L. (2008). The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem* 283, 26436-26443.

Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M., und Ashwell, J.D. (2006a). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol* 8, 398-406.

Wu, Z.H., Shi, Y., Tibbetts, R.S., und Miyamoto, S. (2006b). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 311, 1141-1146.

Wu, Z.H., Wong, E.T., Shi, Y., Niu, J., Chen, Z., Miyamoto, S., und Tergaonkar, V. (2010). ATM- and NEMO-dependent ELKS ubiquitination coordinates TAK1-mediated IKK activation in response to genotoxic stress. *Mol Cell* 40, 75-86.

Xia, Z.P., Sun, L.J., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X.M., Adhikari, A., Zeng, W.W., und Chen, Z.J. (2009). Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 461, 114-U125.

Xiao, G., Harhaj, E.W., und Sun, S.C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 7, 401-409.

Xiu, Y., Xu, H., Zhao, C., Li, J., Morita, Y., Yao, Z., Xing, L., und Boyce, B.F. (2014). Chloroquine reduces osteoclastogenesis in murine osteoporosis by preventing TRAF3 degradation. *J Clin Invest* 124, 297-310.

Xu, M., Skaug, B., Zeng, W., und Chen, Z.J. (2009). A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNFalpha and IL-1beta. *Mol Cell* 36, 302-314.

Xu, S., Peng, G., Wang, Y., Fang, S., und Karbowski, M. (2011). The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol Biol Cell* 22, 291-300.

Yamanaka, K., Sasagawa, Y., und Ogura, T. (2012). Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 1823, 130-137.

Yang, Y., Xia, F., Hermance, N., Mabb, A., Simonson, S., Morrissey, S., Gandhi, P., Munson, M., Miyamoto, S., und Kelliher, M.A. (2011). A cytosolic ATM/NEMO/RIP1 complex recruits TAK1 to mediate the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/MAPK-activated protein 2 responses to DNA damage. *Mol Cell Biol* 31, 2774-2786.

- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A.M., Andersen, J.S., Mann, M., Mercurio, F., und Ben-Neriah, Y. (1998). Identification of the receptor component of the I $\kappa$ B $\alpha$ -ubiquitin ligase. *Nature* 396, 590-594.
- Ye, Y. (2006). Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *J Struct Biol* 156, 29-40.
- Ye, Y., Meyer, H.H., und Rapoport, T.A. (2001). The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.
- Ye, Y., und Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 755-764.
- Yeung, H.O., Kloppsteck, P., Niwa, H., Isaacson, R.L., Matthews, S., Zhang, X., und Freemont, P.S. (2008). Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. *Biochem Soc Trans* 36, 62-67.
- Yuan, X., Simpson, P., McKeown, C., Kondo, H., Uchiyama, K., Wallis, R., Dreveny, I., Keetch, C., Zhang, X., Robinson, C., *et al.* (2004). Structure, dynamics and interactions of p47, a major adaptor of the AAA ATPase, p97. *EMBO J* 23, 1463-1473.
- Yun, C., Stanhill, A., Yang, Y., Zhang, Y., Haynes, C.M., Xu, C.F., Neubert, T.A., Mor, A., Philips, M.R., und Ron, D. (2008). Proteasomal adaptation to environmental stress links resistance to proteotoxicity with longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7094-7099.
- Zehner, M., Chasan, A.I., Schuette, V., Embgenbroich, M., Quast, T., Kolanus, W., und Burgdorf, S. (2011). Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 9933-9938.
- Zhang, J., Clark, K., Lawrence, T., Pegg, M.W., und Cohen, P. (2014). An unexpected twist to the activation of IKK $\beta$ : TAK1 primes IKK $\beta$  for activation by autophosphorylation. *Biochem J* 461, 531-537.
- Zhang, L., Zhou, F., Li, Y., Drabsch, Y., Zhang, J., van Dam, H., und ten Dijke, P. (2012). Fas-associated factor 1 is a scaffold protein that promotes beta-transducin repeat-containing protein (beta-TrCP)-mediated beta-catenin ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 287, 30701-30710.
- Zhang, L., Zhou, F., van Laar, T., Zhang, J., van Dam, H., und Ten Dijke, P. (2011). Fas-associated factor 1 antagonizes Wnt signaling by promoting beta-catenin degradation. *Mol Biol Cell* 22, 1617-1624.
- Zhang, X., Shaw, A., Bates, P.A., Newman, R.H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M.A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., *et al.* (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* 6, 1473-1484.
- Zhao, G., Zhou, X., Wang, L., Li, G., Schindelin, H., und Lennarz, W.J. (2007). Studies on peptide:N-glycanase-p97 interaction suggest that p97 phosphorylation modulates endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8785-8790.
- Zhong, X., und Pittman, R.N. (2006). Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet* 15, 2409-2420.
- Zhou, A., Scoggin, S., Gaynor, R.B., und Williams, N.S. (2003). Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. *Oncogene* 22, 2054-2064.

Zwickl, P., Voges, D., und Baumeister, W. (1999). The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 1501-1511.

## Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-, 10 <sup>-6</sup>
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AAA	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
ALS	<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BD	Bindedomäne
BS1	<i>Binding Site 1</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserum-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Zenti-, 10 <sup>2</sup>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cav1	Caveolin1
Cdc48	<i>Cell division control protein 48</i>
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyterminus
D	Dalton
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAG	Diacylglycerol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	EGF-Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Fetales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung, $9,81 \text{ m s}^{-2}$
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin
GFP	grün fluoreszierende Protein
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GST	Glutathion-S-Transferase
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HECT	<i>Homologous To E6AP Carboxy Terminus</i>
HEK 293T Zellen	Menschliche embryonale Nierenzellen
HeLa Zellen	Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Helene Lane
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
Hoechst	Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrat, 2,5'-Bi-1H-benzimidazole, 2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-/23491-52-3
HOIL-1L	<i>Heme-Oxidized IRP2 Ubiquitin Ligase 1L</i>
HOIP	HOIL-1L <i>Interacting Protein</i>
HPRT	Hypoxanthine-Guanin-Phosphoribosyltransferase
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B</i>
IBMPFD	<i>Inclusion Body Myopathy with Paget's disease of the bone and frontotemporal Dementia</i>
IKK	I- $\kappa$ B Kinase
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL1R1	IL-1 $\beta$ -Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
JAMM	<i>Jab1/Mov34/Mpr1</i>
K	Kilo-, $10^3$
K	Lysinrest
K11	Lysin 11
K29	Lysin 29
K48	Lysin 48
K63	Lysin 63
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
LB	Luria-Bertani (-Medium)
LT $\beta$ R	Lymphotoxin $\beta$ -Rezeptoren
LUBAC	<i>Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
LZ	Leucin-Zipper-Domäne
M	Mega-, $10^6$
M	Methionin
M	Molar
m	Milli-, $10^{-3}$

mA	Milliampere
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MDa	Megadalton
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano-, $10^{-9}$
N	eine beliebige Base
n.s.	nicht signifikant
NEMO	<i>NF-<math>\kappa</math>-B essential modulator</i>
NES	nukleäre Exportsequenz
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-<math>\kappa</math> B</i>
ng	Nanogramm
MJD	<i>Machado-Joseph Disease</i>
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-Terminus	Aminoterminus
MyD88	<i>myeloid differentiation primary gen 88</i>
OD	Optische Dichte
OTU	<i>Ovarian Tumor Domain</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogen-Deaminase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
R	eine Purinbase
RANK	Rezeptoraktivator von NF- $\kappa$ B
RBR	<i>RING Between RING</i>
RHD	<i>Rel Homology Domain</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RLU	relative Lichteinheit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S	Sedimentationskoeffizient (Svedberg)

---

S	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	<i>Synthetic complete</i> (Medium)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHARPIN	<i>SHANK-Associated RH Domain-Interacting Protein</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SODD	<i>Silencer Of Death Domain</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
Tab.	Tabelle
TAD	Transkriptionsaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Thr	Threonin
TIR	Toll-IL-1R
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
TNF-R1	TNF $\alpha$ -Rezeptor
TRADD	<i>TNFR-Associated Death Domain Protein</i>
TRAF	<i>TNF-Receptor-Associated Factor</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
U	<i>Unit</i>
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
UBA	<i>Ubiquitin associated</i>
UBX	<i>Ubiquitin Regulatory X</i>
UCH	<i>Ubiquitin Carboxyl Hydrolase</i>
USP	<i>Ubiquitin Specific Protease</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
VCP	<i>Valosin containing protein</i>
VIM	<i>VCP Interacting Motif</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
Y	eine Pyrimidinbase
YPD	Hefeextrakt/Pepton/Glukose (Medium)
z.B.	zum Beispiel

---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Prof. A. Buchberger, für das interessante und abwechslungsreiche Projekt, das ich bearbeiten durfte, und die Möglichkeit mit großer Freiheit zu forschen bedanken.

Herrn Prof. U. Fischer möchte ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit danken, sowie für die gute Aufnahme der AG Buchberger an den Lehrstuhl für Biochemie in Würzburg. Auch Herrn PD Dr. I. Berberich möchte ich für das Interesse an meiner Arbeit danken.

Mein Dank geht außerdem an Herrn Prof. M. Eilers und Frau Dr. U. Eilers, deren „Operetta“ ich für die mikroskopischen Aufnahmen nutzen durfte, sowie an Herrn Prof. M. Gessler und seine Arbeitsgruppe, deren Luminometer ich regelmäßig belegen durfte.

Außerdem möchte ich mich bei allen „Sklassen“ bedanken, die mit mir dieses Projekt bearbeiten durften und entscheidend dazu beigetragen haben: Patrick, Marina, Gayathri und Michael. Ich hoffe, ihr hattet eine gute Zeit und ich hab euch nicht den letzten Nerv geraubt.

Ein herzliches Dankeschön auch an die übrigen Mitstreiter im Labor Buchberger, vor allen Christopher, Ankit, Steffi, Lisa, Sven und Erika. Die gute Stimmung im Labor hat so einiges einfacher gemacht. Vielen Dank auch an die Mitglieder der AG Fischer, die immer ein offenes Ohr für meine Zellkultur-Fragen hatten und gerne Wissen und Reagenzien mit uns geteilt haben. Danke an beide Gruppen für lustige Kaffeerunden, geteilte Kuchen und gemeinsam gelaufene Kilometer.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Freunden und Familien bedanken, die immer geduldig mit mir waren und mich unterstützt haben. Euch danke ich für einfach alles.