

Charakterisierung des Proteasom-Shuttling-Proteins HR23B und seiner Interaktionspartner in der Proteinqualitätskontrolle

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Pia-Victoria Fangmann

Betreuer*in:

Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte, Halle (Saale)

Prof. Dr. Heidi Olzscha, Hamburg

Gutachter*innen:

Prof. Dr. Claudia Grossmann, Halle (Saale)

Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz, Jena

Datum der Verteidigung: 16.04.2024

Referat

Proteasom-Shuttling-Faktoren erkennen ubiquitinierte Proteine und transportieren diese zum Proteasom. Dies ist unter anderem ein Mechanismus zum Abbau fehlgefalteter Proteine im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung des Proteasom-Shuttling-Faktors HR23B und seiner Interaktionspartner. Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner wurden Co-Immünpräzipitationen und massenspektrometrische Analysen mit endogenem HR23B in humanen epithelialen Zelllinien (U2OS-Zellen) erfolgreich durchgeführt und bereits beschriebene Interaktionspartner verifiziert. Als bisher unbekannte Interaktionspartner wurden die ribosomalen Proteine der großen Untereinheit (RPL22L1, RPL4, RPL13A, RPL13) sowie der kleinen Untereinheit (RPS19, RPS2) identifiziert. STRING-Interaktionsanalysen zeigten eine Interaktion von HR23B und ribosomalen Proteinen, welche auch über das Proteasom vermittelt wurde. Ein gemeinsames Vorkommen von HR23B und RPL5, als Beispiel für ein ribosomales Protein, konnte im Bereich des Nukleus von U2OS-Zellen durch Immunfluoreszenz-Doppelfärbung nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die weitere Charakterisierung von HR23B selbst konnte gezeigt werden, dass der Shuttleing-Faktor im Zytoplasma und im Zellkern, insbesondere in Nukleoli von U2OS-Zellen vorkommt. Dies deutet auf einen möglichen Zusammenhang mit der Biogenese ribosomaler Proteine hin. Eine Hyperacetylierung von U2OS-Zellen führte zu einer verminderten Expression von HR23B. Eine induzierte Überexpression von HR23B durch das Tet-On System in U2OS-Zellen führte zu einer erhöhten Translationsrate. Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass HR23B bei dem Abbau überschüssiger ribosomaler Proteine im Nukleolus assistiert, indem der Shuttleing-Faktor diese in nukleäre Bereiche mit Proteasom-Aktivität transportiert.

Insgesamt tragen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation dazu bei, das Verständnis von HR23B im Ubiquitin-Proteasom-System zu erweitern. Die Identifizierung ribosomaler Proteine als bisher unbekannte Interaktionspartner eröffnet einen neuen Aspekt der Funktion von HR23B in der Proteinqualitätskontrolle.

Inhaltsverzeichnis

I.	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole.....	I
1	Einleitung	1
1.1	Proteinhomöostase.....	1
1.2	Vielfalt von Proteinen durch posttranslationale Modifikation	1
1.3	Proteinqualitätskontrolle – Ein Zusammenspiel von Chaperonen, dem Proteasom und der Autophagie.....	3
1.4	Proteasom-Shuttling-Faktoren	6
1.5	Ribosomen und ribosomale Proteine	8
2	Zielstellung.....	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Material.....	11
3.1.1	Chemikalien.....	11
3.1.2	Molekularbiologische Reagenzien und Kits.....	12
3.1.3	Hergestellte Lösungen	13
3.1.4	Zelllinien	14
3.1.5	Zellkultur-Reagenzien.....	14
3.1.6	Primer	14
3.1.7	Antikörper.....	15
3.1.8	Verbrauchsmaterialien	16
3.1.9	Geräte	16
3.1.10	Software.....	17
3.2	Methoden.....	18
3.2.1	Zellbiologische Methoden	18
3.2.1.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien	18
3.2.1.2	Zellzahlbestimmung.....	18
3.2.1.3	Transfektion mammalischer Zellen.....	18
3.2.1.4	Kryokonservierung der Zellen.....	18
3.2.1.5	Mikroskopie mittels Immunfluoreszenz Färbung.....	19
3.2.1.6	Tet-On System	19
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	20
3.2.2.1	Protein-Isolation.....	20
3.2.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test	20
3.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
3.2.2.4	Western Blot	21
3.2.2.5	Kern-Zytoplasma-Trennung.....	22

3.2.2.6	Co-Immunpräzipitation	22
3.2.2.7	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie	23
3.2.2.8	Proteomanalyse durch Massenspektrometrie	23
3.2.2.9	Puromycin-Inkorporation-Assay	24
3.2.3	DNA-Analyse und Techniken	24
3.2.3.1	RNA-Isolation	24
3.2.3.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren	24
3.2.3.3	Reverse Transkription	25
3.2.3.4	Primer	25
3.2.3.5	Polymerase Kettenreaktion	25
3.2.3.6	Agarose-Gel-Elektrophorese	26
3.2.3.7	Restriktionsspaltung und Ligationsreaktion	26
3.2.3.8	Transformation kompetenter Zellen	27
3.2.3.9	Plasmidpräparation	27
3.2.3.10	Transfektion mammalischer Zellen	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Lokalisationsanalyse des endogenen HR23B in U2OS-Zellen	28
4.1.1	Expression von HR23B in U2OS-Zellen	28
4.1.2	Lokalisation von HR23B in U2OS-Zellen	28
4.1.3	Quantifizierung von HR23B im Kern und Zytoplasma	30
4.2	Einfluss von Hyperacetylierung auf HR23B	31
4.3	Co-Immunpräzipitation identifiziert bekannte und neue Bindungspartner von HR23B	32
4.3.1	Identifizierung von HR23B als Zielprotein (Vorversuch)	32
4.3.2	Signalweg-Analyse „DNA-Reparatur“	34
4.3.3	Signalweg-Analyse „Proteasom“	35
4.3.4	Signalweg-Analyse „Protein Faltung“	36
4.3.5	Signalweg-Analyse „Nukleolus“	37
4.4	Analyse von HR23B-Interaktionspartnern	40
4.4.1	Identifizierung von HR23B als Zielprotein	41
4.4.2	Signalweg-Analyse „Ribonukleoprotein Komplex“	42
4.4.3	Interaktionsnetzwerk-Analyse von HR23B	43
4.5	Co-Lokalisation von HR23B und RPL5	45
4.6	Überexpression von HR23B durch das Tet-On System	46
4.7	Einfluss von HR23B-Überexpression auf die Translationsrate der Zelle	47
4.8	Analyse des Abbaus von HR23B	48

4.8.1	Halbwertszeit von HR23B	48
4.8.2	Analyse des Abbauweges von HR23B über das Proteasom.....	49
4.8.3	Analyse des Abbauweges von HR23B über die Autophagie	50
4.9	Klonierung des Ubiquitin-Rezeptorprotein SQSTM1/p62	51
5	Diskussion	55
6	Zusammenfassung.....	68
7	Literaturverzeichnis	70
8	Thesen.....	80
I.	Anhang.....	I
II.	Danksagung	VI
III.	Eidesstattliche Erklärung	VII

I. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

Asp	Asparaginsäure
bp	Basenpaare
BioGRID	Biological General Repository for Interaction Datasets
CCT	Chaperonin containin tailless complex polypeptide 1
cDNA	komplementäre DNA, engl.: complementary DNA
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
CTCL	Kutanes T-Zell Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl.: deoxyribonucleic acid
Dox	Doxycyclin
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Proteindegradation
ERISQ	Excess Ribosomal Protein Quality Control
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False Discovery Rate
FITC	fluorescein isothiocyanate
G	Gauge
GO	Gene Ontology
GOCC	Gene Ontology Cellular Component-Pathway
h	Stunde
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase Inhibitor
HeLa-Zellen	Zellen (Zell-Linie) aus dem Cervix-Tumorgewebe der 1949 verstorbenen Patientin Henrietta Lachs
HR23B	UV excision repair protein Rad23 homolog B/ Synonym: Rad23B
Hsp	Hitzeschockproteine, engl.: heat shock proteins
HWZ	Halbwertszeit
IF	Immunfluoreszenz
iBAQ	intensity Based Absolute Quantitation
IP	Immunpräzipitation

kDA	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB-Medium	Lysogeny broth
LLPS	Flüssig-Flüssig-Phasentrennung, engl.: Liquid-Liquid phase separation
Lys	Lysin
M	Mol
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assistierter Laser-Desorption-Ionisierung in Kombination mit der Flugzeitanalyse (engl.: time of flight/TOF) Massenspektrometrie
Met	Methionin
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PML	Promyelozytische Leukämie
PQC	Proteinqualitätskontrolle
PTM	Posttranslationale Modifikation
r	Pearson-Korrelationskoeffizient
Rad23B	UV excision repair protein Rad23 homolog B/ Synonym: HR23B
RASTR	Ribosomal Assembly Stress Response
RNA	Ribonucleic acid
RPL	60S ribosomales Protein
rpm	Revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute
RPS	40S ribosomales Protein
rRNA	Ribosomale RNA
rtTA	Reverser Tetracyclin-gesteuerter Transaktivator
rTetR	Reverser Tet Repressor
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SILAC MS	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture Massenspektrometrie
SOC-Medium	Superoptimale Brühe mit Kataboliten
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer

TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween
tetO	Tet Operator Sequenz
TetR	Tet Repressor
TF	Transkriptionsfaktor
TRE	Tet-Response Element
TRiC	tailless complex polypeptide 1 ring complex
tTA	Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator
Tyr	Tyrosin
Ub	Ubiquitin
UBL	Ubiquitin-ähnliche Domäne, engl.: Ubiquitin-like domain
UBA	Ubiquitin-assoziierte Domäne, engl.: ubiquitin associated domain
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
μ	Mikro
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

1.1 Proteinhomöostase

Das Proteom repräsentiert die Gesamtheit aller Proteine in einem Organismus und kann in verschiedene organspezifische oder gewebespezifische Subproteome unterteilt werden. Sowohl das Proteom als auch seine Subproteome unterliegen einer homöostatischen Regulation (1). Dieser Prozess, bekannt als Proteostase, ermöglicht Organismen und Zellen die Anpassung des Proteoms an physiologische Veränderungen, Umweltbedingungen und den Alterungsprozess. Proteostase bezieht sich auf die Kontrolle, Regulierung und Aufrechterhaltung der Proteine im gesamten Proteom, einschließlich ihrer Konzentration, Konformation, Lokalisation und Interaktion (2). Verschiedene Spleißvarianten und posttranslationale Modifikationen (PTMs) erhöhen die Vielfalt der Proteine weiter und beeinflussen ihre Faltungseigenschaften (3). Trotz der evolutionären Selektion von Proteinsequenzen gegen Fehlfaltung und Aggregation können Proteine dennoch durch Mutation oder während des Alterungsprozesses fehlfalten und aggregieren (3). Aberrante Proteine bergen die Gefahr der Bildung toxischer Aggregate, die mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit oder der Parkinson-Krankheit in Verbindung gebracht werden und in der Gruppe der Proteinopathien zusammengefasst werden (4, 5). Ob die Aggregate selbst oder sogar die Vorläufer toxischer sind, ist derzeit Gegenstand aktueller Forschung. Zur Vermeidung solcher pathologischen Veränderungen sind verschiedene Proteinqualitätskontrollsysteme (PQC) aktiv, die sicherstellen, dass Menge, Lokalisation und Faltung der Proteine nicht beeinträchtigt sind. Die drei Hauptelemente dieser PQC-Systeme, die die Integrität des Proteoms erhalten, sind molekulare Chaperone, das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Autophagie (3). Bei Krankheiten oder mit zunehmendem Alter kann es jedoch zu einem Versagen dieser schützenden PQC-Netzwerke kommen, wodurch die Überwachungsfunktion beeinträchtigt wird und es zu Fehlfaltungen und Aggregation von Proteinen kommen kann (4, 5).

1.2 Vielfalt von Proteinen durch posttranslationale Modifikation

In den letzten Jahren wurden verschiedene Regulationsebenen identifiziert, die es den Zellen ermöglichen, sich basierend auf dem vorhandenen genetischen Code an ihre Umwelt anzupassen. Während der Übersetzung eines RNA-Transkripts in ein Protein können zusätzliche Modifikationen auftreten. Diese sogenannten posttranslationalen Modifikationen (PTMs) stellen eine Ebene der Regulation dar (6). Der Begriff „Proteom“ – eine Kombination aus den Wörtern „Protein“ und „Genom“ – wurde 1994 von Marc Wilkins geprägt, um die Komplexität der Gesamtheit aller Proteine zu verdeutlichen (7). Eine Definition der co- oder posttranslationalen Modifikation ist die enzymatische oder nicht-

enzymatische Addition bestimmter chemischer Gruppen an Aminosäureseitenketten oder die proteolytische Spaltung von Proteinen während oder nach der Translation (8). Solche Veränderungen beeinflussen sowohl die Proteinstruktur als auch physiologische und zelluläre Funktionen (8). Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und Citrullinierung sind die häufigsten (9). Natürlicherweise falten sich Proteine während der Translation in eine dreidimensionale Struktur, die durch das Prinzip des Verbergens hydrophober Aminosäurereste diktiert wird (10). PTMs spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Proteinen, indem sie deren Struktur verändern und aktive Stellen sowie Grenzflächen freilegen oder maskieren. Dadurch werden Protein-Protein-Wechselwirkungen, Proteinlokalisierung, Stabilität und Aktivität ermöglicht (11).

Die Lysinacetylierungen als PTM wurden ursprünglich in Histonproteinen entdeckt, wo sie die Gentranskription regulieren (12, 13). Die Histonacetyltransferasen (HATs) fügen Acetylgruppen hinzu und tragen zur Transkriptionsaktivierung bei. Histondeacetylasen (HDACs) entfernen Acetylgruppen, wodurch es zu einer kompakteren Chromatinstruktur kommt, was die Genexpression erschwert. Daher werden HDACs auch als Transkriptionsrepressoren bezeichnet (siehe Abbildung 1). Acetylierung findet zudem an zytoplasmatischen Proteinen statt und trägt über die Transkriptionsregulation hinaus zur Zellfunktion bei (14).

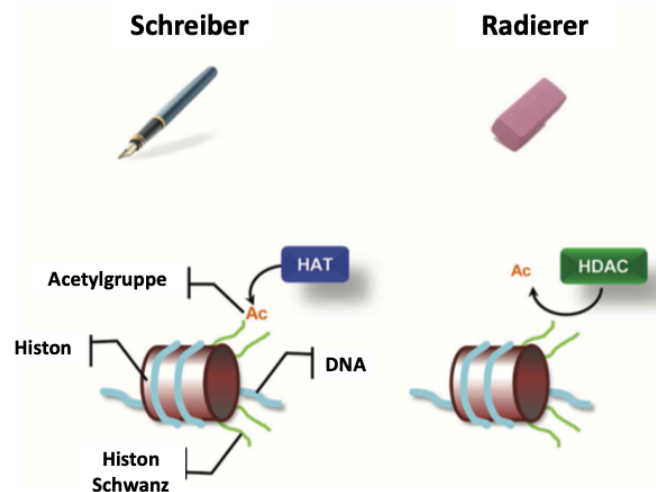


Abbildung 1: Funktionsweise der Histonacetylasen (HATs) und der Histondeacetylasen (HDAC)

Bei posttranslationalen Modifikationen (PTMs) sind Histonacetylasen („Schreiber“) für das Hinzufügen von Acetylgruppen zuständig, während Histondeacetylasen als „Radierer“ agieren und Acetylgruppen entfernen. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olzscha H (2019) (15).

Ubiquitin (Ub) ist ein hochkonserviertes Polypeptid bestehend aus 76 Aminosäuren (16). Die kovalente Bindung von Ub an andere zelluläre Proteine erfolgt durch den spezifischen Prozess der Ubiquitinierung, der aus drei Hauptreaktionen besteht und durch ein Enzym

katalysiert wird: Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) und Ubiquitin-Ligase (E3) (16). Die Bindung von Ub an Substrate erfolgt kovalent über Lysinreste (Lys). Basierend auf der Anzahl aneinander gebundener Ub-Moleküle können kurze (beginnend mit nur zwei Ub-Einheiten) oder lange (mehr als 10 Ub-Moleküle) Ketten gebildet werden. In Polyubiquitin-Ketten können weitere Ubiquitin-Einheiten über verschiedenen Bindungen an Methionin (Met1) oder beliebigen Lysinresten angefügt werden, wobei in vivo vor allem Lys29-, Lys48 und Lys63- Bindungen beobachtet werden. Diese Flexibilität des Ubiquitinierungsprozesses (von Mono- und Multi- bis Polyubiquitinierung) und die strukturelle Vielfalt der Ub-Ketten sind die Grundlage des „Ub-Erkennungscode“ (17). Polyubiquitin-Ketten, bestehend aus vier Ub-Einheiten und über Lys48-Bindungen verbunden, dienen als Markierung für den proteasomalen Abbau von Proteinen und können vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut werden. Dementsprechend spielt die Polyubiquitinierung eine entscheidende Rolle beim proteasomalen Proteinabbau (18).

PTMs können die Faltung und Struktur von Proteinen verändern und nehmen somit Einfluss auf ihre biochemische Aktivität. Es ist daher möglich, dass PTMs zu Funktionsstörungen von Proteinen führen und zu Ent- oder Fehlfaltungen beitragen können. Ein prominentes Beispiel ist das Protein Tau bei der Alzheimer Krankheit. Es ist bekannt, dass dieses Protein mit fortschreitender Erkrankung hyperphosphoryliert wird und dadurch charakteristische intrazelluläre neurofibrilläre Bündel bildet (19).

Acetylierung und Ubiquitinierung spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinabbau und -stabilität. Sowohl Acetylierung als auch Ubiquitinierung finden an freien Lysinresten statt und können miteinander konkurrieren (20). Es ist nicht vollständig verstanden, wie diese Kompetition den Fluss von ubiquitinierten Proteinen zum Proteasom beeinflusst und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen. Die vorliegende Arbeit soll dabei helfen, neue Erkenntnisse über den Einfluss von Acetylierung auf den Abbau von ubiquitinierten Proteinen zu gewinnen. Dies kann dazu beitragen, das Verständnis der Proteostase und des Proteinabbausystems zu vertiefen.

1.3 Proteinqualitätskontrolle – Ein Zusammenspiel von Chaperonen, dem Proteasom und der Autophagie

Proteostase beschreibt den Zustand, in dem sich das Proteom eines Organismus im funktionellen Gleichgewicht befindet, also Proteinsynthese und Proteinabbau koordiniert und ausbalanciert sind. Eine gestörte Proteostase birgt das Risiko einer Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen, der Bildung von Aggregaten und möglicherweise von Proteinfaltungskrankheiten, auch Proteinopathien genannt. Deshalb hat die Zelle ein

umfassendes Qualitätskontrollnetzwerk entwickelt, um den Zustand der Proteostase zu gewährleisten (5). Das Netzwerk für die PQC basiert auf drei Hauptmechanismen: (1) molekulare Chaperone, die bei der Proteinfaltung unterstützen, (2) das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) für den Abbau von Proteinen und (3) die Autophagie für den Abbau größerer Proteinkomplexe. Diese Systeme sind äußerst strukturiert und Fehlfunktionen haben erhebliche Auswirkungen auf die Proteostase (21). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Funktionsweise der Proteinfaltung, Fehlfaltung und der Proteinqualitätskontrolle.

Molekulare Chaperone wurden erstmals 1978 beschrieben (22). Chaperone sind Proteine, die andere Proteine bei mehreren Phasen des Erwerbs ihrer vorgesehenen dreidimensionalen Struktur unterstützen. Dabei verhindern Chaperone Fehlfaltungen und Aggregationen und können diese rückgängig machen (23). Sie stellen die erste Ebene der PQC dar. Hartl et al. definierten molekulare Chaperone wie folgt: „Wir definieren ein molekulares Chaperon als jedes Protein, das mit einem nicht-nativen Protein interagiert, es stabilisiert oder ihm hilft, seine native Konformation zu erlangen, aber in der endgültigen funktionellen Struktur nicht vorhanden ist“ (23). Entsprechend ihrer Molekülgröße werden sie eingeteilt: Hsp100s, Hsp90s, Hsp70s, Hsp60s, Hsp40s und kleine Hitzeschockproteine (sHSPs). Im Falle einer fehlerhaften Chaperon-vermittelten Faltung verfügt die Zelle über Abbauewege, die die Akkumulation von Proteinaggregaten verhindern. Defekte Proteine oder Aggregate werden durch das UPS effektiv beseitigt und abgebaut. Ciechanover, Hershko und Rose stellten das Abbausystem entlang des Lysosoms erstmals vor (24). Ciechanover et al. fassten das UPS wie folgt zusammen: „Das Ubiquitin-Proteasom-System ist ein selektives proteolytisches System, in dem Substrate mit Ubiquitin markiert, zu Polypeptidketten entfaltet und in kurze Peptide gespalten werden, während sie die schmale Kammer des Proteasoms passieren“ (25). Ub spielt hierbei eine wichtige Rolle. Durch die Lys48-Verknüpfung wird das Protein für den Abbau gekennzeichnet (18). Das Proteasom selbst hat eine zylindrische Struktur und besteht aus drei Komponenten: einem 20S-Kernpartikel mit proteolytischen Eigenschaften und zwei umgebenden 19S-Regulatorpartikeln (26). Das 19S-Partikel bindet polyubiquitinierte Proteine, entfaltet sie und leitet sie in die Kammer des 20S-Partikels, wo sie in kleine Peptide gespalten werden. Chymotrypsin-, Trypsin- und Caspase-ähnliche Aktivitäten ermöglichen die Spaltfunktion innerhalb des Kernpartikels (27). Der energieaufwändige Prozess der Proteinfaltung erfolgt durch sechs ATPase-Untereinheiten im 19S-Regulatorpartikel. Darüber hinaus spielt das 19S-Regulatorpartikel über die Untereinheiten Rpn10 und Rpn13 eine wesentliche Rolle bei der Ub-Erkennung (28, 29). Ein anderer Weg, polyubiquitinierte Proteine zum Proteasom zu leiten, führt über die UBL/UBA-Proteine oder auch Shuttling-Faktoren

genannt, wie HR23B (30). Diese Proteasom-assoziierten Proteine binden einerseits das Proteasom über ihre Ubiquitin-ähnliche Domäne (UBL) und andererseits Ub über eine oder mehrere Ubiquitin-assoziierte Domänen (UBA) (31). Die Bindung an das Proteasom erfolgt dabei nur schwach, weshalb sie keine integralen Proteasom-Untereinheiten sind. Im Abschnitt 1.4 wird näher auf die Gruppe der UBL/UBA-Proteine bzw. Shuttling-Faktoren eingegangen.

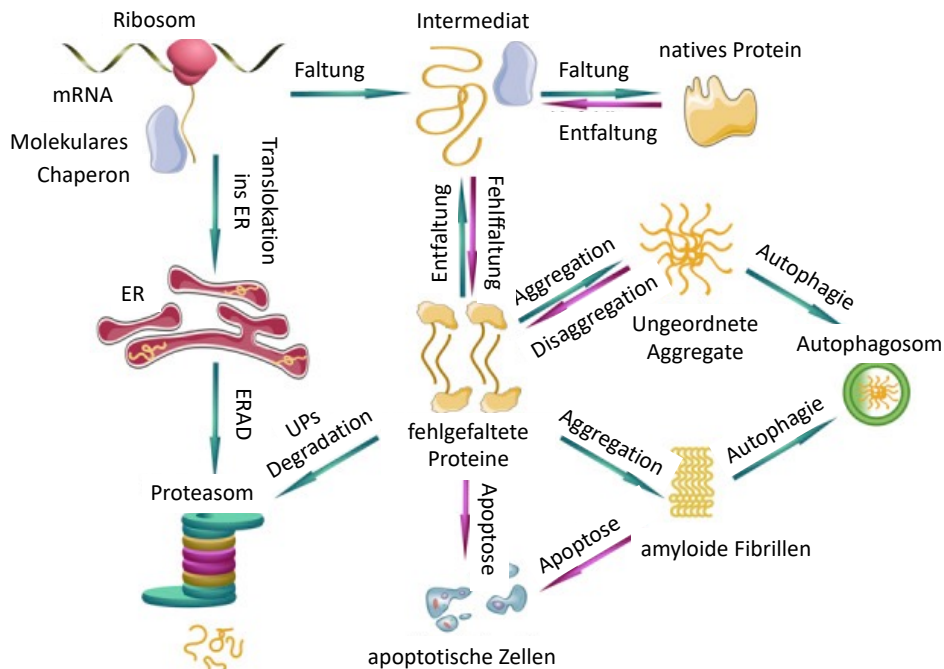


Abbildung 2: Proteinfaltung, Fehlfaltung und Proteinqualitätskontrollmechanismen

Molekulare Chaperone unterstützen die korrekte Faltung von Proteinen. Bei Faltungsfehlern können fehlgefaltete Proteine zu ungeordneten Aggregaten oder Amyloidfibrillen führen. Das UPS baut fehlgefaltete Proteine im Zytoplasma und im endoplasmatischem Retikulum ab, während die Autophagie größere Aggregate beseitigt. Funktionsfähige Proteinqualitätskontrollsysteme schützen die Zelle. Wenn diese versagen, können schädliche Ereignisse auftreten, die zum Zelltod führen können. Eine präzise Regulierung dieser Systeme ist daher wichtig, um die Zelle vor den negativen Auswirkungen fehlgefalteter Proteine zu schützen und das zelluläre Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kulka LAM, Fangmann PV, Panfilova D, Olzscha H (2020) (4).

Ein weiteres Abbausystem zum Abbau größerer Proteinkomplexe ist die Autophagie, bei der Lysosomen mit Autophagosomen fusionieren. Lysosomen sind membranumschlossene Organellen, die im Inneren einen sauren pH-Wert aufweisen. Im Inneren des Lysosoms befindet sich eine Vielzahl unspezifischer Proteasen, die Proteine in einer sauren Umgebung abbauen. Diese toxische Umgebung eignet sich für den Abbau ganzer Zellorganellen (32). Beim Eintritt in das Lysosom kann ein Protein auf drei verschiedene Arten abgebaut werden. Diese umfassen die Mikroautophagie, die Makroautophagie sowie die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA). Bei der Mikroautophagie werden kleine Substrate durch Invagination in das Lysosom internalisiert. Im Falle der Makroautophagie werden zuvor autophagische Vesikel gebildet, die zunächst sperrige zytoplasmatische Materialien oder

Organellen enthalten, die zum Abbau bestimmt sind. Daraufhin verschmelzen autophagische Vesikel mit dem Lysosom zu einem sogenannten Autophagolysosom (32). Ein gerichteter Abbau wird durch die CMA erreicht. Hierbei ermöglicht die Markierung und Anheftung von Chaperonen die Translokationen in das Lysosom (33).

Die Hauptunterschiede zwischen den Abbausystemen UPS und Autophagie liegen in der Selektivität, Quantität und den Endprodukten. Während das UPS selektiv markierte Substrate abbaut, die dem adaptiven Immunsystem zugeführt werden können, ist die Autophagie sowohl für den unselektiven Massenabbau von Zellbestandteilen zur Wiederverwertung als auch für die selektive CMA verantwortlich (34).

Um eine optimale Proteostase sicherzustellen, interagieren die drei Hauptmechanismen der Proteinqualitätskontrolle miteinander und eine Vielzahl an Regulationsfaktoren ist an ihrer präzisen Abstimmung beteiligt. Es bedarf weiterer Forschung, um zu klären wie Hilfsproteine wie die Shuttling-Faktoren abgebaut und kontrolliert werden. In der vorliegenden Arbeit soll das Proteasom-Shuttling-Protein HR23B näher charakterisiert werden.

1.4 Proteasom-Shuttling-Faktoren

Obwohl der Abbau von fehlgefalteten Proteinen durch das Proteasom gut erforscht ist, sind die Mechanismen, die die Ubiquitinierung des Substrats bis zu seinem endgültigen Abbau durch das Proteasom vermitteln, weniger gut charakterisiert. Zunächst wurde das Substrat-Targeting zum Proteasom als ein stochastischer Prozess angesehen, der auf hochaffinen Wechselwirkungen mit Multi-Ubiquitin-Ketten beruht (35). Diese Theorie erklärt jedoch nicht ausreichend, wie gewährleistet wird, dass proteolytische Substrate rechtzeitig entfernt werden, wenn ihr endgültiger Abbau nur vom Zufall abhängt. Es bedarf der Klärung, welche Faktoren die Bindung von Ub am Proteasom beeinflussen und fördern. Es existieren verschiedene Ub-bindende Rezeptoren, die für die proteasomale Beseitigung von Zielproteinen notwendig sind. Einige dieser Rezeptoren sind Teil des Proteasoms selbst, während andere sich nur vorübergehend während der Substratabgabe damit verbinden. Die intrinsischen proteasomalen Ub-Rezeptoren Rpn10 und Rpn13 können nur polyubiquitinierte Substrate erkennen, die sich in unmittelbarer Nähe des Proteasoms befinden (35, 36). Im Gegensatz dazu können Ub-bindende Rezeptoren, die keine integralen Bestandteile des Proteasoms sind, ubiquitinierte Ladungen erkennen, die sich weit entfernt vom Proteasom befinden und diese zum Proteasom transportieren (37, 38). Interessanterweise enthalten bekannte proteasomale Shuttle-Proteine, wie HR23B eine N-terminale UBL und eine oder mehrere C-terminale UBA-Domänen. Diese Domänen ermöglichen den Transport von polyubiquitinierten Proteinen zum Proteasom (39, 40). Die UBL-Domäne ist etwa 80 Aminosäuren lang und dient als Dockingstation zum Proteasom

(41). Die UBA-Domäne hat eine Größe von ungefähr 40 Aminosäuren und nimmt eine charakteristische Faltung an, welche aus drei dicht gepackten alpha-Helices besteht, die durch zwei kleine, flexible Bereiche voneinander getrennt sind. In diesen Bereichen bilden die erste und dritte Helix die Hauptkontaktstelle für die Bindung an Ub (42). Rad23 wurde als erstes UBL-haltiges Protein in Hefezellen beschrieben und das in der vorliegende Arbeit zu untersuchende Shuttling-Protein HR23B ist sein humanes Homolog (43). Deshalb gibt es bereits wissenschaftliche Voruntersuchungen zu HR23B als Mitglied der UBL/UBA-Shuttling-Proteinfamilie. Es handelt sich um ein mittelgroßes Multidomänprotein mit einer N-terminalen UBL-Domäne und zwei UBA-Domänen (zentrales UBA1 und C-terminales UBA2). Rad23/HR23B ist neben seiner Rolle als Proteasom-Shuttling-Faktor im UPS auch an der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beteiligt (44). Es zeigt keine enzymatische Aktivität und wird eher als Gerüstprotein betrachtet, dessen Funktionen durch die Bindung an Zielproteinen über verschiedene Bindungsmodule erfüllt wird. Die N-terminale UBL-Domäne von Rad23 bindet an Rpn1 oder Rpn10, welches Bestandteile des proteasomalen 19S-Regulatorpartikels sind (40, 45). Durch diese Bindung wird Rad23 in unmittelbarer Nähe zum Eingang des proteasomalen Kernpartikels positioniert (46). In ähnlicher Weise bindet auch das menschliche Homologe von RAD23, HR23B, an die proteasomale 19S-Untereinheit, um polyubiquitinierte Substrate durch die Interaktion mit S5a (dem menschlichen Homolog von Hefe Rpn10) zu präsentieren.

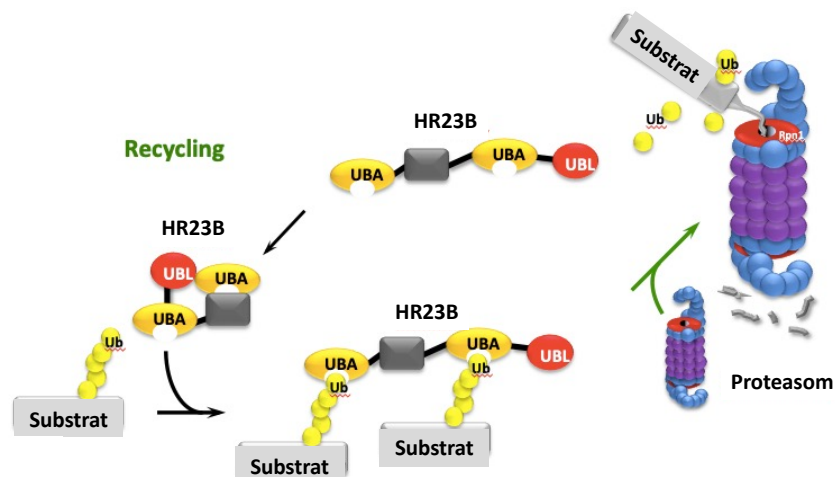


Abbildung 3: Interaktion zwischen HR23B seinen Interaktionspartnern und dem Proteasom
 Im UPS können Substratproteine (grau) durch Ubiquitinierung (gelb) markiert werden. Diese ubiquitinierten Substratproteine werden von HR23B, mittels UBA-Domäne, erkannt und zum Proteasom transportiert, wo sie abgebaut werden. Die Bindung an das Proteasom erfolgt über die UBL-Domäne. Nicht gebundenes HR23B und Ubiquitin werden recycelt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olzscha H (2019) (15).

Shuttling-Proteine wie HR23B interagieren mit dem Proteasom und ermöglichen die Verbindung von polyubiquitinierten Proteinen mit dem Proteasom über ihre UBA-

Domänen, die sowohl Mono-Ub als auch Poly-Ub binden können (47). Die UBA1-Domäne von Rad23 bevorzugt die Erkennung von Lys63-verknüpften Ub-Ketten, während die UBA2-Domäne eher Lys48-verknüpfte Ub-Ketten bindet (47-49). Abbildung 3 veranschaulicht die Funktionsweise von HR23B bei der Erkennung von Ub-markierten Proteinen und deren Übermittlung an das Proteasom. Die Identifizierung der Substrate, die HR23B-abhängig dem Proteasom zugeführt werden, ist bislang nur begrenzt erforscht. Aus diesem Grund beschäftigt sich ein wesentlicher Teil dieser Arbeit mit der Untersuchung und Beschreibung der Interaktionspartner von HR23B.

Des Weiteren wurden auch autophagosomale Shuttling-Faktoren identifiziert, die ebenfalls UBL- und UBA-Domänen aufweisen, wie z.B. SQSTM1/p62 (38). Abbildung 4 veranschaulicht die Domänenarchitektur bekannter proteasomaler Shuttling-Faktoren sowie bekannter Ub-bindender autophagischer Shuttle-Rezeptoren (50). Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen proteasomalen Shuttling-Faktoren sowohl untereinander als auch im Vergleich zu autophagischen Shuttling-Faktoren sind Gegenstand aktueller Forschung.

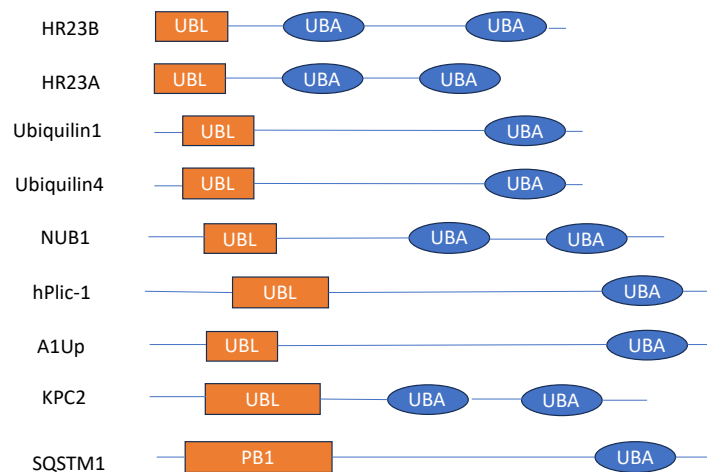


Abbildung 4: Proteasomale und autophagische Ub-bindende Protein Shuttleproteine

Darstellung der Domänenstruktur von Proteinen mit UBL-UBA-Domänen. Das Schema zeigt die Strukturen von HR23B, HR23A, hPlic-1, A1Up, KPC2, NUB1, Ubiquilin1, Ubiquilin4 und SQSTM1. Die UBL-UBA-Proteinfamilie besteht aus einer N-terminalen UBL-Domäne (oder PB1-Domäne für SQSTM1), einer oder mehreren C-terminalen UBA-Domänen. Mehrere UBA-Domänen werden als UBA1, UBA2 und UBA3 bezeichnet. Die Abbildung ist modifiziert nach Su V, Lau AF (2009) (50).

1.5 Ribosomen und ribosomale Proteine

Ein hoch konservierter Prozess, der ein funktionierendes PQC-Netzwerk erfordert, ist die Biogenese und die Assemblierung von Ribosomen. Aufgrund ihrer Bedeutungen für die Proteinbiosynthese innerhalb der Zelle, wird ein beträchtlicher Teil der Stoffwechselaktivität in ihre Produktion investiert. In menschlichen HeLa-Zellen werden pro Minute mehr als 7.500 Ribosomen produziert (51), die sich aus zwei RNA-Protein-Untereinheiten (60S und 40S) zusammensetzen. Diese wiederum bestehen aus vier

ribosomalen RNAs (rRNA) und bis zu 80 ribosomalen Proteinen (RP) (52). Die Ribosomenbiogenese findet unter anderem in spezialisierten subnukleären Kompartimenten statt, die als Nukleoli bezeichnet werden (53). Um den hohen Bedarf an Ribosomen in einer wachsenden und sich teilenden Zelle zu decken, muss der Zusammenbau effizient und mit hoher Präzision erfolgen (54). Zudem muss dieser Prozess so reguliert werden, dass das Angebot an neu entstehenden ribosomalen Proteinen sorgfältig mit der Nachfrage nach neuen Ribosomen in Einklang gebracht wird (55). Folglich sollten freie Moleküle ribosomaler Proteine (RP) nicht den limitierenden Faktor für den korrekten Zusammenbau von Ribosomen und der Translation darstellen. Zudem wurde festgestellt, dass die Synthese ribosomaler Proteine nicht von der Transkriptionsrate der Zelle abhängt. Vielmehr werden RP im Übermaß produziert, um den hohen Bedarf einer wachsenden und sich teilenden Zelle an der Ribosomenproduktion zu decken (56). Menschliche Ribosomen setzen sich aus nahezu 80 verschiedenen RP zusammen (54). Da Assemblierungsprozesse potentiell anfällig für Fehler sein können, ist es unwahrscheinlich, dass eine Zelle genau die benötigte Anzahl aller Proteine für den Ribosomenaufbau produziert. Stattdessen werden bestimmte RP im Überschuss synthetisiert und wieder abgebaut (56). Dies ist notwendig, um die unerwünschte Bildung von fehlgefalteten Proteinstrukturen zu verhindern. Ein gemeinsames Merkmal von Zellen zur Verhinderung der Aggregation ist daher in einem ersten Schritt der Einsatz von Chaperonen. Diese binden an RP und unterstützen den nukleären Import und die Faltungsprozesse (57). Wenn diese Maßnahme der PQC nicht ausreicht, werden RPs über das Proteasom abgebaut (56). Die genauen Mechanismen, wie überzählige RP in Nukleoli erkannt und zum Proteasom ins Nukleoplasma geleitet werden, sind jedoch noch ungeklärt. Die vorliegende Arbeit soll die Rolle des Proteasom-Shuttling-Faktors HR23B untersuchen. Insbesondere soll untersucht werden, ob ribosomale Proteine potentielle Bindungspartner sind. Dies könnte auf eine mögliche Funktion von HR23B bei der Aufrechterhaltung der ribosomalen Homöostase hindeuten.

2 Zielstellung

Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt eine grundlegende Komponente der zellulären Proteinqualitätskontrolle dar. Es ermöglicht das gezielte Ansteuern ubiquitiniertes Substrate zum Proteasom. Dies kann durch die Erkennung von Ubiquitin über integrale Domänen des Proteasoms als auch durch die Beteiligung von Proteasom-Shuttling-Faktoren erfolgen. Shuttle-Faktoren erkennen Ubiquitin-markierte Proteine und können diese zum Proteasom transportieren. Ein prominentes Beispiel eines solchen Proteasom-Shuttling-Faktors ist HR23B. Bislang sind die spezifischen Bindungspartner von HR23B nur unzureichend beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine weitergehende Charakterisierung von HR23B und seinen Interaktionspartnern vorzunehmen. Die einzelnen experimentellen Ansätze und Ziele waren:

- Die subzelluläre Lokalisation und Quantifizierung der HR23B-Menge in der humanen U2OS-Zelllinie sollte durch den Einsatz von Immunfluoreszenzfärbungen und Kern-Zytoplasma-Trennung bestimmt werden.
- Weiterhin sollte analysiert werden, ob Acetylierung möglicherweise Auswirkungen auf die Expression oder Stabilität von HR23B haben könnte.
- Es sollten weitere HR23B Interaktionspartner identifiziert werden. Hierzu sollten Co-Immunpräzipitationen durchgeführt und unbekannte Bindungspartner mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden. Ein potentiell gemeinsames Vorkommen von HR23B und gefundenen Bindungspartnern sollte in U2OS-Zellen untersucht werden.
- Ferner sollte die Auswirkung einer HR23B-Überexpression auf die Translationsrate der Zelle untersucht werden.
- Durch die Behandlung mit Proteasom- und Autophagie-Inhibitoren sollte der Abbauweg von HR23B selbst untersucht werden.
- Neben HR23B sollten andere Shuttle-Faktoren kloniert, in U2OS-Zellen exprimiert und weiter untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Standardchemikalien und -reagenzien in Analysequalität wurden von den Firmen Carl Roth, Sigma-Aldrich und Merck bezogen. Weitere verwendete Chemikalien und Reagenzien sind folgend aufgeführt.

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	Carl Roth GmbH
Agar-Agar	Carl Roth GmbH
Agarose Standard	Carl Roth GmbH
Ampicillin	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Bafilomycin	Carl Roth GmbH
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	SERVA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich
Desoxycholsäure	Carl Roth GmbH
Doxycyclin	Santa Cruz
Dimethylformamid	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Ethanol, absolute	Merck
Ethidiumbromidlösung (1%)	AppliChem
Ethlendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH
Essigsäure 96%	Carl Roth GmbH
Glycerol	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
G418	GIBCO
Hepes	Sigma-Aldrich
Hygromycin	Santa CRuz
Ibidi Mounting Medium	Ibidi GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH
KCL	Carl Roth GmbH
Luria Broth Base (LB-Medium)	Invitrogen
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH
MG 132	Merck
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Monopotassium phosphate	Carl Roth GmbH
Natriumacetat	Carl Roth GmbH
Natriumdeoxycholat-Detergenz	Carl Roth GmbH
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH

Natriumorthovanadate	Tocris Bioscience
Nonidet P-40	Fluka
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Ponceau-S	Carl Roth GmbH
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail (PIC) 1:500	Sigma-Aldrich
Puromycin	Sigma-Aldrich
SOC Medium	New England Biolabs
Suberanilohydroxamsäure (SAHA)	Hölzel Diagnostika GmbH
Tetramethylethyldiamine (TEMED)	Carl Roth GmbH
0,5 % Trypsin-EDTA (10x)	Gibco
Triton X-100	Carl Roth GmbH
Tris	Carl Roth GmbH
0,5 % Trypsin-EDTA (10x)	Gibco
Tween-20	Carl Roth GmbH
Bortezomib	Tocris Bioscience

3.1.2 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

Molekularbiologische Reagenzien	Hersteller
Amersham ECL select	GE Healthcare
Apal	Thermo Fisher Scientific
ClearMount™ mounting solution	Thermo Fisher Scientific
dNTP Set (100 mM)	Thermo Fisher Scientific
DreamTaq Master-Mix	Thermo Fisher Scientific
GeneJuice	Sigma-Aldrich
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
HindIII	Thermo Fisher Scientific
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Plus prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific
Pierce™ Protein-A-Agarose	Thermo Fisher Scientific
Protease Inhibitor Cocktail (PIC) P8340	Sigma-Aldrich
Proteinkinase K	Sigma-Aldrich
PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen
qPCR GreenMaster Mix	Jena Bioscience
Quick-RNA™ MiniPrep Kit	Zymo Research Corporation
RiboLock, RNA Inhibitor	Thermo Fisher Scientific
RNase K	Sigma-Aldrich
Super Script II Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific
Typranblau (0,4%)	Thermo Fisher Scientific
Zippy™ plasmid miniprep Kit	Zymo Research

3.1.3 Hergestellte Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden Puffer mit deionisierten Wasser hergestellt.

Blockierlösung in TBS-Puffer	Fixations-Lösung (IF)	Ladepuffer SDS-PAGE pH 6,8
5% Milchpulver	4 % PFA in PBS	12,5 % SDS 0,3 M Tris 50 % Glycerol 50 mM DTT 0,05 % Bromphenol- blau
Laufpuffer SDS-PAGE	Nukleärer Lysepuffer	PBS, pH 7,4
25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % SDS	0,1 % TBS-T 1 % NP 40 0,5 % Desoxycholol 0,1 % SDS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄
PBS-EDTA, pH 7,4	Protease Inhibitoren	Ponceau-Lösung
137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 0,25 % EDTA	1:500 PIC 500 µM PMSF 100 µM Natrium- orthovanadate 5 µM SAHA 400 µM N-Ethyl- maleimide	0,2 % Ponceau S 3 % TCA 3 % 5-Sulfo- salicylsäure
RIPA Lysepuffer, pH 7,4	Sammelgel SDS-PAGE, pH 8,8	TBS Puffer (1x), pH 7,6
150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 0,5 % Desoxy- cholol 1 % Nonidet-P40 1 mM EDTA	4 % Acrylamid 377 mM TRIS 0,05 % SDS 0,8 % APS 0,8 % TEMED	137 mM NaCl 7,7 mM TRIS
TBS-T Puffer (1 x), pH 7,6	TNN Lysepuffer (1 l), pH 7,4	Transferpuffer, pH 8,5
137 mM NaCl 7,7 mM TRIS 0,05 % Tween-20	50 mM Tris-HCL 0,5% NP-40 150 mM NaCl 20 mM MgCl ₂	20 mM TRIS 150 mM Glycin 10 % Ethanol
Trenngel SDS-PAGE, pH 6,8	Zytosolischer Lysepuffer, pH 7,4	
10 % Acrylamid 124 mM TRIS 0,05 % SDS 0,4 % APS 0,1 % TEMED	20 mM Hepes 10 mM KCL 2 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM EGTA	

3.1.4 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
U2OS-Zellen	Humane epitheliale Knochenosteosarkom Zellen	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA
Tet-On TRE U2OS-basiert	Humane epitheliale Knochenosteosarkom Zellen	Heidi Olzscha
Tet-On HR23B U2OS-basiert	Humane epitheliale Knochenosteosarkom Zellen	Heidi Olzscha

3.1.5 Zellkultur-Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco / Thermo Scientific
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco / Thermo Scientific
Penicillin-Streptomycin (P/S) 10.000 U/ml	Gibco / Thermo Scientific
L-Glutamin	Biochrom GmbH

3.1.6 Primer

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics bezogen.

	Basensequenz des Oligonukleotids 5' → 3'
HR23B <i>forward</i>	ACACAAGCTTATGCAGGTCACCCTGAAGACC
HR23B <i>reverse</i>	GTGTGGGCCCTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTCCTCCTCCTCC TCCATCTTCATCAAAGTTCTGCTG
NUB1 <i>forward</i>	ACACAAGCTTATGAAAACAAACGGCGGCCG
NUB1 <i>reverse</i>	GTGTGGGCCCTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTCCTCCT CCTCCTCCGTTTTTCTTTGTTGCTGACTTCCTATTT
SQSTM1 <i>forward</i>	ACACAAGCTTATGGCCATGTCTACGTGAAGGATG
SQSTM1 <i>reverse</i>	GTGTGGGCCCTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTCCTCCT CCTCCTCCCAACGGCGGGGGATGCTTTGAATAC
UBAC1 <i>forward</i>	ACACAAGCTTATGTTTCGTGCAGGAGGAGAAGATCT
UBAC1 <i>reverse</i>	GTGTGGGCCCTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTCCT CCTCCTCCTCCCGTGCATTTAGTGTCTGGAA
UBQLN4 <i>forward</i>	ACACAAGCTTATGGCGGAGCCGAGCGGGGCC
UBQLN4 <i>reverse</i>	GTGTGGGCCCTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTCCT CCTCCTCCTCCGAGAGCTGGGAGCCCAGCAGTCTCTCG
UBQLN1 <i>forward</i>	ACACAAGCTTATGGCCGAGAGTGGTAAAAGCGGCC
UBQLN1 <i>reverse</i>	GTGTGGGCCCTCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTCCTCCTC CTCCTCCTGATGGCTGGGAGCCCAGTAACCTT
Linker Sequenz	GGAGGAGGAGGAGGA
Flag Tag	GACTACAAAGACGATGACGACAAG

3.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Acetyl Histon H3	Kaninchen	Sigma-Aldrich	WB 1:1000
Actin	Maus	BD Science	WB 1:5000
beta Tubulin	Maus	Thermo Fisher Scientific	WB 1:2000
Flag M2	Maus	Sigma-Aldrich	WB 1:1000
GAPDH	Maus	Santa Cruz	WB 1:5000 IF 1:80
Histon H1	Kaninchen	Abcam	WB 1:1000
HR23B	Maus	BD Science	WB 1:500 IF 1:50
HR23B	Kaninchen	Abcam	WB 1:10000 IF 1:50
Hsp70	Maus	BD Science	WB 1:1000
LC3B	Kaninchen	Cell Signaling	WB 1:1000
Nucleolin	Kaninchen	Acam	IF 1:100
SQSTM1	Maus	Santa Cruz	WB 1:1000
Puromycin clone 12D10	Maus	Merck	WB 1:2000
Rad23B	Maus	Merck	WB 1:1000
Rad23B	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific	WB 1:500
Rad23B	Maus	Santa Cruz	WB 1:500
RPL5	Kaninchen	Abcam	IF 1:100 WB 1:1000
RPL5	Kaninchen	Invitrogen	WB 1:1000
Ubiquitin	Maus	Cell signaling	WB 1:1000

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
DyLight 649 GAR	Dianova	IF 1:500
FITC goat anti-mouse IgG (GAM)	Thermo Fisher Scientific	IF 1:500
FITC goat anti-rabbit IgG (GAR)	Thermo Fisher Scientific	IF 1:500
Hoechst	Sigma-Aldrich	IF 1:2000
Rabbit IgG Isotype Control	Invitrogen	IP
Mouse IgG Isotype Control	Invitrogen	IP
Maus TrueBlot®: Anti Maus IgG	Rockland	WB 1:5000
Ratte TrueBlot®: Anti Ratte IgG	Rockland	WB 1:5000

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Amersham Potran 0,45 NC Nitrocellulose Membran	GE Healthcare
Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Thermo Fisher Scientific
Eppendorf Tubes® 1.5 ml, 2ml	Sarstedt
Eppendorf Tubes® Safe Seal 1.5 m	Sarstedt
Falcon 15ml, 50 ml	Greiner bio-one
Kammerobjektträger 8 well	Thermo Fisher Scientific
Kanülen 27G x 3/4 nr 20	BD Biosciences
Magnetrührer, MR Hei-Mix L	Heidolph
Minisart® Syringe Filter 0.2 µm	Sartorius Stedim Biotech
Owl™ B2 Minigel-Elektrophoresesysteme	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen 5-300µl	Brand
Pipettenspitze Geltaschen 1-200µl	Sarstedt
Sapphire Microplatte 96-well, für PCR	Greiner Bio-One
Whatman Chromatography Paper 3 mm	GE Healthcare
Zellkultur Mikroplatte 96-well V-Boden	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche Cellstar® 50 ml, 25 cm ² (mit Filterverschluss)	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche Cellstar® 250 ml, 75 cm ² (mit Filterverschluss)	Greiner Bio-One
Zellkultur Schale Cellstar® 100 mm x 20 mm	Greiner Bio-One
Zellkultur Schale Cellstar® 145 mm x 20 mm	Greiner Bio-One
Zellschaber 25cm	Greiner bio-one

3.1.9 Geräte

Verwendung	Gerät	Hersteller
Blot Imager	Gel Doc XR+	Bio-Rad Laboratories
Drehrad	Tube Rotator L29	Labnico
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	C.B.S Scientific DCX-700	Thermo Fisher Scientific
Elektrophoresekammer für Western-Blot	C.B.S Scientific ECX-700	Thermo Fisher Scientific
Geldokumentations-Gerät	Gel Stick Touch Panel Imager	Intas Sciene Imaging Instruments GmbH
Heizblock	Thermoschüttler Pro	Thermo Fisher Scientific
Inkubator	Heraeus™ Hera Cells	Thermo Fisher Scientific
Magnetrührer	Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
	FB15001	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	Axiovert 100	Carl Zeiss AG
	Telaval 31	Carl Zeiss AG

PCR-Maschine	Mastercycler Gradient	Eppendorf AG
pH-Meter	HI2210	Hanna Instruments Inc.
Plate-Reader	Clariostar	BMG Labtech GmbH
qPCR-Maschine	iCycler iQ5	Bio-Rad Laboratories
Rollenmischer	RS-TR	Phoenix Instrument GmbH
Schüttler	Biometra Rocking Platform WT15	Analytika Jena AG
Spektralphotometer	Nanodrop 1000	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	AURA-2000 MAC	EUROCLONE S.p.A
Vortexmischer	MS-2	IKA Werke GmbH & Co.KG
	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage	MXX-2001	Satorius AG
	AC AC210 S	Satorius AG
Wasserbad	GFL 1003 Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Zellzähler	Countess™ Automated Cell Counter	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Hettich Universa 320	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
	Hettich Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
	Heraeus™ Biofuge Fresco	Thermo Fisher Scientific
	Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH

3.1.10 Software

Software	Hersteller
AxioVision Rel	Carl Zeiss
BD Accuri™ C6 Analysis Software	BD Biosciences
BioGRID Datenbank	TyersLab
Bio-Rad iQ5, version 2.0	Bio-Rad
Chemidoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
EndNote 20	Clarivate™
Image J, 1.52n	NIH
Image Lab, version 6.0.1	Bio-Rad
Microsoft Office 2020 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft
OriginPro 2019	OriginLab
Perseus (Version 1.6.13.)	Max-Planck-Institut für Biochemie
Reactome	Global Biodata Coalition, ELIXIR
STRING	Global Biodata Coalition, ELIXIR
Zen Pro	Carl Zeiss

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die adhären wachsenden humanen Osteosarkom-Epithelzellen (U2OS-Zellen) wurden bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ in Suspension kultiviert. Zur Anzucht wurde DMEM-Kulturmedium mit 10 % fötalem Rinderserum und 1 % Penicillin-Streptomycin verwendet. Die Dichte und Vitalität der Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop untersucht, woraufhin die Zellen alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:2 verdünnt und ausgesät wurden. Hierfür wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 ml Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin und 0,53 mM EDTA) von der Kulturflasche gelöst. Eine erneute Zugabe von 2,5 ml des Kulturmediums stoppte die Trypsin-Reaktion. Die Zellsuspension wurde steril in eine neue Kulturflasche überführt und mit Kulturmedium für einen neuen Zellzyklus kultiviert. Alle Zellen wurden routinemäßig auf Mykoplasmen getestet.

3.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung der mammalischen Zellen erfolgte mit dem automatischen Zellzähler: *Countess automated cell counter*. Dafür wurden die adhären U2OS-Zellen von der Zellkulturflasche gelöst und in eine Zellsuspension gebracht. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl 0,4 % Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter Berücksichtigung der Verdünnung konnten die genauen Zellzahlen für nachfolgende Experimente bestimmt werden.

3.2.1.3 Transfektion mammalischer Zellen

Für die Zelltransfektion wurde das Transfektionsreagenz *GeneJuice* verwendet. Während viele verfügbare Transfektionsreagenzien auf kationischen Lipidformulierungen basieren, besteht das *GeneJuice Transfection Reagent* aus einem ungiftigen Zellprotein und einer geringen Menge eines neuartigen Polyamins. Am Tag vor der Transfektion werden 1-3 x 10⁵ Zellen in eine 10-cm Petrischale ausgestrichen. Die Zellen sollten vor der Transfektion zu 50-80 % konfluent sein. Die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung von 10 µg DNA, 500 µl Opti-Mem und 20 µl *GeneJuice*. Die transfizierten Zellen wurden in einer 10 cm Petrischale bei 37°C (5 % CO₂) inkubiert und nach 24 h für weitere Analysen geerntet.

3.2.1.4 Kryokonservierung der Zellen

Für die langfristige Konservierung der verwendeten U2OS-Zellen ist es möglich, diese gemäß Abschnitt 3.2.2.1 zu ernten und für 3 min bei 500 x g zu zentrifugieren. Das sich

daraus ergebende Pellet wurde in 2 ml Kryomedium resuspendiert und danach in spezielle Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zunächst langsam auf -20 °C eingefroren, bevor sie dauerhaft bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert wurden.

3.2.1.5 Mikroskopie mittels Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung wird die Spezifität des Antikörpers für sein Antigen genutzt und durch einen Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht. Zunächst wurden 50.000 Zellen auf einen 8-Well-Kammerobjektträger kultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgte entweder mit 4 % PFA für 30 min oder Methanol (-20°C) für 10 min. Anschließend wurde die Zellmembran mit 0,5 % Triton X-100 (20 min) permeabilisiert. Nach Waschen mit 1 % BSA in PBS für 30 min und zweimal PBS (10 min) wurden die Zellen über Nacht mit anti-HR23B-Antikörper bzw. anti-IgG-Antikörper inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS erfolgte die Applikation des sekundären Antikörpers. FITC-Ziege-Anti-Maus (1:300) und Hoechst (1:2000) wurden für 2 h unter Lichtschutz in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Dako-Fluoreszenz-Eindeckmedium fixiert. Die Bilder wurden mit einem Axio Observers 7-Mikroskop und einem 20x-Objektiv aufgenommen. Primäre und sekundäre Antikörper wurden gleichzeitig für die simultane Co-Expressions-Immunfluoreszenzfärbung verwendet: HR23B (1:50) und RPL5 (1:100), Nucleolin (1:100) FITC und DyLight als Sekundärantikörper (1:500).

3.2.1.6 Tet-On System

Das Tet-On System basiert auf dem reversen Tetracyclin-gesteuerten Transaktivator, rtTA. rtTA ist ein Fusionsprotein, das aus dem reverser TetR-Repressor (rtetR) und der VP16-Transaktivierungsdomäne besteht. Durch eine Mutation von vier Aminosäuren in der DNA-Bindungsdomäne von Tet-Repressor Protein (TetR) wird die Bindungseigenschaft so verändert, dass es die tetO-Sequenz (Tet Operator Sequenz) im TRE-regulierten (Tet response element) Zieltransgen, nur in Gegenwart des Effektors Doxycyclin erkennt. Somit wird im Tet-On System die Transkription des TRE-regulierten Zielgens durch rtTA nur in Anwesenheit von Doxycyclin induziert. Das Tetracyclin-gesteuerte Genexpressionssysteme Tet-On wird zur Regulation der Genaktivität in eukaryotischen Zellen eingesetzt. Das Tet-On System ermöglicht die Aktivierung der Genexpression durch Doxycyclin (58, 59). Für die hier beschriebenen Experimente wurden Zelllinien benutzt, in die bereits ein Tet-On System eingebracht war. Zum einen wurde ein Tet-System in U2OS Zellen verwendet, welches für das Protein HR23B codiert. Zusätzlich diente eine weitere Zelllinie, die nur eine TRE-Region enthielt, als Kontrolle. Um eine Genaktivierung zu ermöglichen, wurden die ausgesäten Zelllinien mit Doxycyclin in einer Konzentration von 1:1000 behandelt und 24 h inkubiert.

Danach erfolgte die Proteinisolierung und der Nachweis der Genexpression mittels spezifischer Antikörper durch Western Blot.

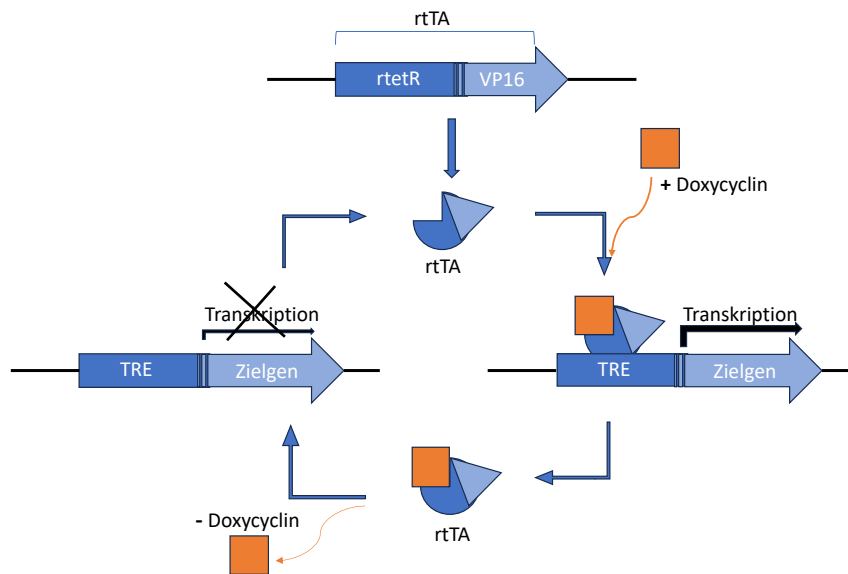


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Genregulation im Tet-On System

Der rTetR, ein reverser Tet-Repressor, entsteht durch vier Aminosäuren, die die Proteinreaktion auf Doxycyclin umkehren. Dadurch bindet rTetA an das TRE und aktiviert die Transkription in Gegenwart von Doxycyclin. Die Abbildung ist modifiziert nach dem „Tet-Off and Tet-On Gene Expression System User Manual“ von Clontech, (2012).

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Protein-Isolation

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 - 100 % kultiviert. Für die Proteinisolierung wurden die Zellen nach einem PBS-Waschschritt mit einem Zellschaber oder Trypsin-EDTA-Lösung geerntet und bei 500x g für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 2000x g für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einer definierten Menge in kaltem Lysepuffer resuspendiert. Es wurden verschiedene Lysepuffer verwendet, die unmittelbar vor der Lyse mit Proteasen und Inhibitoren versetzt wurden. Die Lösung wurde bei 4°C für 1 h auf einer rotierenden Scheibe inkubiert. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu erreichen, wurde die Lösung durch eine feine Nadel (27 G) gezogen und bei 4°C und 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues vorgekühltes Röhrchen überführt und die Proteinkonzentration gemessen. Alle Proteinlösungen wurden bei -20°C gelagert.

3.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test

Die Proteinkonzentration wurde gemäß Herstelleranweisung bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ mit dem Bicinchonsäure-Test (BCA) bestimmt. Hierfür wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet und eine Proteinstandardkurve mit verschiedenen Verdünnungen von

Rinderserumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 2 mg/ml erstellt. Die Verdünnungen wurden mit ddH₂O in den folgenden Konzentrationen ermittelt: 2,0; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25 und 0,125 mg/ml. Die Absorption der Proben und der Standardkurve wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen, wobei alle Messungen doppelt durchgeführt wurden.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, mit der Proteine anhand ihrer Molekülmasse und Ladung unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen aufgetrennt werden können (60). Das Trenngel enthält 10 % Acrylamid und das Sammelgel 4 % Acrylamid, wie in den Anweisungen angegeben. Die Zellysat-Proben wurden mit 2x Ladepuffer gemischt, um eine Konzentration von 1x Ladepuffer zu erreichen. Jede Probe enthielt gleiche Mengen an Proteinen (20 - 50 µg). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden alle Proben für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die sekundären und tertiären Strukturen der Proteine durch Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* als Standard verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 120-150 V und einer Laufzeit von 1-2 h im Laufpuffer, abhängig von der Größe der interessierenden Proteine. Nach der Trennung erfolgte das Immunoblotting.

3.2.2.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Hilfe der Western Blot Technik auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das sogenannte Wet-Blot-Verfahren angewandt, bei dem Gel und Membran vollständig in Transferpuffer eingetaucht werden. Durch Anlegen einer Spannung von 120 V für 1,5 h werden die Proteine auf die Membran übertragen. Die Temperatur des Transferpuffers wurde durch die Verwendung von Kühlakkus niedrig gehalten. Um die Proteine nach dem Transfer auf der Membran sichtbar zu machen, wurde diese für 1 min in Ponceaurot-Lösung geschwenkt und anschließend mit destilliertem Wasser entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Membran durch Inkubation in 5 % Milchpulver-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Membran wurde gewaschen (4 x 10 min in TBS) und anschließend mit dem Primärantikörper (in Milch) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag erfolgte nach erneutem Waschen (2 x 5 min in TBS) der Membran die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran ein letztes Mal gewaschen (3 x TBS für 10 min und 1 x TBS-T für 10 min). Der Nachweis der Zielproteine erfolgte mit *Amersham ECL Select Western Blotting Detection*

Reagent nach Herstellerangaben. Die Blots wurden für 2-120 s exponiert und mit dem ChemiDoc™MP Imaging System detektiert.

3.2.2.5 Kern-Zytoplasma-Trennung

In diesem Assay wurden verschiedene Lysepuffer verwendet, um nukleäre und zytoplasmatische Proteinfractionen zu trennen und die Verteilung von HR23B in diesen Kompartimenten zu analysieren. Es wurde auf Eis gearbeitet. U2OS-Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit zytosolischem Lysepuffer bei 4°C für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und in ein Eppendorf Tube überführt und 30 min bei 4°C auf einer rotierenden Scheibe inkubiert. Die Proben wurden 5 min bei 1.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Der Überstand stellt die zytoplasmatische Proteinfraction dar. Das verbleibende Pellet wurde mit eiskaltem TBS gewaschen, bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 60 µl Kernlysepuffer resuspendiert, mehrmals durch eine feine Nadel (27 G) gezogen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden beide Proben (zytosolische- und nukleäre Fraktion) im Ultraschallbad für 1 min beschallt (10 % Intensität, 5 Impulse über 10 s) und für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Eppendorf Tubes überführt. Für die Analyse im Western Blot wurde die Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay bestimmt.

3.2.2.6 Co-Immunpräzipitation

Für die Durchführung des Co-Immunpräzipitation-Assays wurden 5×10^6 U2OS-Zellen auf 15 cm Petrischalen ausgesät. Es wurden insgesamt 8 Ansätze vorbereitet, wobei vier davon mit SAHA vorbehandelt wurden. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Proteine mit einem Zellschaber und einem milden TNN-Lysepuffer isoliert. Die Proteinkonzentration wurde mittels des BCA-Proteinassays bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden bei 4°C für 3 h mit 8 µg anti-hHR23B-Antikörper (abcam) oder mit Kaninchen-IgG-Isotypkontrolle inkubiert und rotiert. Während dieser Zeit wurden durch wiederholtes Waschen mit PBS (2x) und TNN-Lysepuffer (2x) anti-Kaninchen-Ig-IP-Kügelchen hergestellt. Mehrere Zentrifugations- (7000 x g für 1 min) und Waschschriffe wurden ausgeführt, wobei der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert wurde. Gleiche Mengen an anti-Kaninchen-Ig-IP-Beads wurden in Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt und mit dem jeweiligen Proteinlysate versetzt, um die Immunpräzipitation mit dem Zielantikörper und der IgG-Kontrolle durchzuführen. Die Proben wurden wie folgt zusammengesetzt: 100 µl Protein A-Agarosekügelchen + 8 µg anti-hHR23B-Antikörper/IgG-Maus-Antikörper + 700 µl Lysat. Diese Mischungen wurde über Nacht bei 4°C auf einer

rotierenden Scheibe inkubiert. Daraufhin wurden die Proben bei 6000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand (Depletion) aufbewahrt. Die Proben wurden viermal mit TNN-Lysepuffer gewaschen und nach jedem Schritt bei 6000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Proteine durch Erhitzen (95°C) und Zugabe von 5 x Laemmli-Beladungspuffer eluiert. Die Proben wurden zweimal durchmischt, bei 13000 rpm zentrifugiert und die Überstände als IP aufbewahrt. Lysat-, Depletion- und IP-Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot mit anti-GAPDH-Antikörper (1:1000) und anti-HR23B-Antikörper (1:1000) untersucht. Als Sekundärantikörper wurden TrueBlot Ziege-anti-Maus- und Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper in einer Konzentration von 1:5000 verwendet.

3.2.2.7 Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/

Massenspektrometrie

Die Probenvorbereitung, die Massenspektrometrie (MS) und die Datenanalyse wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Alessandro Ori am Leibniz-Institut für Alternsforschung – Fritz-Lippmann-Institut e.V. durchgeführt. Die Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte der Test Proben und des zweiten Probenbatches sind im Anhang beschrieben.

3.2.2.8 Proteomanalyse durch Massenspektrometrie

Für die Datenprozessierung der Rohdaten, die Datenbanksuche und die Quantifizierung wurde Perseus (Version 1.6.14.0) benutzt. Die Rohdaten wurden hochgeladen und Datenmerkmale ausgewählt (LFQ intensity und iBAQ-Werte). Zusätzlich erfolgte das hochladen von „Annotations“ aus der UniProt-Datenbank, einschließlich Informationen zu *GOBP-name*, *GOMF-name*, *GOCC-name*, *GOBP slim name*, *GOCC slim name*, *KEGG-name*, *Pfam*, *GSEA (Gene set Enrichment Analysis)* und Schlüsselwörter. Falsche Proteinidentifikationen wurden aus dem Hauptdatensatz entfernt durch die Filterung nach „contaminants“ und „only identified by site“. Da der Bereich der Expressionswerte um mehr als das 10-fache variieren kann, wurden die Expressionswerte logarithmisch (Log2) transformiert. Die einzelnen Datensätze wurden je nach Bedingungen gruppiert und die Mindestzahl gültiger Werte auf 2 definiert. Gesucht wurde gegen die *H. sapiens* Proteombank. Anschließend konnten mehrere Scatter Plots erstellt werden. Durch Anwendung numerischer und Spalten-basierter Filter auf die Daten und Festlegung der Kriterien, dass das Verhältnis von HR23B zu IgG in beiden Experimenten größer oder gleich 0,58 ($x \geq 0,58$) sein soll, wurden deutlich angereicherte Proteine identifiziert. Zudem wurden Pathway-Anreicherungsanalyse unterschiedlich exprimierter Proteine mithilfe von GOCC-Namens-, STRING (Version 11.0)-, und Reactome-Analysen durchgeführt.

3.2.2.9 Puromycin-Inkorporation-Assay

Der Puromycin-Inkorporation-Assay ist eine nicht-radioaktive Methode zur Bestimmung der Translationsraten in Zellen. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit des Antibiotikums Puromycin zu tRNAs und seiner Funktion, in entstehende Ketten an den Ribosomen eingebaut zu werden. Dieser Prozess führt zur Beendigung der Elongation während der Translation. Daher kann die folgende Puromycin-Intensitätsanalyse im Zelllysate verwendet werden, um die Translationsrate der Zelle zu bestimmen (61). Für das Experiment wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen (mit etabliertem Tet-On System) auf 10 cm Petrischalen ausgesät. Die Zellen wurden 24 h bei 37°C und 5% CO₂ mit Doxycyclin (1:1000, 1 µg/ml) oder als Kontrolle mit DMSO inkubiert. Zur Ernte der Zellen wurden sie 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1 x Trypsin EDTA abgelöst. Die Zellen wurden anschließend mit derselben Menge Medium resuspendiert und bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert. Gleiche Zellzahlen ($1,5 \times 10^6$) wurden eingestellt. Gruppe 1 wurde weder mit Puromycin noch mit Cycloheximid behandelt, Gruppe 2 wurde mit Puromycin (10 µg/ml) für 10 min inkubiert und Gruppe 3 wurde für 30 min mit 250 µM Cycloheximid und anschließend mit Puromycin inkubiert. Es erfolgten die Zentrifugation bei 2000 g für 3min. Die Proben wurden mit warmem PBS (2x) gewaschen. Das resultierende Pellet wurde danach in bei - 80 °C für 15 min schockgefroren. Danach erfolgte die Zellyse und Proteinkonzentrationsbestimmung. Die Lysate wurden mittels Western-Blot-Analyse und anti-Puromycin-Antikörpern untersucht.

3.2.3 DNA-Analyse und Techniken

3.2.3.1 RNA-Isolation

Die Isolierung der RNA erfolgte aus Zellpellets unter Verwendung des Quick-RNA™ MiniPrep-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers. Dieses Kit basiert auf einer säulenbasierten Methode, die aus zwei Säulen und speziellen Puffersystemen besteht, einschließlich eines DNase-Verdau. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets in 300 µl Lysepuffer resuspendiert, welcher im Kit enthalten war. RNA wurde durch Elution unter Verwendung von 50 µl RNase-freiem Wasser isoliert. Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration der RNA wurden spektrophotometrische Messungen durchgeführt, indem die Absorption bei 230, 260 und 280 nm mit einem NanoDrop 2000 gemessen wurde.

3.2.3.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die qualitative und quantitative Bestimmung der DNA- und RNA-Proben erfolgte mit Hilfe der UV-Vis-Spektroskopie. Für die DNA/RNA-Analyse ist insbesondere die Absorption im

UV-Bereich von 260 nm Wellenlänge entscheidend. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht dabei ca. 50 µg/ml dsDNA. Eine Proteinkontamination (Absorptionsmaximum für Proteine bei 280nm) wurde anhand des Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} abgeschätzt. Reine DNA hat einen Quotienten von > 1,8, reine RNA von 2,0. Kontaminationen, insbesondere durch Proteine, reduzieren diese Werte (62).

3.2.3.3 Reverse Transkription

Für die Erstellung der komplementären DNA (cDNA) wurden 2 µg Gesamt-RNA mittels SuperScript™ II Reverse Transkriptase Kit revers transkribiert. Gemäß den Herstellerangaben wurden zunächst 2 µg RNA, 1 µl dNTPs (10mM) und 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ als Primer (0,5 µg/µl) gemischt und mit Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 65°C, erfolgte die Zugabe von 5 µl Puffer, 1 µl DTT und 1µl Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl). Die Lösung wurde anschließend für 2 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde 1 µl SuperScript™ II (200 U/µl) hinzugefügt. Zuletzt wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 42°C für 50 min und anschließendes Erhitzen auf 70°C für 15 min gestoppt.

3.2.3.4 Primer

Die Entwicklung der Primerpaare erfolgte durch Suche der entsprechenden Nukleotidsequenz in *Homo sapiens* über Pubmed, wobei die längste mRNA-Sequenz ausgewählt wurde. Mit Hilfe des "ORF-finder (*open reading frame*)"-Tools von NCBI wurde durch Eingabe der mRNA-Sequenz die Aminosäuresequenz ermittelt und mit der hinterlegten Aminosäuresequenz aus der UniProt-Datenbank verglichen. Bei Übereinstimmung wurden die Start- und Stoppssequenzen analysiert. Zur Vereinfachung der späteren Detektion wurde ein Flag-Tag mit einer Linkersequenz aus fünf Glycin-Aminosäuren integriert. Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme wurde auf mögliche Schnittstellen im Konstrukt geachtet. Anschließend wurden die Primer mit dem Online-Tool Primer Blast getestet und die erwartete Größe des Konstrukts bestimmt. Die entsprechenden Primer wurden von der Firma Eurofins Scientific SE (Luxemburg) synthetisiert. Eine Liste der Primer findet sich in Abschnitt 3.1.6 dieser Arbeit.

3.2.3.5 Polymerase Kettenreaktion

Für die Durchführung der Polymerase Kettenreaktion wurde der *DreamTaq PCR Master Mix* eingesetzt.

Folgender Ansatz wurde benutzt:

12,5 µl *DreamTaq PCR Master Mix*

1 µl Primer *forward* (10 µM)

1 µl Primer *reverse* (10 µM)

0,5 µl DMSO

9 µl H₂O

1 µl cDNA

25 µl Gesamtvolumen

Reaktionsschritte der PCR:

1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min	} 35 Zyklen
2. Denaturierung	95°C	30 s	
3. Primer- <i>Annealing</i>	55°C	30 s	
4. Elongation	72°C	2 min	
5. Finale Elongation	72°C	4 min	

3.2.3.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Größenauftrennung der PCR-Produkte wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Zur Herstellung des 1%-Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht und vollständig gelöst. Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid wurde die Lösung in die Gelkammer gegossen. Anschließend wurde die DNA-Probe mit 3 µl DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100V.

3.2.3.7 Restriktionsspaltung und Ligationsreaktion

Die mittels PCR amplifizierte DNA wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* gereinigt. Anschließend wurde die Reinheit der DNA mithilfe des Nanodrop-Geräts überprüft. Die aufgereinigten DNA-Konstrukte wurden zur Durchführung eines Restriktionsverdau verwendet.

Für den Restriktionsverdau und die Ligationsreaktion wurden die folgenden Ansätze vorbereitet:

Vektor	Konstrukt
2 µl pcDNA3	15 µl cDNA
1 µl Apa I	1 µl Apa I
1 µl Hind III	1 µl Hind III
2 µl Tango Buffer	2 µl Tango Buffer
14 µl PCR H ₂ O	1 µl PCR H ₂ O
<hr/>	
Gesamt 20 µl	

Die Mischungen wurden bei einer Temperatur von 37 °C für 1,5 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch eine 20-minütige Erhitzung bei 80 °C gestoppt. Nach einer Gel-elektrophoretischen Kontrolle wurden sowohl das Konstrukt als auch der Vektor unter UV-Licht ausgeschnitten und gereinigt. Die gereinigten Proben dienten als Basis für

die Ligation. Für die Ligationsreaktion wurden 6 µl Konstrukt, 2 µl Plasmid, 2 µl Puffer, 1 µl T4-Ligase und 9 µl H₂O kombiniert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Probe für 10 Minuten auf 65 °C erhitzt.

3.2.3.8 Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation von kompetenten *E. coli* wurde mittels der Hitzeschockmethode erreicht. Hierbei wurden 25 µl kompetenter Zellen mit 0,2 µg Plasmid-DNA (10 µl Konstrukt) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 50 Sekunden. Die Zellen wurden danach für 3 min auf Eis gestellt und in 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium (superoptimale Brühe mit Kataboliten) überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C für 60 min unter leichtem Schütteln. 50 µl der Lösung wurden auf Ampicillin-LB-Agarplatten aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3.9 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde entweder mit dem Mini-Präparationskit oder dem Maxi-Präparationskit für unterschiedliche DNA-Ausbeuten durchgeführt. Nach Auszählen der über Nacht gewachsenen Kolonien wurden zwei kompetente *E. coli*-Kolonien mit einem Zahnstocher ausgewählt und in 3 ml (Mini-Präparation) bzw. 200 ml (Maxi-Präparation) LB-Medium mit Ampicillin (100 mg/ml bei 37 °C) überführt und bei 300 rpm über Nacht inkubiert. Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde in ddH₂O verdünnt und die Konzentration mit einem Nanodrop-Spektrophotometer bestimmt. Für die Sequenzierung wurden 12 µl einer 80 ng/µl-Lösung verwendet und an *Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH* zur Sequenzierung geschickt.

3.2.3.10 Transfektion mammalischer Zellen

Für die Zelltransfektion wurde *GeneJuice* verwendet, ein Transfektionsreagenz bestehend aus einem ungiftigen Zellprotein und einem neuartigen Polyamin besteht. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einer 10-cm Petrischale ausgesät und sollten dabei eine Konfluenz von 50-80 % erreichen. Gemäß den Herstellerangaben wurden 10 µg DNA, 500 µl Opti-Mem und 20 µl *GeneJuice* verwendet. Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C (5 % CO₂) inkubiert und nach 24 Stunden für weitere Analysen geerntet.

4 Ergebnisse

4.1 Lokalisationsanalyse des endogenen HR23B in U2OS-Zellen

4.1.1 Expression von HR23B in U2OS-Zellen

Als Grundlage für die Untersuchungen des Proteasom-Shuttling-Faktors HR23B wurden humane Knochenosteosarkom-Zelllinien (U2OS) ausgewählt. U2OS-Zellen sind gut charakterisiert und dienen bereits als etabliertes Modell zur Untersuchung von HR23B (63). Zunächst wurde die Expression von HR23B in den verwendeten Zellen untersucht, indem unbehandelte U2OS-Zellen lysiert wurden. Anschließend erfolgte die Proteinisolation und Auftrennung mittels SDS-PAGE. Endogenes HR23B wurde mit einer Größe von 58 kDa im Western Blot nachgewiesen (siehe Abbildung 6). Die gleichmäßige Beladung der Geltaschen wurde durch Inkubation mit einem anti-Actin-Antikörper sichergestellt. U2OS-Zellen zeigten eine deutlich nachweisbare, endogene Expression von HR23B.

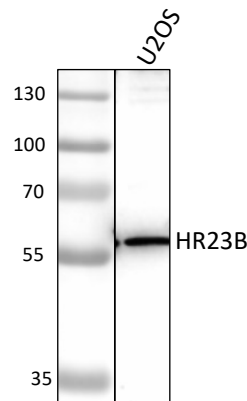


Abbildung 6: Nachweis von HR23B durch anti-HR23B-Antikörper (BD Science) in U2OS-Zellen durch Western Blot und IF-Färbung

U2OS-Zellen wurden lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot mit einem anti-HR23B-Antikörper durchgeführt. Endogenes HR23B mit einer Größe von 58 kDa wurde in den U2OS-Zellen detektiert.

4.1.2 Lokalisation von HR23B in U2OS-Zellen

Um die Funktion von HR23B sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu untersuchen, sollte das Vorkommen von HR23B in beiden Zellkompartimenten nachgewiesen werden. In der Literatur wird HR23B als nukleäres und zytoplasmatisches Protein beschrieben (64-66) (Uniprot-Datenbank). Daher wurde in den folgenden Experimenten die Lokalisation und Verteilung von HR23B in U2OS-Zellen untersucht. Für die vorliegende Lokalisationsstudie wurde HR23B mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) in U2OS-Zellen angefärbt und visualisiert. Die IF-Färbung von HR23B erfolgte mit zwei verschiedenen anti-HR23B-Antikörpern (BD Science und Abcam), wobei FITC jeweils als sekundärer Antikörper verwendet wurde, um die Färbung sichtbar zu machen. Parallel dazu wurde eine Kontrollfärbung mit einem anti-IgG-Antikörper durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Dapi/Hoechst-Kernfärbung (in blau dargestellt) durchgeführt.

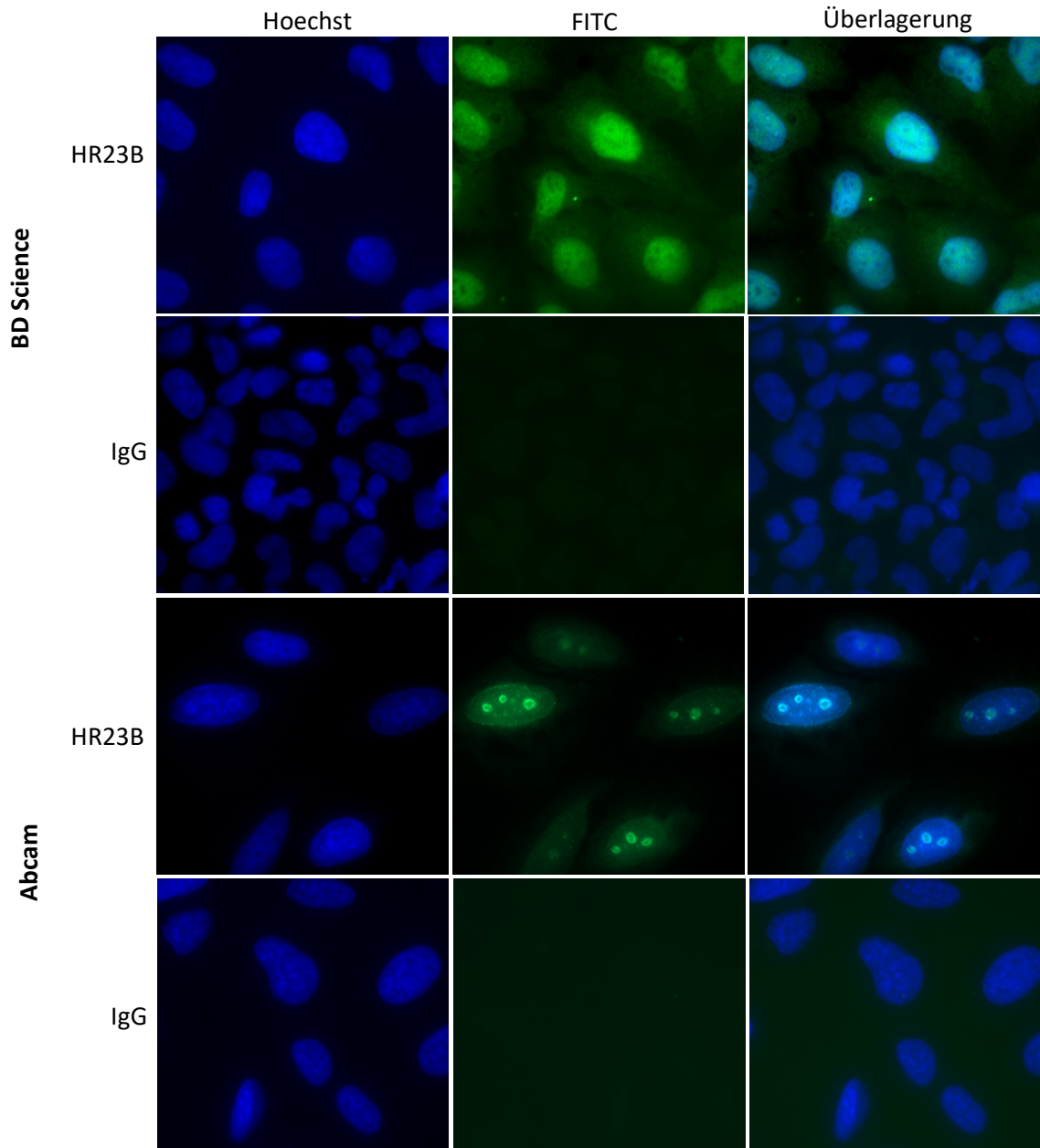


Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung mit anti-HR23B-Antikörper (BD Science/Abcam) und anti-IgG-Antikörper in U2OS-Zellen

IF-Färbungen von HR23B wurde unter Verwendung eines anti-HR23B-Antikörpers und FITC als sekundärem Antikörper (grün) durchgeführt. Dapi/Hoechst diente als Kernfärbung (blau). Als Kontrolle diente eine Färbung mit einem anti-IgG-Antikörper. Die ersten beiden Reihen sind unter Verwendung des anti-HR23B-Antikörpers der Firma BD Science, die letzte beiden Reihen sind mit dem Abcam Antikörper durchgeführt worden. Die IF-Färbungen zeigen HR23B im Kern. Der Abcam-Antikörper detektiert HR23B insbesondere in subnukleären Bereichen in U2OS-Zellen.

Abbildung 7 präsentiert die Ergebnisse. Die erste Reihe zeigt die Lokalisation von HR23B in beiden Zellkompartimenten unter Verwendung des ersten Antikörpers (BD Science). Dabei lässt sich ein vermehrtes Vorkommen von HR23B zugunsten des Zellkerns feststellen. Im Vergleich dazu zeigte der zweite anti-HR23B-Antikörper (Abcam) in Reihe 3 ein anderes Lokalisationsmuster von HR23B, das ausschließlich im Kern zu finden war. Zusätzlich zeigte sich eine spezifische Anordnung von HR23B in subnukleären Strukturen (Abbildung 7).

Zusammen bestätigen diese Ergebnisse, dass HR23B in beiden Kompartimenten, dem Zytoplasma und dem Zellkern vorkommt, im Zellkern insbesondere in subnukleären Bereichen. Die Anreicherung von HR23B in subnukleären Bereichen sollte durch IF-Doppelfärbungen mit einem nukleolären Protein bestätigt werden. Dies wurde unter Verwendung eines anti-Nucleolin-Antikörpers durchgeführt. Die IF-Doppelfärbungen erfolgten analog wie bereits beschrieben (der anti-HR23B-Antikörper in Verbindung mit FITC, welcher eine grüne Färbung ermöglichte und der anti-Nucleolin-Antikörper in Verbindung mit einem roten Fluoreszenzantikörper (Abbildung 8)). Die Ergebnisse zeigten eine Co-Lokalisation von HR23B und Nucleolin in den Zellen, was zu einer gelben Fluoreszenz führte. Diese Beobachtung legt nahe, dass HR23B im Nucleolus, und insbesondere im Nucleolus, lokalisiert ist.

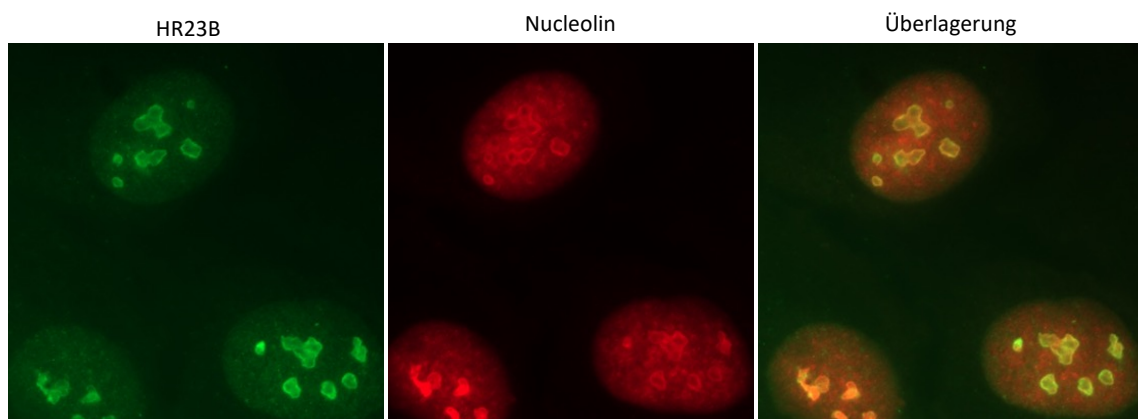


Abbildung 8: Co-Immunfluoreszenzfärbung mit anti-HR23B- und anti-Nucleolin-Antikörpern in U2OS-Zellen

Die IF-Färbung von HR23B erfolgte mit einem anti-HR23B-Antikörper und FITC als sekundären Antikörper (grün). Nucleolin wurde mit einem anti-Nucleolin-Antikörper und Dylight 649 (rot) gefärbt. Co-Lokalisationen von HR23B und Nucleolin im Bereich der Nucleoli erscheinen in gelb/orange.

4.1.3 Quantifizierung von HR23B im Kern und Zytoplasma

Zur Quantifizierung der HR23B-Menge in den verschiedenen Zellkompartimenten wurde eine Kern-Zytoplasma-Trennung mit anschließender Fraktionsanalyse durchgeführt. Abbildung 9 zeigt den Immunoblot dieser Analyse. Dabei konnte HR23B sowohl im Zytoplasma als auch in der Kernfraktion mit einer Größe von 58 kDa nachgewiesen werden. HR23B zeigte eine deutliche Anreicherung im Zytoplasma im Vergleich zur Kernfraktion. Diese beiden Fraktionen wurden als Kontrolle addiert und ergaben eine Gesamtsumme. Als Kontrolle für rein zytosolische Proteine wurde ein anti-Tubulin-Antikörper verwendet, während ein anti-Histon-Antikörper als Positivkontrolle für intranukleäre Proteine diente. Tubulin konnte sowohl in der zytoplasmatischen Fraktion, sowie im Gesamtteil bei 50 kDa detektiert werden. In der Kernfraktion war eine zu erwartende deutliche Bande für Histone bei 21 kDa zu sehen, während die Gesamtfraktion, die eine ähnlich starke Bande aufweisen

sollte, lediglich eine schwache Bande aufwies. Die quantitative Verteilung von HR23B in den jeweiligen Zellkompartimenten wurde in weiteren Experimenten (Kern-Zytoplasma-Trennung) durch Mitglieder der Arbeitsgruppe bestätigt. Insgesamt zeigte die quantitative Analyse, dass die Verteilung von HR23B im Vergleich zur Kernfraktion zugunsten des Zytoplasmas angereichert ist.

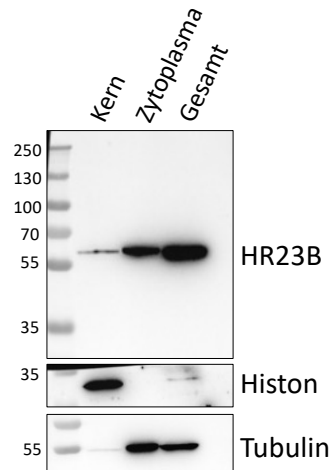


Abbildung 9: Western Blot Analyse der Kern-Zytoplasma-Trennung von HR23B in U2OS-Zellen
 Nach der Kern-Zytoplasma-Trennung wurden die Proteine isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot dargestellt. Mittels eines anti-HR23B-Antikörpers wurde HR23B im Zytoplasma und im Kern bei 58 kDa nachgewiesen. Beide Fraktionen addieren sich als Kontrolle zu einer Summe (Gesamt). Zur Darstellung der Kernproteine wurde ein anti-Histon-Antikörper verwendet, welcher bei 20 kDa detektiert wurde. Für die Darstellung der zytoplasmatischen Proteine wurde ein anti-Tubulin-Antikörper (50 kDa) verwendet.

4.2 Einfluss von Hyperacetylierung auf HR23B

Posttranslationale Modifikationen, wie Acetylierung und Ubiquitinierung, binden an freie Lysinreste und stehen in Konkurrenz zueinander. Das Ziel der folgenden Experimente war es, zu untersuchen, wie die Verdrängung der Ubiquitinierung durch Acetylierung das Vorkommen von HR23B in der Zelle beeinflusst. Um den Einfluss von Hyperacetylierung auf HR23B zu untersuchen, wurden die Zellen mit SAHA behandelt, einem Histondeacetylase-Inhibitor (HDACi), der zu einer erhöhten Acetylierung innerhalb der Zelle führte. Untersucht wurde der Einfluss einer 24-stündigen Behandlung mit 5 μ M SAHA auf die Expression von endogenem HR23B im Vergleich zu unbehandelten U2OS-Zellen. Anschließend wurden die Proteine isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für den Nachweis einer allgemeinen Hyperacetylierung der Zelle unter SAHA-Behandlung wurde ein Antikörper verwendet, der an alle acetylierten Reste von Proteinen bindet. Dadurch entstanden zahlreiche unterschiedliche Banden im Immunoblot, welche die Hyperacetylierung unter SAHA bestätigten. Zusätzlich wurde HR23B mit einem anti-HR23B-Antikörper dargestellt. Abbildung 10 zeigt den Vergleich der Bandendichte von HR23B in U2OS-Zellen mit und ohne SAHA-Behandlung. Hierbei konnte eine Dichteabnahme der HR23B-Bande in Zellen mit

SAHA-Behandlung bei 58 kDa festgestellt werden. Als Ladekontrolle diente Actin. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Behandlung mit SAHA zu einer Abnahme der HR23B-Expression in der Zelle führte. In nachfolgenden Experimenten sollte der Einfluss von Hyperacetylierung auf das Bindungspartnerprofil von HR23B durch Co-IPs untersucht werden.

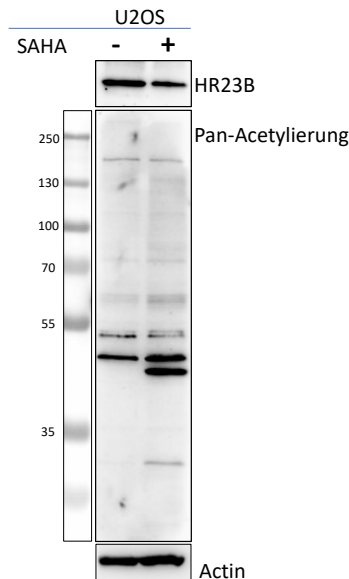


Abbildung 10: Western Blot Analyse mit anti-HR23B- und anti-Pan-Acetylierung-Antikörper in U2OS-Zellen mit und ohne SAHA-Behandlung

U2OS-Zellen wurden für 24 h in Medium mit 5 μ M SAHA sowie als Kontrolle mit H₂O inkubiert. Danach erfolgte die Isolation der Proteine, ihre Trennung mittels SDS-PAGE und die Darstellung im Western Blot. Dabei wurde ein anti-HR23B-Antikörper zur Darstellung von endogenem HR23B verwendet. Ein anti-Pan-Acetylierung-Antikörper, der an Acetylreste von Proteinen bindet, bestätigte die Hyperacetylierung der Zelle. Als Ladekontrolle wurde eine Inkubation mit einem anti-Actin-Antikörper durchgeführt.

4.3 Co-Immunpräzipitation identifiziert bekannte und neue Bindungspartner von HR23B

4.3.1 Identifizierung von HR23B als Zielprotein (Vorversuch)

Im folgenden sollten HR23B-Bindungspartner identifiziert und klassifiziert werden. Eine Methode um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, ist die Anreicherung eines Zielproteins (HR23B) und dessen Interaktionspartner mittels Co-Immunpräzipitation (Co-IP). Im Rahmen von Optimierungsschritten während der Co-IP zeigten Protein-A-Agarose-Beads die beste Extraktion von HR23B mit gebundenen Partnerproteinen, weshalb damit anschließende Vorversuche durchgeführt wurden. Neben der Co-IP mit Anreicherung des Zielproteins durch anti-HR23B-Antikörper, wurde eine Kontrollprobe mit IgG durchgeführt. Diese erlaubte die Unterscheidung von spezifisch und unspezifischen Bindungen. Zwei biologische Replikate wurden durchgeführt. Die Analyse der HR23B-Bindungspartner erfolgte anschließend massenspektrometrisch mittels Matrix-Assistierter Laser-Desorption-Ionisierung in Kombination mit der Flugzeitanalyse (engl.: time of flight/TOF)

(MALDI-TOF-Massenspektrometrie). Diese Analyse wurde in der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Dr. Alessandro Ori in Jena am Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz-Lippmann-Institut e.V. durchgeführt. Für die Datenprozessierung der Rohdaten, die Datenbanksuche und die Quantifizierung wurde Perseus verwendet. In der massenspektrometrischen Analyse konnte in beiden Co-IP-Proben endogenes HR23B in hohen Mengen nachgewiesen und als das Zielprotein identifiziert werden. Für die absolute Proteinquantifizierung wurden die iBAQ-Werte (*intensity Based Absolute Quantitation*) verwendet. Bei dieser Quantifizierung werden die summierten Peptidintensitäten für jedes Protein durch die Anzahl der theoretisch möglichen Peptide geteilt (67). Durch diese Normalisierung bleibt der iBAQ, im Vergleich zu den summierten Peptidintensitäten, von der Proteingröße unbeeinflusst.

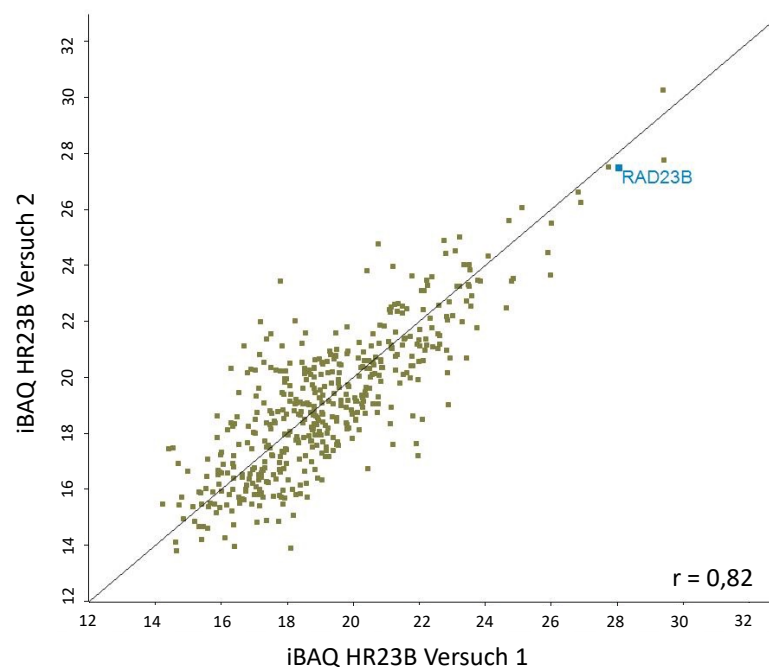


Abbildung 11: Scatter-Plot zur Verteilung der identifizierten Interaktionspartner zweier Replikate im Rahmen der Co-IP-Vorversuche

Es wurden Co-IPs mit anti-HR23B-Antikörper und anti-IgG-Antikörper als Kontrolle durchgeführt. Die anschließende massenspektrometrische Analyse listet alle quantifizierten Proteine der HR23B-IP-Probe zweier Replikate und deren Verteilung auf. Die Expressionswerte wurden logarithmisch (Log2) transformiert. Zum Vergleich beider Replikate wurden die iBAQ-Werte aus der HR23B-IP-Probe bestimmt und beide Replikate in einem Scatter-Plot dargestellt. In beiden Proben wurde HR23B in hohen Mengen detektiert und als blau markiertes Zielprotein bestätigt.

Die vorliegende Abbildung 11 präsentiert die identifizierten Bindungspartner aus den beiden unabhängigen Co-IP Vorexperimenten. Die iBAQ-Werte der mittels Co-IP angereicherten Proteine wurden erfasst, logarithmisch (Log2) transformiert und in einem Scatter Plot dargestellt. Versuch 1 ist entlang der x-Achse und Versuch 2 entlang der y-Achse aufgetragen. Das spezifische Zielprotein des verwendeten Antikörpers ist HR23B. In beiden

Experimenten konnte HR23B (Rad23B) in hoher Menge detektiert werden, was die Spezifität des IP-Verfahrens bestätigte und HR23B als das Zielprotein definierte (in blau markiert). Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde verwendet, um den linearen Zusammenhang zu untersuchen. Die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten für beide Replikate ergab eine starke positive Korrelation ($r = 0,84$). Im Rahmen dieser Vorstudie wurde sichergestellt, dass Co-IP Experimente mit endogenem HR23B in U2OS-Zellen durchgeführt werden können.

4.3.2 Signalweg-Analyse „DNA-Reparatur“

Für die Interpretation der Ergebnisse schlossen sich an die Co-IP und massenspektrometrische Analyse Signalweg-Analysen an. Zur Identifikation struktureller Zusammenhänge zwischen den mittels Massenspektrometrie ermittelten Proteinen wurden Anreicherungsanalysen durchgeführt. Hierfür wurde die Software Perseus verwendet und auf die Datenbanken von *Gene Ontology* (GO), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) zurückgegriffen. Die gefundenen Bindungspartner aus den Signalweg-Analysen wurden mit bekannten HR23B-Bindungspartnern aus der BioGRID-Datenbank verglichen. Die BioGRID (*Biological General Repository for Interaction Datasets*, thebiogrid.org) ist eine Open-Access-Datenbank, welche Informationen über Protein- und genetische Interaktionen bereitstellt.

Tabelle 1: Ergebnisse der Signalweg-Analyse „DNA-Reparatur“ für HR23B-Interaktionspartner

Protein Name	Gen
DNA repair protein XRCC4	XRCC4
UV excision repair protein RAD23 homolog A	RAD23A
DNA repair protein complementing XP-C cells	XPC
DNA mismatch repair protein Mlh1	MLH1
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	POLR1A
Translationally-controlled tumor protein	TPT1

Tabelle 1 enthält eine Auflistung der Proteine, die unter der Signalweg-Analyse „DNA-Reparatur“ mittels MALDI-TOF-MS identifiziert wurden. Die Namen der Interaktoren sowie deren jeweilige Gene sind aufgeführt. Darunter befindet sich das XPC-Protein, für welches bereits eine Interaktion mit HR23B in Hefen beschrieben wurde. Als ein Schlüsselfaktor in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist es an der primären Erkennung von DNA-Schäden beteiligt (68, 69). Außerdem wurde das Protein Rad23A als Bindungspartner identifiziert. Rad23A spielt in Verbindung mit Rad23B ebenfalls eine überlappende Rolle in der NER (70). Gemäß der Beschreibung in der BioGRID-Datenbank wurde eine Interaktion zwischen den

Proteinen MLH1 und HR23B detektiert und bestätigt. In der BioGRID-Datenbank wurde XRCC1 als Interaktionspartner von HR23B angegeben wurde, welches an der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen beteiligt ist (71). Durch Massenspektrometrie konnte jedoch XRCC4 als Bindungspartner identifiziert werden. Dieses ist an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt (72). Ferner wurde POLR1A als neuer Bindungspartner beschrieben. Zusammen konnte die Funktion von HR23B in der NER über die gefundenen Interaktionspartner validiert werden.

4.3.3 Signalweg-Analyse „Proteasom“

Weiterhin wurde eine Untersuchung der Interaktionspartner von HR23B in der Proteinqualitätskontrolle durchgeführt. Abbildung 12 zeigt einen Scatter Plot mit den Ergebnissen beider Replikate unter der Signalweg-Analyse „Proteasom“. Die identifizierten Bindungspartner unter dieser Signalweg-Analyse sind in Blau dargestellt. Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse mit Proteinnamen und Genen findet sich in Tabelle 2.

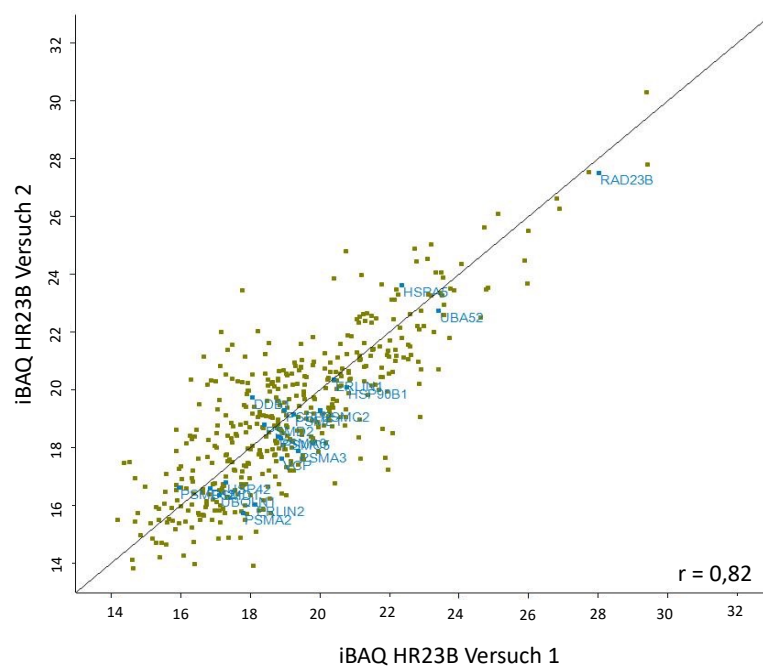


Abbildung 12: Scatter Plot der Signalweg-Analyse „Proteasom“ von HR23B-Interaktionspartnern

Die log₂-transformierten iBAQ-Werte sämtlicher gefundener Interaktionspartner der HR23B-IP-Probe wurden mittels Massenspektrometrie ermittelt. Die HR23B-Interaktoren mit dem KEGG-Namen „Proteasom“ wurden anhand der KEGG-Analyse identifiziert und blau markiert.

Gemäß der BioGRID-Datenbank konnten als etablierte Interaktoren Untereinheiten des Proteasoms wie PSMD12, PSMA2, PSMA3, PSMC2, PSMA6, PSMC5, PSMD2 und PSMD1 identifiziert werden. Zudem konnten UBQLN1 und UBQLN2 extrahiert werden, welche wie HR23B ubiquitinierte und fehlgefaltete Proteine erkennen und zum Proteasom transportieren. In der Literatur werden diese ebenfalls als Proteasom-Shuttling-Faktoren

beschrieben (73). Die Anwendung der „PQC“-Signalweganalyse ergab ferner die Identifikation von UBA6 und UBAS2 als Interaktionspartner. Über UBA-Domänen wird die Erkennung ubiquitiniertes Proteine durch HR23B vermittelt. Die Identifizierung von bereits bekannten Bindungspartnern in der Massenspektrometrie bestätigt die Spezifität des angewendeten Co-IP-Verfahrens mit endogenem HR23B aus U2OS-Zellen.

Tabelle 2: Ergebnisse der Signalweg-Analyse „Proteasom“ für HR23B-Interaktionspartner

Protein Name	Gen Name
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	PSMD12
Erlin-1	ERLIN1
Erlin-2	ERLIN2
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40; Ubiquitin; 60S ribosomal protein L40; Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a; Ubiquitin; 40S ribosomal protein S27a; Polyubiquitin-B; Ubiquitin; Polyubiquitin-C; Ubiquitin	UBA52; RPS27A; UBB;UBC
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5
Endoplasmin	HSP90B1
Proteasome subunit alpha type-2	PSMA2
Proteasome subunit alpha type-3	PSMA3
26S protease regulatory subunit 7	PSMC2
UV excision repair protein RAD23 homolog B	RAD23B
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP
Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6
26S protease regulatory subunit 8	PSMC5
Proteasome activator complex subunit 1	PSME1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	PSMD2
Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2
DNA damage-binding protein 1	DDB1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	PSMD1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 42	USP42
Ubiquilin-1; Ubiquilin-2	UBQLN1; UBQLN2

4.3.4 Signalweg-Analyse „Protein Faltung“

Im Rahmen der Signalweganalyse "Proteinfaltung" wurde ein Scatter Plot erstellt, der die identifizierten Proteine in blau darstellt (Abbildung 13). Diese Proteine sind in der nebenstehenden Tabelle aufgelistet. Während der Analyse wurden Interaktionen mit Chaperonen festgestellt. Neben den bereits bekannten Interaktionen von HR23B mit HSP90AB1 und HSPA8, wie sie in der BioGRID-Datenbank beschrieben sind, wurden weitere Interaktionen mit Chaperonen entdeckt. In der Probe wurden die Untereinheiten CCT6A, CCT5, CCT8, CCT2 und CCT7 des CCT (*Chaperonin containin tailless complex polypeptide 1*), auch bekannt als TRiC (*tailless complex polypeptide 1 ring complex*), gefunden. In der wissenschaftlichen Literatur wird das eukaryotische Chaperonin TRiC als essentieller Proteinkomplex beschrieben, der die Proteinfaltung unterstützt und die Aggregation von etwa 10 % des Proteoms verhindert (74). Darüber hinaus wurden neue Verbindungen zwischen HR23B und anderen Chaperonen nachgewiesen, insbesondere mit den Hitzeschockproteinen (engl.: *Heat-shock-Proteins*, HSP). Zu diesen gehören HSP90A1, HSPD1, HSPA5, HSP90B1, HSPA6, HSPA7, HSPA9 und HSPE1.

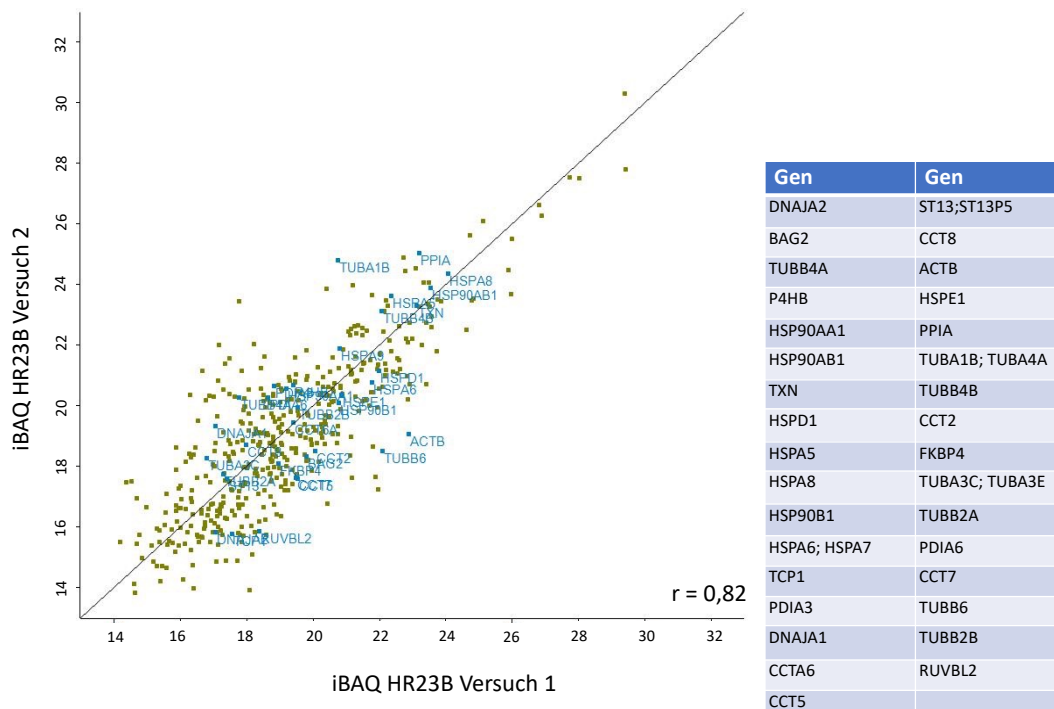


Abbildung 13: Scatter Plot der Signalweg-Analyse „Proteinfaltung“ von HR23B-Interaktionspartnern

Die log₂-transformierten iBAQ-Werte sämtlicher gefundener Interaktionspartner der HR23B-IP-Probe wurden durch Massenspektrometrie ermittelt. Die HR23B-Interaktoren mit dem KEGG-Namen „Proteinfaltung“ wurden anhand der KEGG-Analyse identifiziert und in blau markiert. Die einzelnen Gene der mittels Signalweg-Analyse gefundenen HR23B-Bindungspartner sind in der nebenstehenden Tabelle aufgelistet.

4.3.5 Signalweg-Analyse „Nukleolus“

Aufgrund der beobachteten Anordnung von HR23B in subnukleären Strukturen in der IF-Mikroskopie, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen HR23B und potentiellen nukleolären Bindungspartnern untersucht. Durch die Auswertung der Signalweg-Analyse „Nukleolus“ konnten Interaktionspartner in Verbindung mit dem Ribosom, wie RSP19, RPL3, RPL11 identifiziert werden.

Tabelle 3: Ergebnisse der Signalweg-Analyse „Nukleolus“ für HR23B-Interaktionspartner

Protein Name	Gen
Nucleophosmin	NPM1
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1
DNA topoisomerase 1	TOP1
Nucleolin	NCL
Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1
40S ribosomal protein S19	RPS19
60S ribosomal protein L3	RPL3
60S ribosomal protein L11	RPL11
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1
tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	NSUN2
Gamma-interferon-inducible protein 16	IFI16
ATP-dependent RNA helicase DDX24	DDX24
Signal recognition particle subunit SRP68	SRP68

Die Proteine, die in der Signalweganalyse gefunden wurden (blau dargestellt), sind in Abbildung 14 als Scatter Plot der beiden biologischen Replikate abgebildet. Eine Auflistung der identifizierten Proteine findet sich in Tabelle 3. Zudem konnten Nucleolin (NCL) und Nucleophosmin (NPM1) als Interaktionspartner gefunden werden. Dies bestätigt das gemeinsame Vorkommen von Nucleolin und HR23B im Nukleolus, welches in der IF-Mikroskopie gesehen worden ist.

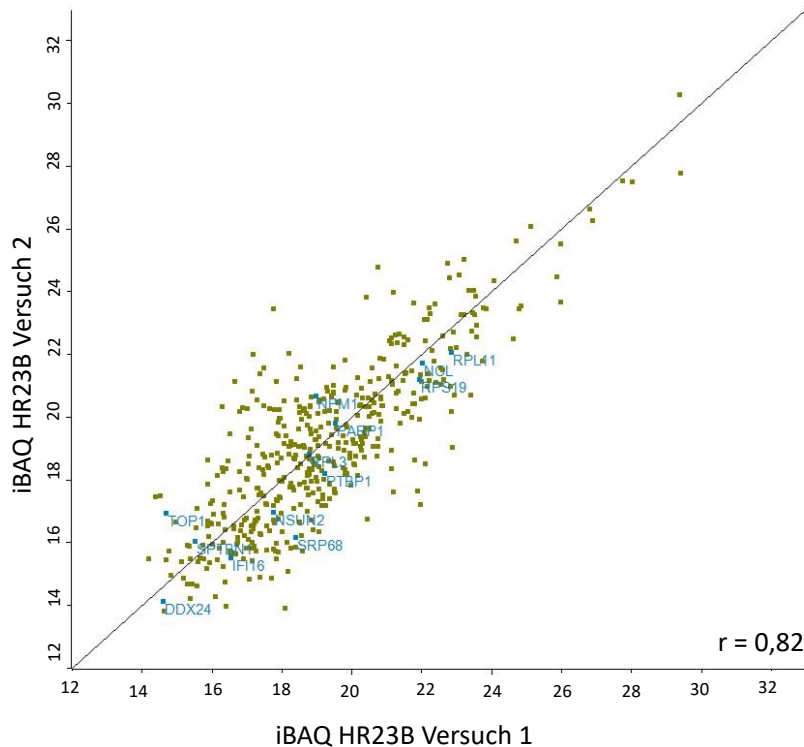


Abbildung 14: Scatter Plot der gefundenen Interaktionspartner von HR23B mittels Signalweg Analyse „Nukleolus“

Die log₂-transformierten iBAQ-Werte sämtlicher gefundener Interaktionspartner der HR23B-IP-Probe wurden durch Massenspektrometrie ermittelt. Die HR23B-Interaktoren mit dem KEGG-Namen „Nukleolus“ wurden anhand der KEGG-Analyse identifiziert und in blau markiert.

In der bisherigen wissenschaftlichen Literatur wurde keine Verbindung zwischen HR23B und ribosomalen Proteinen beschrieben. Es erfolgte eine Reactome-Analyse mit dem Stichwort „RNA-Verarbeitung/ *RNA processing*“, um mögliche Interaktionen zwischen HR23B und ribosomalen Proteinen zu untersuchen (siehe Abbildung 15). Reactome ist eine freie, *Open-source* und *peer-reviewed* Pathway-Datenbank. Über die Bereitstellung von Bioinformatik-Tools kann das Pathway-Wissen visualisiert, interpretiert und analysiert werden. Die Proteine, welche durch die Massenspektrometrie als Interaktionspartner von HR23B identifiziert wurden, sind in violetter Farbe markiert. Dabei zeigt sich, dass HR23B-Bindungspartner vermehrt mit der Biogenese der kleinen ribosomalen Untereinheit (*Small Subunit (SSU)*) in Zusammenhang stehen. Dies wird in der Abbildung unter dem Stichwort „*SSU processome*“ auf verschiedenen Ebenen der rRNA-Prozessierung dargestellt und violett markiert. Im Nukleoplasma wurden ribosomale Proteine der kleinen Untereinheit, darunter

RPS11, RPS8, RPS2, RPS3A, RPS5, RPS14, RPS15A, RPS23 und RPS16, als Bindungspartner von HR23B identifiziert. Im Zytoplasma wurden Bestandteile des 40S- und 60S-ribosomalen Komplexes als Bindungspartner von HR23B identifiziert. Insbesondere im Zellkern lokalisierte ribosomale Proteine wurden als Bindungsproteine von HR23B gefunden und violett markiert. Zusammenfassend konnten insbesondere nukleäre ribosomale Proteine als Bindungspartner von HR23B identifiziert werden.

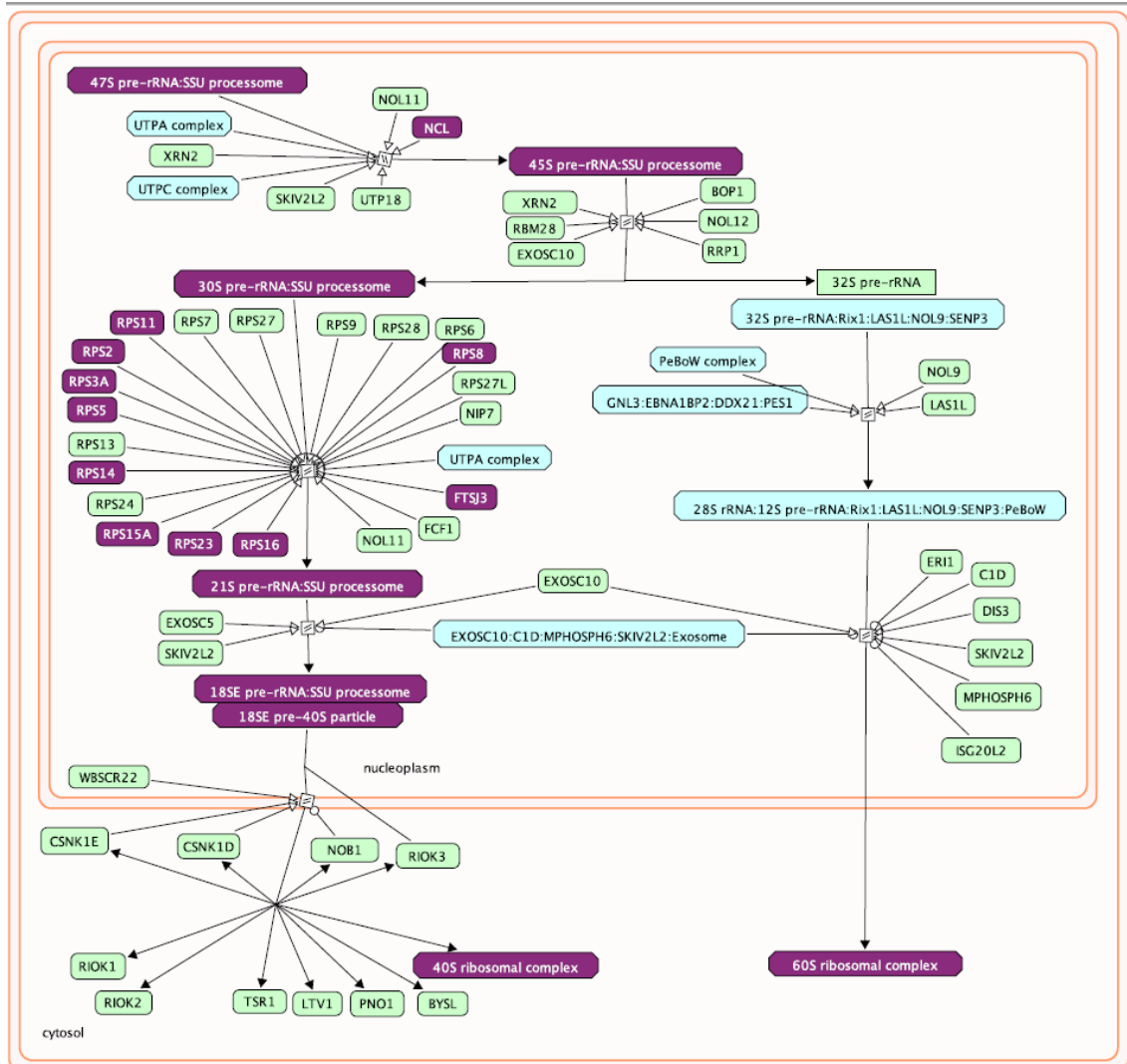


Abbildung 15: Reactome-Analyse zu „RNA-Verarbeitung/RNA processing“ mit HR23B-Interaktionspartnern

Es wurde eine Reactome-Analyse mit den Bindungspartnern von HR23B aus der Massenspektrometrie unter dem Stichwort „RNA-Verarbeitung/ RNA processing“ durchgeführt. Gefundene HR23B-Interaktionspartner sind violett markiert. Zusätzlich sind die subzellulären Lokalisationen der Proteine in der Zelle sowie ihre Interaktionen mit anderen Bindungspartnern dargestellt.

Die Analyse des Signalweges in Perseus unter dem Stichwort „rRNA-Prozessierung“ sollte weitere ribosomale Proteine als Bindungspartner von HR23B identifizieren. In Tabelle 4 werden die gefundenen Bindungspartner aufgelistet. Dazu gehören auch ribosomale Proteine der kleinen Untereinheit wie RPSA, RPS19, RPS8, RPS16 und RPS14. Zusätzlich

konnten RPL35A, RPL5 und RPL11 als ribosomale Proteine der großen Untereinheit identifiziert werden.

Tabelle 4: Ergebnisse der Signalweg-Analyse „rRNA-Prozessierung“ für HR23B-Interaktionspartner

Protein Name	Gen
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	SART1
40S ribosomal protein SA	RPSA
60S ribosomal protein L35a	RPL35A
Eukaryotic initiation factor 4A-III	EIF4A3
40S ribosomal protein S19	RPS19
60S ribosomal protein L5	RPL5
40S ribosomal protein S8	RPS8
40S ribosomal protein S16	RPS16
40S ribosomal protein S14	RPS14
60S ribosomal protein L11	RPL11
pre-rRNA processing protein FTSJ3	FTSJ3
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1	GAR1
Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4
WW domain-binding protein 11	WBP11

4.4 Analyse von HR23B-Interaktionspartnern

Für das Hauptexperiment der Co-IP wurde die Zellzahl hochskaliert, um eine große Menge an gereinigtem endogenem HR23B mit gebundenen Interaktionspartnern zu extrahieren. Das vorrangige Ziel bestand in der Bestätigung der Interaktion zwischen HR23B und ribosomalen Proteinen. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie die Behandlung mit SAHA und die damit einhergehende Hyperacetylierung das Substratprofil von HR23B beeinflusst. Vorherige Ergebnisse konnten zeigen, dass die Konzentration von HR23B unter SAHA-Behandlung in der Zelle abnimmt. Die vorliegenden Ergebnisse umfassen zwei experimentelle Ansätze: einen mit unbehandelten U2OS-Zellen und einen mit U2OS-Zellen, die über einen Zeitraum von 24 h mit SAHA behandelt wurden. Mit beiden Ansätzen wurde eine Co-IP durchgeführt und die Bindungspartner massenspektrometrisch analysiert. Abbildung 16 zeigt einen repräsentativen Western Blot der Co-IP mit anti-HR23B-, und anti-IgG-Antikörper. Der Vergleich der Proteinbanden im Lysat mit und ohne SAHA-Behandlung bestätigt die Abnahme der HR23B-Expression unter SAHA. Zusätzlich zeigten die IP-Proben mit anti-HR23B-Antikörper im Vergleich zu anti-IgG-Antikörper eine hohe Anreicherung von HR23B. Dies bestätigte die erfolgreiche IP-Extraktion von endogenem HR23B aus U2OS-Zellen. Infolgedessen nahm der Anteil von HR23B in der Depletion der anti-HR23B-Proben ab. In den entsprechenden Kontroll-IPs (anti-IgG-Antikörper) erfolgte keine Extraktion von HR23B, wodurch die Dichtebanden in der Depletion stärker detektiert werden konnten. Anti-GAPDH-Antikörper wurde als Ladekontrolle genutzt. Ausgehend vom Immunoblot kann auf eine erfolgreiche IP-Extraktion von endogenem HR23B aus U2OS-Zellen

geschlossen werden. Die folgenden Experimente wurden in 3 technischen Replikaten durchgeführt und ein repräsentativer Immunoblot ist dargestellt. Das Substratprofil von HR23B unter Hyperacetylierung durch SAHA wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter ausgewertet.

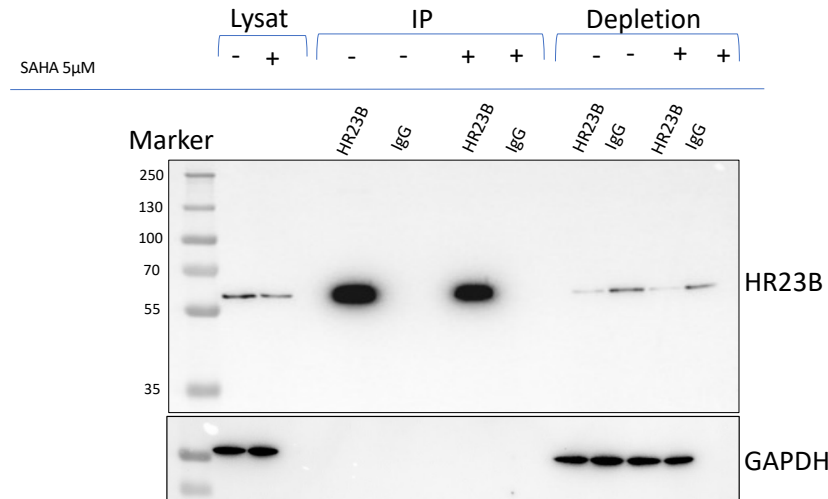


Abbildung 16: Western Blot Analyse der Co-IP mit anti-HR23B und anti-IgG

Es wurden zwei experimentelle Ansätze vorbereitet: U2OS-Zellen wurden aufgeteilt und eine Gruppe für 24 h mit 5 µM SAHA inkubiert. Anschließend erfolgten Co-IP Experimente mit anti-HR23B- und als Kontrolle anti-IgG-Antikörper. Das Lysat, die IP und die Depletion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot dargestellt. Ein anti-HR23B-Antikörper detektierte HR23B bei 58 kDa im Lysat, in der HR23B-IP und in allen Depletionen. Zur Kontrolle und zum Ausschluss unspezifischer Bindungen wurde eine IgG-IP durchgeführt. Der anti-GAPDH-Antikörper diente zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Beladung.

4.4.1 Identifizierung von HR23B als Zielprotein

Für weitere Analysen wurden aus den insgesamt drei biologischen Replikaten Versuch 1 und Versuch 3 ausgewählt, da sie als repräsentativ für die Gesamtstichprobe betrachtet wurden. Diese beiden Versuche bildeten die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen und Analysen. Zunächst erfolgte die Analyse der IP-Proben ohne SAHA-Behandlung. Für die Datenprozessierung der Rohdaten, die Datenbanksuche und die Quantifizierung wurde Perseus benutzt (siehe 3.2.2.8). Die Massenspektrometriedaten wurden auf Kontaminanten gefiltert und das log₂-Proteinverhältnis ermittelt. Die iBAQ-Werte von HR23B im Vergleich zu IgG wurden verwendet und das Verhältnis (Ratio) von HR23B zu IgG gebildet. Abbildung 17 zeigt den Scatter Plot aller Interaktionspartner, die mittels anti-HR23B-Antikörper IP-Extraktion aus zwei biologischen Replikaten identifiziert wurden, im Vergleich zu IgG. Der berechnete Pearson-Korrelationskoeffizient betrug 0,51. Das Zielprotein HR23B ist rot markiert.

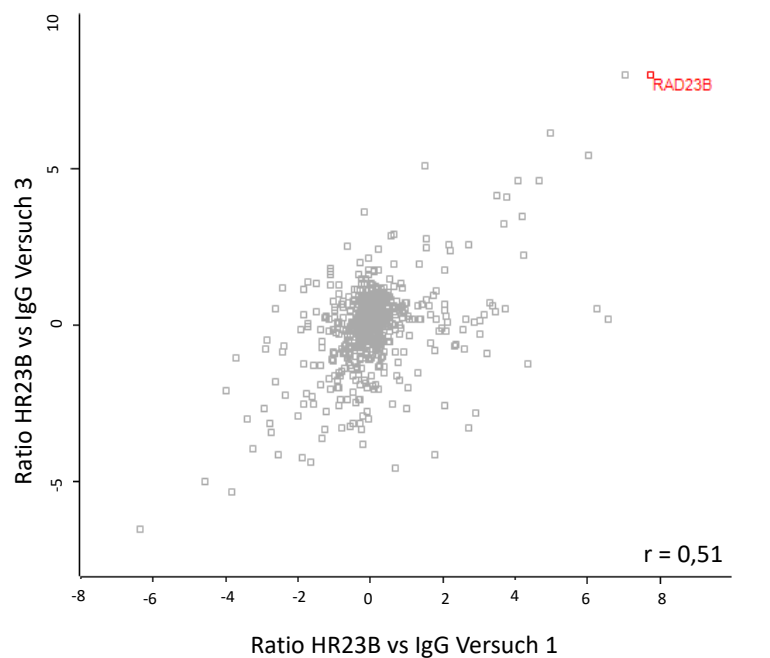


Abbildung 17: Scatter Plot aller massenspektrometrisch identifizierter Bindungspartner von HR23B

Die Bindungspartner der HR23B-IP-Probe und der IgG-IP-Probe wurden massenspektrometrisch identifiziert, log₂-transformiert und ihre iBAQ-Werte bestimmt. Anschließend wurde das Verhältnis (Ratio) beider Proben bestimmt und mittels Scatter Plot verglichen. Die Analyse erfasst alle quantifizierten Proteine beider Replikate. In beiden Proben konnte eine hohe Konzentration an HR23B nachgewiesen werden, welches als rot markiertes Zielprotein bestätigt wurde. Die Korrelationsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,51$.

4.4.2 Signalweg-Analyse „Ribonukleoprotein Komplex“

In den hochskalierten Co-IP-Experimenten sollten die Interaktionen von HR23B mit ribosomalen Proteinen bestätigt werden, die in den IP-Vorversuchen beobachtet wurden. Zur Ermittlung der Proteine, die im Vergleich zu IgG deutlich erhöht waren, wurde ein Cut-off-Expressionswert von 1,5 ($\log_2(1,5)=0,58$) festgelegt. Um die beteiligten Proteine zu identifizieren, wurde eine Signalweg-Analyse mit dem Schwerpunkt auf ribosomale Proteine durchgeführt. Es wurde der GOCC-Name (*Gene Ontology cellular component*) „Ribonukleoprotein Komplex“ zur Identifizierung der beteiligten Proteine verwendet. In Abbildung 18 sind die gefundenen Proteine rot markiert und aufgelistet. Es konnte ein Interaktionsprofil mit ribosomalen Proteinen beobachtet werden, zu denen ribosomale Proteine der großen ribosomalen Untereinheit (RPL22L1, RPL4, RPL13A, RPL13) sowie der kleinen ribosomalen Untereinheit (RPS19, RPS2) gehören. In der BioGRID-Datenbank war ausschließlich eine Wechselwirkung zwischen RPS21 und HR23B beschrieben. Eine Pearson-Korrelationsanalyse ergab einen Wert von $r = 0,811$, was auf eine starke Korrelation zwischen den beiden biologischen Replikaten hinwies. Zusammenfassend konnten ribosomale Proteine als Interaktionspartner von HR23B identifiziert und bestätigt werden.

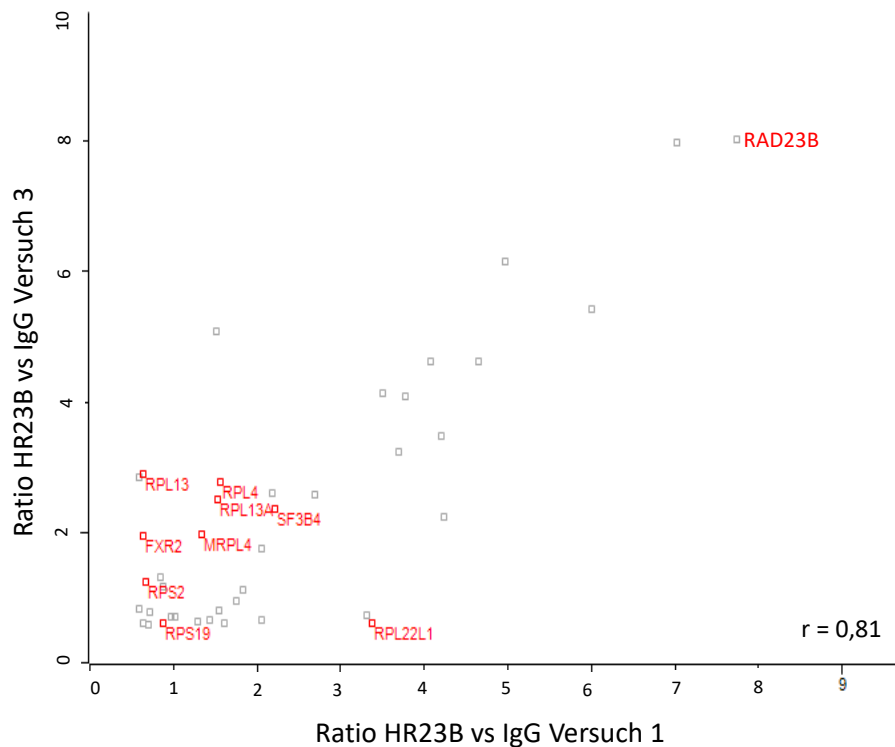


Abbildung 18: Scatter Plot der identifizierten Bindungspartner von HR23B durch die Signalweg-Analyse GOCC-Name: „Ribonukleoprotein-Komplex“

Die \log_2 -transformierten iBAQ-Werte der aus der Massenspektrometrie identifizierten Bindungspartner aus den HR23B-IP- und IgG-IP-Proben wurden ermittelt und das Verhältnis (Ratio) der beiden Proben berechnet. Im Scatter Plot werden die Proteine, die in der HR23B-IP-Probe vermehrt angereichert sind (Cut-Off-Expressionsniveau von 1,5, $\log_2(1,5)=0,58$), im Vergleich zu IgG dargestellt. Die Analyse des Signalwegs mit dem GOCC-Name: „Ribonukleoprotein-Komplex“ markiert die Proteine in Rot.

4.4.3 Interaktionsnetzwerk-Analyse von HR23B

Um die Interaktionsnetzwerke von HR23B zu visualisieren, wurden die identifizierten Bindungspartner der Massenspektrometrie in die Datenbank STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) eingegeben. Anschließend wurden sie mithilfe des Analyseprogramms GOCC untersucht. Für die STRING-Interaktionsanalyse wurden Proteine aus der Massenspektrometrie verwendet, die mit einem Cut-off-Expressionswertes von 1,5 ($\log_2(1,5)=0,58$) gefiltert wurden. STRING ist eine Datenbank mit bekannten und prognostizierten Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Interaktionen beinhalten sowohl direkte (physikalische) als auch indirekte (funktionale) Assoziationen. Die Daten stammen aus rechnerischen Vorhersagen, Wissenstransfer zwischen Organismen und Interaktionen, die aus anderen (primären) Datenbanken aggregiert wurden. Die STRING-Analyse wurde mit einem Konfidenzkoeffizienten von 0,4 durchgeführt und berücksichtigte Experimente, Datenbanken und Co-Expression als Quelle für Interaktionen.

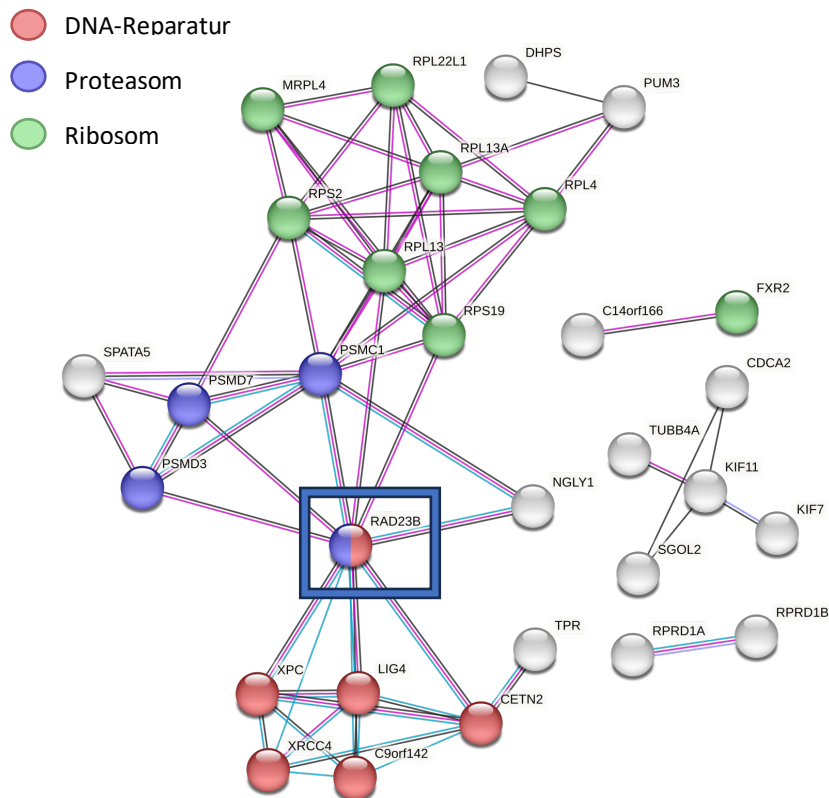


Abbildung 19: STRING-Interaktionsnetzwerk von HR23B und seiner Interaktionspartner

Das Verhältnis zwischen den in der HR23B-IP-Probe identifizierten Proteinen im Vergleich zur IgG-IP-Probe wurde unter Verwendung von iBAQ berechnet. Identifizierte Proteine wurden mit einem Expression-Cut-off-Wertes von 1,5 ($\log_2(1,5)=0,58$) gefiltert. Unter Verwendung des Analyseprogramms GOCC wurden drei Hauptwege ("Proteasom-Komplex", "DNA-Reparatur-Komplex" und "Ribosom") identifiziert und farblich gekennzeichnet. Im blauen Rechteck ist das Zielprotein HR23B dargestellt. Die Interaktionen mit rot markierten Proteinen sind Bindungspartner von HR23B in der NER. In Blau sind Interaktionen von HR23B mit dem Proteasom. Die Wechselwirkungen mit ribosomalen Proteinen sind grün gefärbt. Die STRING-Analyse basiert auf einem Konfidenzkoeffizienten von 0,4 und nutzt Experimente, Datenbanken und Co-Expression als Interaktionsquellen. Violette Linien stehen für einen experimentellen Nachweis, blaue Linien für eine Koexistenz und schwarze Linien für eine Koexpression.

In Abbildung 19 wird die STRING-Interaktionsnetzwerkanalyse des Zielproteins HR23B dargestellt. HR23B ist mit einem blauen Rechteck eingezeichnet und seine Interaktionsstränge sind abgebildet. Bindungspartner wie XPC und CETN2 stehen in Verbindung mit der Nukleotidexzisionsreparatur und sind in rot gekennzeichnet. PSMC1, PSMD3 und PSMD7 sind Proteasom-Untereinheiten, die blau markiert sind. Alle beschriebenen Interaktionen sind bereits bekannte Bindungspartner von HR23B. Zudem konnten RPS19, RPL13, RPS2, RPL4, RPL13A und RPL22L1 als neue HR23B-Bindungspartner identifiziert werden. Diese sind in grün dargestellt. Das Interaktionsnetzwerk von HR23B mit ribosomalen Proteinen erfolgt sowohl direkt, als auch indirekt über das Proteasom (PSMC1 und PSMD7). Zusätzlich erfolgte eine STRING-Analyse mit allen identifizierten Bindungspartnern, welche im Anhang hinterlegt ist. Auch hier zeigt sich ein Zusammenhang zwischen HR23B und ribosomalen Proteinen über proteasomale

Untereinheiten. Zusammenfassend wurden durch die Kombination aus Co-IP Experimenten und massenspektrometrische Analysen ribosomale Proteine (RPS19, RPL13, RPS2, RPL4, RPL13A und RPL22L1) als neue Bindungspartner von HR23B identifiziert.

4.5 Co-Lokalisation von HR23B und RPL5

Ribosomale Proteine konnten als neue Gruppe von Bindungspartnern von HR23B in der Massenspektrometrie identifiziert werden. Zudem zeigte die Reactome-Analyse eine verstärkte Interaktion von HR23B und ribosomalen Proteinen im Nukleus. Im Rahmen einer Lokalisationsstudie mittels IF-Doppelfärbung sollte das Zusammenwirken von HR23B und ribosomalen Proteinen, am Beispiel von RPL5 validiert werden. RPL5 wurde in Voruntersuchungen unter der Signalweg Analyse „rRNA-Processing“ als Bindungspartner identifiziert. Bisherige Experimente haben gezeigt, dass HR23B sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch auftritt. Um die mögliche Interaktion zwischen HR23B und ribosomalen Proteinen zu untersuchen, wurden Co-Immunfluoreszenzfärbungen an U2OS-Zellen durchgeführt. Für die in der Abbildung gezeigte Färbung wurde HR23B (BD Science) auf die gleiche Weise wie in Abschnitt 3.2.1.5 beschrieben gefärbt, bevor es grün erschien. Als ribosomales Protein wurde RPL5 ausgewählt und mit anti-RPL5-Antikörper und DyLight 649 gefärbt, wodurch eine rote Färbung erzielt wurde. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI verwendet.

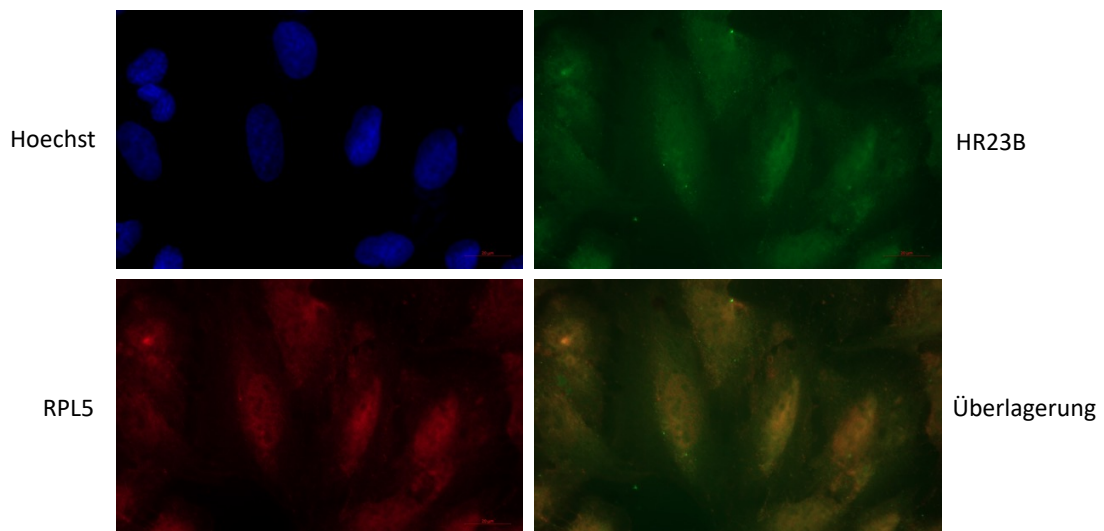


Abbildung 20: Co-Immunfluoreszenzfärbung mit anti-HR23B- und anti-RPL5-Antikörper in U2OS-Zellen

IF-Färbungen ribosomaler Proteine wurde unter Verwendung eines anti-RPL5-Antikörpers (rot) und HR23B mittels FITC (grün) durchgeführt. Co-Lokalisation von HR23B und RPL5 im Bereich des Nukleus in gelb/orange. Hoechst (blau) dient als Kontrolle. Skalenbalken zeigen 20µm an.

Die IF-Aufnahmen in Abbildung 20 zeigen eine verstärkte Expression von HR23B im Zellkern. RPL5 wurde sowohl im Zytoplasma als auch im Kern nachgewiesen, wobei es im Kern vermehrt angefärbt wurde. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Angaben aus der

Literatur, in der RPL5 als nukleäres und zytoplasmatisches Protein beschrieben wird (75, 76). In der Überlagerung zeigen RPL5 und HR23B ein gemeinsames Vorkommen im Nukleus. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Proteine HR23B und RPL5 eine enge gemeinsame zelluläre Lokalisation und Co-Lokalisation aufweisen.

4.6 Überexpression von HR23B durch das Tet-On System

Für die Analyse der Genaktivierung durch das Tet-On System wurden zwei modifizierte U2OS-Zelllinien verwendet. Die erste Zelllinie enthielt ein *response*-Plasmid: HR23B (Tet-On-HR23B). Zur späteren Validierung der induzierten HR23B-Expression mittels SDS-PAGE wurde ein Flag-Tag hinzugefügt. Als Kontrollgruppe diente eine Zelllinie ohne Zielprotein, die nur eine TRE-Region (Tet-On-TRE) enthielt. Für die Experimente wurden die Zelllinien Tet-On-HR23B und Tet-On-TRE (Kontrolle) jeweils mit 10 µl Doxycyclin oder 10 µl H₂O an zwei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Abbildung 21 zeigt die Western-Blot-Analyse der induzierten HR23B-Expression durch das Tet-On System. Exogen exprimiertes HR23B wurde mittels eines anti-Flag-Antikörpers detektiert. Die Abbildung zeigt eine deutliche Bande in den Tet-On-HR23B-Zellen, die mit Doxycyclin behandelt wurden. Unter Verwendung eines anti-HR23B-Antikörpers konnte sowohl endogenes als auch exogenes HR23B in U2OS-Zellen identifiziert werden. Endogenes HR23B mit einer Größe von 58 kDa wurde in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen. Nach Behandlung der Tet-On-HR23B Zelllinie mit Doxycyclin wurde eine Intensitätssteigerung beobachtet, da sowohl das endogene HR23B als auch das exogene HR23B detektiert werden konnte. Die gleichmäßige Beladung der Gel-Taschen wurde durch die Detektion von Actin gesichert. Zusammenfassend wurde erfolgreich eine Überexpression von HR23B unter Doxycyclin-Behandlung durch das Tet-On System erreicht.

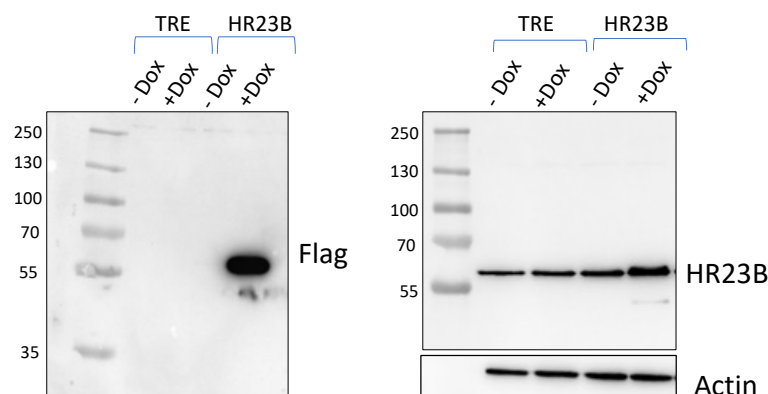


Abbildung 21: Western Blot Analyse des Tet-On Systems in U2OS-Zellen mit anti-HR23B- und anti-Flag-Antikörpern

Die Tet-On-Zelllinien mit und ohne etabliertes Zielgen (HR23B) wurden zwei Tage für 24 h in 10 µl Doxycyclin oder H₂O inkubiert. Anschließend wurden die Proteine isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Dabei wurde ein anti-Flag-Antikörper verwendet, der an den Flag-Tag des HR23B-Konstruktes bindet. Mit Hilfe des anti-HR23B-Antikörpers wurde exogenes und endogenes HR23B detektiert. Actin diente als Ladekontrolle.

4.7 Einfluss von HR23B-Überexpression auf die Translationsrate der Zelle

Im folgenden Abschnitt sollte die Auswirkung einer HR23B-Überexpression auf die Translationsrate der Zelle untersucht werden. Eine Methode zur Quantifizierung der Translationsrate ist die Puromycelationsreaktion. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie normale physiologische Prozesse widerspiegelt. Zunächst wurden die entsprechenden Tet-On-Zelllinien mit Doxycyclin vorbehandelt, um eine Überexpression von HR23B zu induzieren. In einem weiteren Schritt wurden die entsprechenden Zelllinien mit niedrigen Konzentrationen von Puromycin ergänzt, das in die wachsende Peptidkette eingebaut wurde. Die puromycylierten Peptide wurden durch Standardimmunoblotting mit anti-Puromycin-Antikörpern nachgewiesen. Ein komplexes Bandenmuster spiegelt das breite Repertoire neu synthetisierter Proteine wider. Die Negativkontrolle wurde weder mit Puromycin noch mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid ist ein Translationsinhibitor, welcher spezifisch an die 60S ribosomale Untereinheit bindet und die Elongation während der Proteinbiosynthese verhindert. Deshalb werden keine puromycylierten Peptide nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde die Positivkontrolle sowohl mit Puromycin als auch mit Cycloheximid behandelt. Da Cycloheximid als Translationsinhibitor wirkt, wird Puromycin nur selten in die wachsende mRNA-Kette eingebaut und es werden im Immunoblot nur wenig puromycylierte Peptide nachgewiesen.

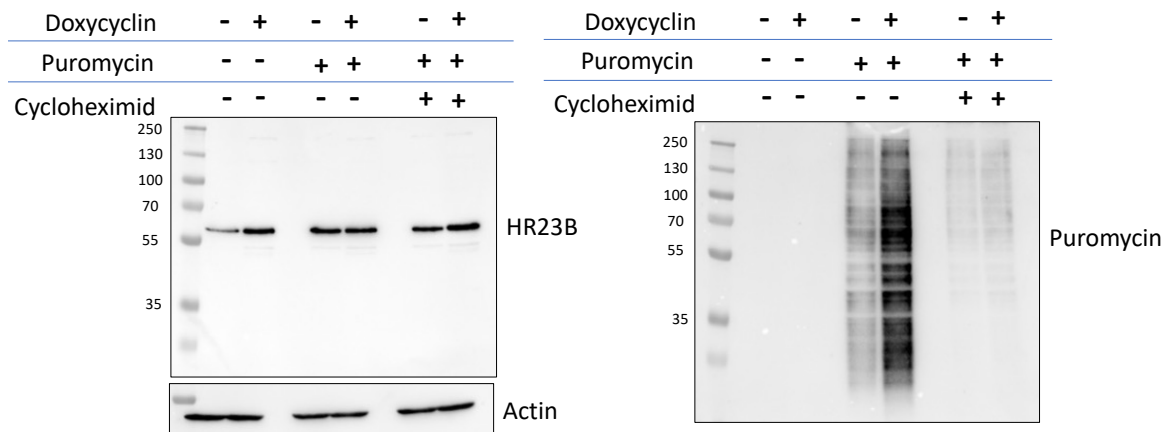


Abbildung 22: Messung der Translation unter HR23B-Überexpression in U2OS Zellen

Die Messung der Translation erfolgte an HR23B Tet-On-Zelllinien. Eine Überexpression von HR23B wurde durch eine 24 h Behandlung mit Doxycyclin induziert. Danach erfolgte die Proteinextraktion und Auftrennung mittels SDS-PAGE. Der Western Blot wurde mit einem anti-HR23B- und einem anti-Puromycin-Antikörper durchgeführt. Die ersten beiden Proben wurden weder mit Puromycin noch Cycloheximid behandelt und dienen als Negativkontrolle. Die Behandlung mit Puromycin (ohne Cycloheximid) ermöglichte die Messung der Translationsrate. Doxycyclin-behandelte Zellen (induzierte HR23B-Überexpression) wiesen im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine höhere Menge an puromycylierten Peptiden auf. Als zweite Kontrolle wurden beide Zellreihen mit Puromycin und mit Cycloheximid behandelt, wodurch nur minimale Mengen von Puromycin in das translatierte Protein eingebaut wurden. Actin diente als Ladekontrolle.

Die Abbildung 22 präsentiert die erzielten Ergebnisse. Auf dem linken Western Blot wurde der Nachweis von HR23B in verschiedenen Proben mithilfe eines anti-HR23B-Antikörpers erbracht. In der mit Doxycyclin behandelten Tet-On-HR23B Zelllinie wurde eine Erhöhung der Bandendichte im Vergleich zur unbehandelten Probe (ohne Doxycyclin) festgestellt, was auf eine durch Doxycyclin induzierte Überexpression von HR23B hinweist. Der zweite Western Blot wurde unter Verwendung eines anti-Puromycin-Antikörpers durchgeführt, um nach puromycylierten Peptiden zu suchen. Die ersten beiden Linien, die weder mit Puromycin noch mit Cycloheximid behandelt wurden, zeigen kein erkennbares Bandenmuster und dienen als Negativkontrolle. Die letzten beiden Linien, die sowohl mit Puromycin als auch mit Cycloheximid behandelt wurden, dienen als Positivkontrolle. Durch Zugabe des Translationsinhibitor Cycloheximid sind nur wenige puromycylierte Peptide nachweisbar. Die Ergebnisse der dritten und vierten Linie, die ohne die Zugabe von Cycloheximid und nur mit Puromycin behandelt wurden, erlauben eine Beurteilung der Auswirkung einer HR23-Überexpression auf die Translationsrate. Beim Vergleich der Tet-On-HR23B Zelllinien mit und ohne Doxycyclin-Behandlung ist festzustellen, dass die Zellen mit Doxycyclin-induzierter HR23B-Überexpression eine erhöhte Menge an puromycylierten Peptiden aufweisen. Zusammenfassend weisen Zellen mit induzierter HR23B-Überexpression im Gegensatz zu Zellen ohne entsprechende Überexpression eine erhöhte Translationsrate auf.

4.8 Analyse des Abbaus von HR23B

4.8.1 Halbwertszeit von HR23B

Vor der Beurteilung des Proteinabbaus selbst, sollte zunächst die Halbwertszeit von HR23B bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden insgesamt sieben U2OS-Zellplatten ausgesät und über einen definierten Zeitraum mit 250 μm Cycloheximid, einem Translationsinhibitor, inkubiert. Dieser bindet spezifisch an die 60S ribosomale Untereinheit und verhindert die Elongation während der Proteinsynthese. Danach erfolgte die Proteinisolation, Auftrennung mittels SDS-PAGE und Analyse mittels Western Blot. Mit einem anti-HR23B-Antikörper konnte HR23B bei 58 kDa detektiert werden (Abbildung 23). Neben einer Zunahme der Intensität des Bandensignals zwischen 1 h und 8 h Cycloheximid-Behandlung, zeigte sich eine Abnahme der HR23B-Expression nach 32-48 h. Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich ableiten, dass HR23B eine Halbwertszeit von ungefähr 16-24 h aufweist. Als Ladungskontrolle wurde Actin verwendet.

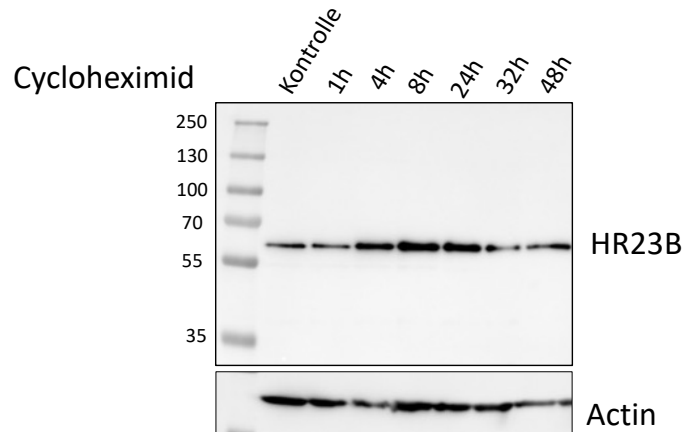


Abbildung 23: Messung der Halbwertszeit von HR23B durch Cycloheximid in U2OS-Zellen
 U2OS-Zellen wurden für einen bestimmten Zeitraum (1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 32 h, 48 h) mit 250 μ m Cycloheximid behandelt. Anschließend wurden die Proteine isoliert, mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western-Blot durchgeführt. Zur Detektion von HR23B wurde ein anti-HR23B-Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle wurde ein anti-Actin-Antikörper eingesetzt.

4.8.2 Analyse des Abbauweges von HR23B über das Proteasom

Unter der Annahme einer Halbwertszeit von HR23B zwischen 16 und 24 h wurden Inkubationszeiten von 2, 3 und 4 Tagen gewählt, um den Abbau von HR23B zu untersuchen. Zunächst wurden U2OS-Zellen über einen Zeitraum von 2 Tagen mit ansteigenden Bortezomib-Konzentrationen behandelt (DMSO, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM und 100 nM). Bortezomib wirkt als Proteasom-Inhibitor. Nach der Lyse der Zellen und Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE, erfolgte die Analyse von HR23B durch einen anti-HR23B-Antikörper. Die entsprechenden Western Blot Analysen sind in Abbildung 24A dargestellt. Die HR23B-Bande ist bis zu einer Konzentration von 25 nM Bortezomib deutlich sichtbar. Bei höheren Konzentrationen (50 nM und 100 nM Bortezomib) ist eine deutliche Abnahme der HR23B-Banden zu erkennen. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden U2OS-Zellen über einen Zeitraum von 3 und 4 Tage mit DMSO, 5 nM und 25 nM Bortezomib behandelt (Abbildung 24B). Der Vergleich der einzelnen Behandlungen ergab eine Abnahme von HR23B unter Proteasom-Inhibition. Die Kontrollprobe mit DMSO zeigte eine eindeutige Bande, während bei einer Konzentration von 5 nM Bortezomib eine schwache Bande erkennbar ist. Das Signal bleibt bei einer Konzentration von 25 nM Bortezomib aus. Dieses Muster zeigt sich sowohl nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen, als auch nach 3 Tagen. In der Ladekontrolle mittels Actin konnte bei einer Konzentration von 25 nM nur ein schwaches Signal detektiert werden, welches auf eine geringere Proteinkonzentration hinweist. Zusätzlich wurde mittels eines Pan-Ubiquitin Antikörpers nach ubiquitinierten Proteinen gesucht. Durch die Hemmung des Proteasoms reichern sich ubiquitinierte Proteine in der Zelle an, die mit dem Pan-Ubiquitin-Antikörper sichtbar gemacht werden und als Positivkontrolle dienen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inhibition des Proteasoms zu einer Abnahme von HR23B führt.

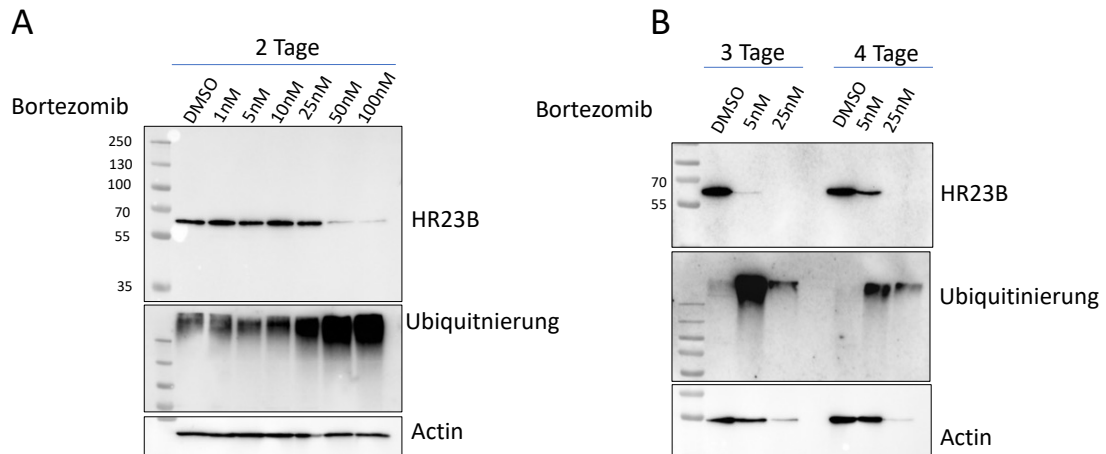


Abbildung 24: Einfluss von Proteasom-Inhibition durch Bortezomib auf HR23B in U2OS-Zellen
 (A) U2OS-Zellen wurden für 2 Tage mit verschiedenen Konzentrationen von Bortezomib (DMSO, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM) behandelt. Nach Proteinextraktion, Auftrennung mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurde HR23B mittels anti-HR23B-Antikörper visualisiert. Als Positivkontrolle zum Nachweis der Proteasom-Inhibition und allgemein erhöhten Ubiquitinierung wurde ein anti-Ubiquitin-Antikörper verwendet, der an Ubiquitin-modifizierte Proteine bindet. Als Ladekontrolle diente Actin (B) Die U2OS-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Bortezomib (DMSO, 5 nM, 25 nM) über 3 und 4 Tage behandelt. Anschließend erfolgte die gleiche Präparation und Verwendung von Antikörpern.

4.8.3 Analyse des Abbauweges von HR23B über die Autophagie

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob HR23B durch Autophagie abgebaut wird. Dazu wurden die Zellen mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin für 24 h inkubiert. Bafilomycin A1 stört die Autophagie über zwei unabhängige Ansatzpunkte. Durch Hemmung der lysosomalen Protonenpumpe V-ATPase verhindert Bafilomycin A1 die Ansäuerung des Lumens und die lysosomale Enzymaktivierung. Durch die Bafilomycin A1-abhängige Hemmung der Calciumpumpe Ca-P60A/SERCA des endoplasmatischen Retikulums (ER) wird ein Defekt der Autophagosom-Lysosom-Fusion induziert (77). U2OS-Zellen wurden jeweils mit DMSO, 10 nM, 50 nM und 100 nM Bafilomycin für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion, Auftrennung (SDS-PAGE) und Analyse mittels Western Blot (Abbildung 24). HR23B wurde mit einem anti-HR23B-Antikörper detektiert. Die Kontroll-Behandlung mit DMSO zeigt eine deutliche Bande bei 58 kDa. Vergleicht man die verschiedenen Bafilomycin-Behandlungen, so konnte mit steigender Bafilomycin-Konzentration eine leichte Dichtezunahme der HR23B-Bande festgestellt werden (Abbildung 25). Als Marker für die Autophagie wurde ein anti-LC3-Antikörper verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass im Vergleich zur DMSO-Behandlung die Hemmung der Autophagie nicht zu einer Erhöhung von HR23B in der Zelle führte. Die Überprüfung der gleichmäßigen Beladung erfolgte durch Actin. Zusammenfassend geben die dargestellten

Ergebnisse einen Einblick in den Abbau von HR23B, der weder eindeutig über das Proteasom, noch über Autophagie erfolgt.

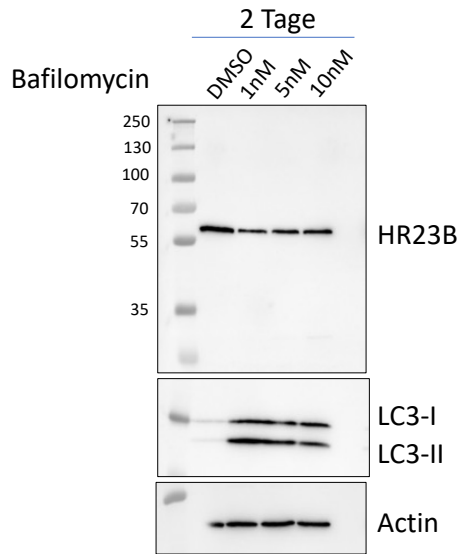


Abbildung 25: Einfluss von Autophagie-Inhibitor Bafilomycin auf HR23B in U2OS-Zellen

U2OS-Zellen wurden für 48 h in Medium mit verschiedenen Konzentrationen von Bafilomycin (DMSO, 1 nM, 5 nM, 10nM) inkubiert. Anschließend folgte die Proteinextraktion, Auftrennung und Darstellung im Western Blot. Mit dem anti-HR23B-Antikörper wurde HR23B mit einer Größe von 58 kDa detektiert. Als Positivkontrolle wurde ein anti-LC3-Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle diente Actin.

4.9 Klonierung des Ubiquitin-Rezeptorproteins SQSTM1/p62

Neben HR23B existieren weitere proteasomale und autophagische Shuttling-Faktoren, die gemeinsam UBL- und UBA-Domänen aufweisen. Ihre Rolle im Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau und ihre Interaktion sind bisher nicht vollständig geklärt. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, weitere Shuttling-Faktoren zu klonieren. Dies sollte die Grundlage für Untersuchungen zum Bindungspartnerprofil der einzelnen Shuttling-Faktoren legen. Für 4 Shuttling-Proteine (NUB1, SQSTM1, UBQLN1, UBQLN4) wurden Primersequenzen (siehe Abschnitt 3.1.6) entworfen. Als Ausgangsmaterial diente umgeschriebene cDNA aus U2OS-Zellen, sowie als Vektor pcDNA₃. Um die Klonierung des Shuttling-Faktors SQSTM1/p62 in Expressionsvektoren zu ermöglichen, wurden künstliche Spaltstellen (Hind III und Apa I) sowie Start- und Stopcodons an den Termini der Ziel-DNA in die Oligonukleotidprimersequenzen eingefügt. Zur Auswahl der Restriktionsenzyme wurden alle Enzyme auf Schnittstellen innerhalb des Zielgens geprüft. Um die spätere Identifizierung zu vereinfachen, wurde ein Flag-Tag kodiert. Das Einfügen einer Verbindungssequenz aus fünf Glycinresten zwischen dem Zielgen und dem Flag-Epitop trug ebenfalls zur späteren Identifizierung bei. Die Primerpaare für SQSTM1/p62 sind beispielhaft in Abbildung 26 dargestellt.

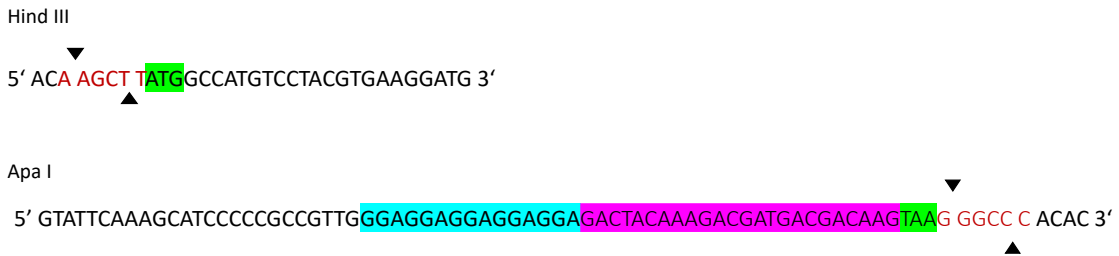


Abbildung 26: Primerpaare für die Klonierung von Sequestosom/p62

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII und ApaI sind rot markiert. Das Start- und Stop-Codon sind grün gekennzeichnet. Der Flag-Tag ist violett die Verbindungssequenz ist türkis. Es wurde ein Sense-Primer (SQSTM1 forward) mit einer Hind III Restriktionssequenz und einem Startcodon synthetisiert. Ein Antisense-Primer (SQSTM1 reverse), der eine Verbindungssequenz, einen Flag-Tag, ein Stopcodon und eine ApaI-Spaltstelle enthält, wurde entworfen.

Mithilfe dieses Primerpaares wurde der gesamte offene Leserahmen des SQSTM1/p62, einschließlich des Flag-Tags und Restriktionsschnittstellen, mittels PCR mit der DreamTaq-Polymerase aus genomischer cDNA der U2OS-Zellen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde elektrophoretisch auf einem 1 %igen Agarosegel überprüft. Abbildung 27A zeigt das PCR-Produkt von SQSTM1 bei einer erwarteten Größe von 1068 bp. Die NanoDrop-Messung ergab eine DNA-Menge von 100,2 ng/µl bei einem Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} > 1,8.

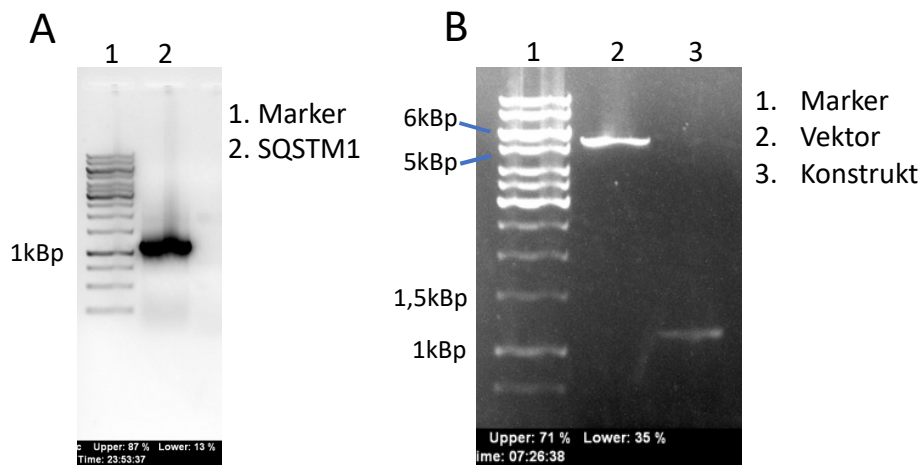


Abbildung 27: Amplifikation von p62 mit der DreamTaq-Polymerase und Kontrolle nach Restriktionsreaktion zur Darstellung des Expressionsvektor und pcDNA₃

(A) Der gesamte kodierende Bereich von p62 wurde mit speziellen Primern aus cDNA der U2OS-Zellen mit der DreamTaq-Polymerase mit 35 Zyklen bei einer *annealing* Temperatur von 55°C über 2 min amplifiziert. Die Auftrennung des PCR-Produktes auf 1 %igen Agarosegel zeigt in Spur 2 p62 mit der erwarteten Größe von 1068 bp. Der Längenstandard erfolgte anhand GeneRuler 1kbp DNA-Leiter. Die NanoDrop Messung ergab 100,2 ng/ µl mit Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} > 1,8 (B) Sowohl der pcDNA₃-Vektor als auch das Konstrukt wurden durch Restriktionsverdau mit ApaI und HindIII geschnitten. Gezeigt sind der geschnittene Vektor bei 5 kbp in Spur 2 und das Konstrukt (p62) in Spur 3, aufgetrennt auf einem 1 %igen Agarosegel.

Als Vektor wurde pcDNA₃, ein 5,4 kbp großes Plasmid, welches für die Klonierung von PCR-amplifizierten Fragmenten entwickelt worden ist, verwendet. Das Plasmid enthält einen Neomycin-Resistenzmarker und ein Ampicillin-Resistenzgen. Es erfolgte der

Restriktionsverdau mit dem PCR-Produkt SQSTM1/p62 und dem Vektor pcDNA₃ mit den Restriktionsenzymen ApaI und HindIII. Abbildung 27B zeigt in Linie 2 den linearisierten Vektor und in Linie 3 das Konstrukt p62 (1068 bp) nach dem Restriktionsverdau bei 1 kbp dargestellt. In einer Ligationsreaktion wurde das amplifizierte p62-DNA-Fragment mit der T4-DNA-Ligase an die Spaltstellen der *multiple cloning site* von pcDNA₃ ligiert. Da Hind III und Apa I asymmetrisch schneidende Restriktionsenzyme sind, entstanden *sticky ends*, welche die Orientierung des p62-Inserts relativ zum Vektor bestimmten. Um eine möglichst hohe Insertionseffizienz zu generieren, wurden verschiedene Ligationsansätze getestet, indem das Verhältnis von Vektor zu Konstrukt variiert wurde (1/5; 1/7; 2/6; H₂O). Zum Einschleusen der Plasmide wurde die in 3.2.3.8 beschriebene Hitzeschockmethode angewandt und 20 µl der Lösung auf Ampicillin-enthaltende LB-Agar-Schalen ausgestrichen. Nur transformierte Bakterien exprimierten β-Lactamase und überlebten auf dem Selektionsmedium. Die Kolonien wurden gezählt. Bei dem Ligationsansatz mit H₂O wurden 210 Kolonien gezählt, beim 1/5-Ansatz 1220 Kolonien, beim 1/7-Ansatz 828 Kolonien und beim 2/6-Ansatz 960. Es wurden jeweils zwei Kolonien von *E. coli* aus den verschiedenen Ligationsansätze gepickt und zur Beimpfung von Flüssigkulturen verwendet, die anschließend über Nacht geschüttelt wurden. Anschließend wurde Miniprep-DNA präpariert und ein Kontrollaufschluss mit Aliquots durchgeführt.

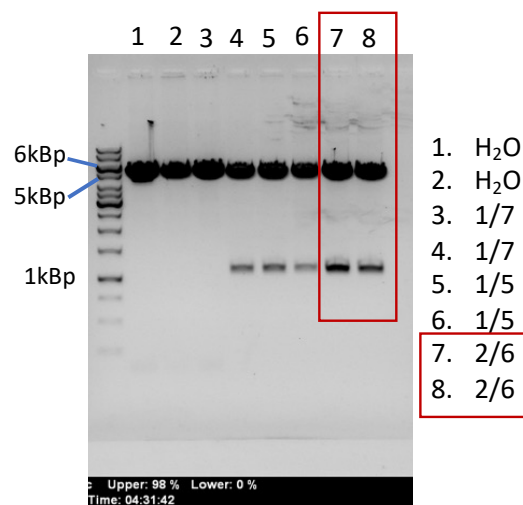


Abbildung 28: Kontrollverdau der Miniprep-DNA einzelner *E. coli* Kolonien nach Hitzeschock. Analytischer Verdau der Miniprep-DNA von jeweils zwei positiven Klonen verschiedener Ligationsansätze. Für die Ligation wurden jeweils unterschiedliche Verhältnisse zwischen Plasmid und Konstrukt angesetzt (erste Zahl Plasmid, zweite Zahl Konstrukt). Nach der Transformation wurde Miniprep-DNA präpariert und ein Kontrollaufschluss mit Aliquots durchgeführt. Diese wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Spur 4-8 zeigen bei 5 kbp den Vektor und bei 1 kbp das zu erwartende Konstrukt (1068 bp). Die beste Ligationseffizienz zeigte der 2/6 Ansatz mit 2 µl Vektor und 6 µl Konstrukt.

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse des Miniprep-Kontrollverdaues für die verschiedenen Ligationsansätze. Auf dem 1 %igen Agarosegel ist eine erwartete Bande des Vektors bei 5,4

kbp, sowie ein Bande des Konstruktes (1068 bp) bei 1 kbp zu sehen. Es wurden fünf positive Klone für p62 identifiziert. Die Ligationsansätze mit Klon 7 und 8 zeigten die höchste Effizienz, wobei 2 µl Vektor und 6 µl Konstrukt für die Ligation verwendet wurden. Um zu überprüfen, ob die klonierte p62-Sequenz keine Mutation enthält, wurde das Insert der im Kontrollverdau positiven Klone vor der Weiterverwendung sequenziert. Anhand der Sequenzdaten und der abgeleiteten Aminosäuresequenz konnte gezeigt werden, dass das klonierte DNA-Fragment die gesamte kodierende Sequenz von p62 enthält. Die Transfektion der U2OS-Zellen erfolgte mit dem Reagenz *GeneJuice*. Um die Expression des p62-Proteins in den transfizierten Zellen zu untersuchen, wurden Western Blots mit Proteinextrakten aus den stabil transfizierten pcDNA₃-p62 Konstrukt bzw. pcDNA₃ als Kontrolle mitgeführt. Zur Detektion von p62 erfolgte die Inkubation mit einem anti-p62-Antikörper, sowie einem anti-Flag-Antikörper. In Abbildung 29 ist der entsprechende Western Blot dargestellt. Es zeigten sich mehrer Banden auf Höhe von 55 kDa, die mit dem anti-p62-Antikörper und dem anti-Flag-Antikörper detektiert werden konnten. Zusätzlich ist eine weitere Bande bei 35 kDa zu sehen, die mit dem anti-Flag-Antikörper nicht detektiert wurde. Als Negativkontrolle ist in der pcDNA₃-Zelllinie keine Bande zu sehen. Die gleichmäßige Beladung der Taschen wurde mit Actin sichergestellt.

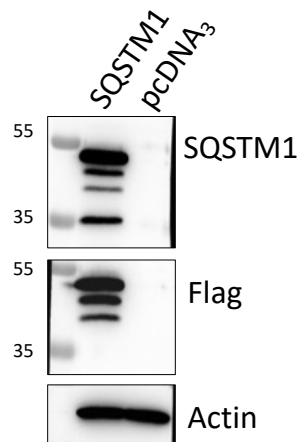


Abbildung 29: Nachweis der p62-Expression auf Proteinebene in U2OS-Zellen mit anti-SQSTM1- und anti-Flag-Antikörper

Nach der Lyse der transfizierten Zellen wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurden sowohl Zellen mit dem etablierten Konstrukt als auch Zellen, die nur pcDNA₃ enthielten, analysiert. Die etablierten Konstrukte wurden mit anti-SQSTM1- und anti-Flag-Antikörpern detektiert, während Actin als Ladekontrolle diente.

5 Diskussion

Eine funktionierende Proteinqualitätskontrolle (PQC) ist für die Lebensfähigkeit und Viabilität von Zellen von entscheidender Bedeutung. Eine gestörte PQC erhöht das Risiko für die Entstehung von Proteinopathien. Diese Erkenntnis hat die Forschung auf dem Gebiet der verschiedenen Bereiche der PQC vorangetrieben (4). Insbesondere das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) hat Interesse geweckt, da es der Zelle ermöglicht, Proteine gezielt für den proteasomalen Abbau zu markieren. Proteasom-Shuttle-Proteine wie HR23B wurden identifiziert, deren Aufgabe darin besteht, Ub-markierte Proteine zum Proteasom zu transportieren. Die Erforschung des Interaktionspartner-Profiles von HR23B kann zum Verständnis seiner Funktionsweise beitragen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, potentielle bzw. neue Interaktionspartner von HR23B durch die Anwendung von Co-IPs und Massenspektrometrie zu identifizieren. Hierdurch gelang es, ribosomale Proteine als bisher unbekannte Bindungspartner von HR23B zu charakterisieren. In anschließenden STRING Interaktionsanalysen konnte ebenfalls eine deutliche Interaktion zwischen ribosomalen Proteinen und HR23B nachgewiesen werden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass HR23B beim gezielten Abbau ribosomaler Proteine assistiert, indem es diese in nukleäre Bereiche mit Proteasom-Aktivität transportiert.

Der Zusammenbau von Ribosomen ist ein streng kontrollierter, dynamischer Prozess, der ein komplexes räumliches und zeitliches Zusammenspiel verschiedener Proteine erfordert (78). Das eukaryotische 80S-Ribosom setzt sich aus einer kleinen 40S-Untereinheit und einer großen 60S-Untereinheit zusammen. Die 40S-Untereinheit enthält die 18S ribosomale RNA (rRNA) und 44 verschiedene ribosomale Proteine, während die 60S-Untereinheit aus 25S, 5,8S, 5S rRNA und 47 ribosomalen Proteinen besteht (79). Dementsprechend ist die Zusammenstellung von Ribosomen ein molekulares „Puzzle“, das zur Bildung von translationsbefähigten Ribosomen führt. Betrachtet man die exponentiell wachsende Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die ~200.000 Ribosomen enthält und bei einer Generationszeit von 90 min mehr als 2.000 Ribosomen pro Minute produziert, so bedeutet dies eine Synthese von mindestens 160.000 ribosomalen Proteinen pro Minute (80). Angesichts der enormen Komplexität des Prozesses sind die Biogenese und der Zusammenbau von Ribosomen von einem funktionierenden PQC-System abhängig. Insbesondere auf der Ebene der Expression ribosomaler Proteine, des Ribosomenaufbaus und des Ribosomenumsatzes muss eine starke Regulation stattfinden. Studien zeigten, dass bestimmte ribosomale Proteine im Überschuss produziert werden. Um trotzdem einen angemessenen Spiegel dieser Proteine aufrechtzuerhalten, werden nicht zusammengesetzte ribosomale Proteine wieder abgebaut (56). Warner et al. beschrieben, dass neu synthetisierte ribosomale

Proteine bei gestörter rRNA-Verarbeitung rasch abgebaut werden (80-83). Darüber hinaus konnte in Zellen, die zusätzliche Kopien von Genen für ribosomale Proteine enthielten, keine Überproduktion des entsprechenden Proteins nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen schnellen Umsatz überschüssiger Untereinheiten hin (83, 84). Es wird angenommen, dass ribosomale Proteine in übermäßiger Menge synthetisiert werden, damit sie nicht zum begrenzenden Faktor einer sich teilenden Zelle werden. Gleichzeitig wird eine Überproduktion durch kontinuierlichen Abbau verhindert (56). Weitere Studien zeigten, dass überexprimierte RP durch das UPS und nicht durch Autophagie abgebaut werden (56). Wie genau überzählige ribosomale Proteine zum Proteasom gelangen, ist jedoch noch ungeklärt. Angesichts der Rolle von HR23B als Proteasom-Shuttling-Faktor könnte man daher die Hypothese aufstellen, dass HR23B bei dem Abbau überschüssiger ribosomaler Proteine assistiert. Im Jahr 2005 wurde eine Analyse des Ubiquitin-bezogenen Proteoms durchgeführt, bei der eine große Anzahl von ubiquitinierten ribosomalen Proteinen in menschlichen Zellen gefunden wurde (85). Zudem konnte unter Proteasom-Inhibition eine Anhäufung ribosomaler Proteine in gereinigten Ubiquitin-Konjugaten identifiziert werden (86-88). Sung et al. beschrieben einen Mechanismus zur Qualitätskontrolle von überschüssigen ribosomalen Proteinen, der als *Excess Ribosomal Protein Quality Control* (ERISQ) bezeichnet wurde (89). ERISQ erkennt spezifisch nicht-zusammengesetzte ribosomale Proteine im Zellkern und markiert sie für den proteasomalen Abbau. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Ubiquitin-Ligase Tom1 (Hefe) eine entscheidende Rolle im ERISQ-Prozess spielt, indem sie überschüssige ribosomale Proteine im Zellkern gezielt ubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung erfolgt an Lysinresten, die innerhalb reifer Ribosomen versteckt sind (89). Auf diese Weise wird zudem sichergestellt, dass nur überschüssige, nicht-zusammengesetzte ribosomale Proteine dem Ubiquitin-abhängigen Abbau unterliegen (90). Das menschliche Äquivalent von Tom1 ist als Huwe1 bekannt und die Ergebnisse von Sung et al. lassen vermuten, dass dieses Enzym in einem ähnlichen Stoffwechsel involviert ist (89). Die in HR23B integrierten UBA-Domänen ermöglichen die Erkennung von Ub-markierten Proteinen, worüber die Interaktion mit ribosomalen Proteinen möglicherweise vermittelt werden könnte. Zusammenfassend könnte man schlussfolgern, dass HR23B und überzählige ribosomale Proteine auf Ubiquitin-abhängige Weise miteinander interagieren.

In dieser Arbeit konnten HR23B und RP im Zellkern und im Zytoplasma nachgewiesen werden, wobei sie hauptsächlich im Kern kolokalisieren. Die subzelluläre Lokalisation ribosomaler Proteine kann durch die komplexe Biogenese von Ribosomen erklärt werden, die in verschiedenen Zellkompartimenten stattfindet. Der Nukleolus ist der Ort der Transkription von 5.8-, 18- und 28-S-rRNA, während 5-S-rRNA im Nukleoplasma

synthetisiert wird. Die ribosomalen Proteine, die von mRNAs kodiert werden, entstehen im Zytoplasma. Neu synthetisierte ribosomale Proteine werden in den Zellkern importiert, konzentrieren sich im Nukleolus und verbinden sich mit rRNAs zu Ribosomen-Untereinheiten. Die letzten Stadien der Ribosomenreifung finden nach dem Export präribosomaler Partikel in das Zytoplasma statt, wo die aktiven 40S- und 60S-Untereinheiten eukaryotischer Ribosomen gebildet werden (91-94). Die Uniprot-Datenbank beschreibt RPL5 als ein Protein, das im Zellkern und im Zytoplasma vorkommt und sich im Zellkern anreichert (95), was im Rahmen dieser Arbeit durch IF-mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden konnte. Die Verteilung ribosomaler Proteine in der Zelle lässt vermuten, dass PQC-Prozesse sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern stattfinden. Lam et al. zeigten, dass eine bedeutende Anzahl der in den Zellkern importierten ribosomalen Proteine erneut abgebaut werden und nicht zur Ribosomenbildung beitragen (96). Dies wurde auf den kontinuierlichen Abbau von ribosomalen Proteinen im Nukleoplasma zurückgeführt. Weiterhin beschrieben sie, dass sich neu synthetisierte ribosomale Proteine im Nukleolus schneller anreichern als in anderen Kernbestandteilen (96) und dass Proteasom-Inhibition zu einem Anstieg ribosomaler Proteine im Nukleus führt, aber nicht im Zytoplasma (96). Durch SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) MS konnte ebenfalls eine rasche Zunahme von nukleolären, nicht-markierten ribosomalen Proteinen nach Hemmung des Proteasoms nachgewiesen werden (97). Interessanterweise wurde gezeigt, dass im Nukleolus keine Proteasomen lokalisiert sind und sich die Proteasom-Aktivität auf das Nukleoplasma und das Zytoplasma beschränkt (98). Dies bestätigten biochemische Experimente und massenspektrometrische Analysen, die Proteasom-Aktivität im Nukleoplasma und Zytoplasma nachwiesen. Das nukleoläre Proteom war frei von Proteasomen (99, 100). Wie werden also überschüssige ribosomale Proteine, die insbesondere im Nukleolus akkumulieren, effizient abgebaut? HR23B könnte eine Funktion in diesem Prozess übernehmen, indem es überschüssige ribosomale Proteine im Nukleolus erkennt und sie ins Nukleoplasma zum Proteasom transportiert, um ihren Abbau zu unterstützen. Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten, dass HR23B im Zellkern und im Zytoplasma vorkommt. IF-Doppelfärbungen mit Nucleolin, einem Markerprotein für Nukleoli (101), und HR23B bestätigten das gemeinsame Vorkommen.

Proteasomen sind in beiden Zellkompartimenten, dem Zytoplasma und dem Zellkern, lokalisiert (98). Jedoch wurde in Zellfraktionen von Nukleoli oder Kernhüllen keine proteasomale Aktivität festgestellt (102). Im Zellkern befinden sich Proteasomen im gesamten Nukleoplasma, wobei sie sich in subnukleären Strukturen wie Kernsprenkel (*eng.: nuclear speckles*) (103), PML-Kernkörpern (Promyelozytische Leukämie) (104-106) und Clastosomen (107) konzentrieren. Nukleoli hingegen sind frei von Proteasomen. Der

Mangel an proteasomaler Aktivität definiert den Nukleolus als eine unwahrscheinliche Lokalisation für proteasomalen Proteinabbau, was nicht ausschließt, dass Nukleolarproteine anderswo im Zellkern abgebaut werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen und den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit kann vermutet werden, dass HR23B an der Erkennung von nicht-zusammengesetzten ribosomalen Proteinen im Nukleolus beteiligt sein könnte und sie in andere subzelluläre Kompartimente mit proteasomaler Aktivität weiterleitet. Die durchgeführte Reactome-Analyse unter dem Stichwort „ribosomale Proteine“ zeigte insbesondere die im Zellkern vorkommenden ribosomalen Proteine als Bindungspartner von HR23B (RPS11, RPS2, RPS3A, RPS5, RPS14, RPS14A, RPS23, RPS16, RPS8). Durch IF-Doppelfärbungen mit Nucleolin konnte das Vorkommen von HR23B in Nukleoli bestätigt werden. Möglicherweise könnte HR23B an der dynamischen Bewegung von ribosomalen Proteinen in und aus den Nukleoli beteiligt sein. Eine Studie zeigte, dass ribosomale Proteine zwar hauptsächlich in den Nukleoli akkumulieren, aber auch kontinuierlich zwischen den Nukleoli und anderen Kernbereichen wechseln (96). Möglicherweise könnte HR23B eine regulatorische Rolle bei diesem Prozess einnehmen.

Die Unterschiede in den Lokalisationsmustern der beiden anti-HR23B-Antikörper könnte auch auf unterschiedliche Affinitäten und Spezifitäten der Antikörper zurückgeführt werden. Es ist bekannt, dass verschiedene Antikörper unterschiedliche Epitope eines Proteins erkennen können, was zu unterschiedlichen Färbemustern führen kann. Es ist auch vorstellbar, dass HR23B in verschiedenen Zellkompartimenten unterschiedliche Konformationen annimmt, die von den verschiedenen Antikörpern erkannt werden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der IF-Mikroskopie zeigte die Kern-Zytoplasma-Trennung mit anschließender Fraktionsanalyse eine erhöhte Menge an HR23B im Zytoplasma im Vergleich zur Kernfraktion. Dies deutet darauf hin, dass HR23B im Zytoplasma möglicherweise eine erhöhte Aktivität oder eine größere Anzahl an Zielproteinen aufweist, die es erkennt und zum Proteasom transportiert. Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse der IF-Mikroskopie auf einer direkten visuellen Beobachtung der Proteinverteilung basieren, während die Kern-Zytoplasma-Trennung eine quantitative Analyse der Proteinmengen in den beiden Kompartimenten ermöglicht. Es besteht die Möglichkeit, dass die IF-Mikroskopie aufgrund von Unterschieden in der Fluoreszenzintensität oder der Detektionsgrenzen der verwendeten Antikörper zu einer Über- oder Unterschätzung der tatsächlichen Proteinmenge geführt hat.

Eine weitere Erklärung für die Diskrepanz könnte darin liegen, dass sich die Lokalisation von HR23B Zellzyklus-abhängig verändert. Katiyar et al. führten 2005 bereits Studien über

die intrazelluläre Lokalisation von HR23B in Abhängigkeit zum Zellzyklus durch. In ihren Untersuchungen wurde festgestellt, dass HR23B während der G1-Phase sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorhanden ist. Darüber hinaus wurde die Konzentration von HR23B im Zellkern während der S-Phase deutlich geringer. Während der Mitose war HR23B nur im Zytoplasma vorhanden und nicht mit dem Chromatin assoziiert (66). Die G1-Phase des Zellzyklus ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Translation und eine erhöhte Proteinsynthese. Um in dieser Phase fehlgefaltete Proteine schnell zu erkennen und die Bildung von Proteinaggregaten zu verhindern, ist ein effizientes Proteinqualitätsmanagement nötig. Die erhöhte Präsenz von HR23B im Zellkern während der G1-Phase, einer Phase intensiver RNA- und Proteinsynthese, könnte darauf hinweisen, dass HR23B eine Rolle bei der Regulierung dieses Prozesses spielt. Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass HR23B während dieses zellulären Stadiums eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Abbaus ribosomaler Proteine und der Translation spielen könnte. In zukünftigen Arbeiten sollte eine zellzyklusabhängige Lokalisationsstudie von HR23B durchgeführt werden. Diese Studie könnte ein tieferes Verständnis für die Regulation und Funktion von HR23B in verschiedenen Phasen des Zellzyklus liefern. Die Untersuchung der zellzyklusabhängigen Lokalisation von HR23B könnte auch wichtige Einblicke in die zugrunde liegenden Mechanismen für die unterschiedliche Verteilung von HR23B zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma liefern. Es wäre interessant, die Proteininteraktionen von HR23B in Abhängigkeit vom Zellzyklus zu analysieren und spezifische Bindungspartner im Nukleus und im Zytoplasma zu identifizieren. Darüber hinaus könnten posttranslationale Modifikationen von HR23B in verschiedenen Zellzyklusphasen untersucht werden, um zu verstehen, wie diese Modifikationen die Lokalisation und Funktion von HR23B beeinflussen. Zusätzlich könnten experimentelle Ansätze wie Live-Cell-Imaging eingesetzt werden, um die dynamischen Veränderungen der HR23B-Lokalisation im Laufe der Zeit zu erfassen und besser zu verstehen. Durch die Beobachtung von HR23B in Echtzeit könnten die Bewegungsmuster und Wechselwirkungen von HR23B mit anderen Proteinen in verschiedenen zellulären Kompartimenten untersucht werden.

Ribosomen sind zelluläre Maschinen, die für die Translation von mRNA in Proteine verantwortlich sind und spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression (52). Somit stellen sie eine entscheidende Komponente im gesamten Stoffwechsel der Zelle dar. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (D. Panfilova, in ihrer Bachelorarbeit) zeigten, dass HR23B-Knockout-Zelllinien (HR23B^{KO}) eine signifikante Abnahme der Zellproliferation sowie der Zellviabilität aufwiesen und somit Einfluss auf den Zellmetabolismus nehmen. Die genauen Auswirkungen von HR23B auf den

Zellmetabolismus sind jedoch noch unklar. Die schnelle Bildung von Ribosomen stellt einen potentiell schädlichen Prozess dar, der hauptsächlich auf die Akkumulation von nicht-assemblierten RP zurückzuführen ist (108, 109). Deshalb hat die Zelle Mechanismen entwickelt, um die Expression von ribosomalen Proteinen bei Störungen im Ribosomenaufbau schnell zu reduzieren. Auf diese Weise kann Energie eingespart und die zelluläre Proteostase wiederhergestellt werden. Albert et al. beschrieben einen neuartigen Regulationsweg in Hefezellen, der bei gestörter Ribosomengenese (rRNA-Produktion, Verabreichung- und Assemblierung von RP) zu einer Hochregulierung von Genen der Proteinhomöostase (z.B. Chaperone) und einer Herunterregulierung der Expression von RP-Genen führt. Dieser Regulationsweg wurde als *Ribosomal Assembly Stress Response* (RASTR) bezeichnet (110) und ermöglicht Hefezellen die Koordination der Aktivität zweier Transkriptionsfaktoren (TF): Hsf1 und Ifh1. Dabei soll die Kernkonzentration von nicht zusammengebauten RP als Information dienen für die Expression von RP-Genen (über die Regulierung des Transkriptionsfaktors Ifh1) und Hsf1-Zielgenen, so dass die Zelle ein Gleichgewicht zwischen Wachstum und Proteinhomöostase herstellen kann (110). Unter verschiedenen Stressbedingungen erhöht sich die Menge an nicht zusammengesetzten ribosomalen Proteinen. Diese Proteine sammeln sich gemeinsam mit Ifh1 und Chaperonen in einer unlöslichen Kern- oder Nukleolarfraktion. Dies führt vermutlich durch Hsp70-Titration zu einer raschen Hochregulierung von Hsf1-Zielgenen (wie Chaperone und Proteasom-Komponenten) und gleichzeitig durch Ifh1-Sequestrierung zu einer Herunterregulierung von RP-Genen (110). Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss von HR23B-Überexpression auf die Translationsrate von U2OS-Zellen. HR23B-Überexpression führte zu einer erhöhten Menge an puromycylierten Peptiden, was auf eine gesteigerte Translationsrate hindeutet. Dies lässt vermuten, dass HR23B eine Rolle bei der Regulierung der Translation einnehmen könnte. Möglicherweise erfolgt dies durch Modulation der Abbaurate von ribosomalen Proteinen über das Proteasom und einer erhöhten Menge an assemblierten funktionellen Ribosomen. Zudem wurden in der Arbeitsgruppe Experimente mit HR23B^{KO} Zelllinien durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Translationsrate in HR23B^{KO} Zelllinien. Diese Befunde könnten eine Funktion von HR23B bei der Regulierung der Translation aufzeigen, welche über den effizienten Abbau von überzähligen ribosomalen Proteinen vermittelt wird. Möglicherweise wird die Expression von HR23B über den Transkriptionsfaktor Hsf1 reguliert und bei erhöhtem Anfall überschüssiger RP hochreguliert. Eine HR23B-Überexpression würde in diesem Mechanismus über den Transkriptionsfaktor Ifh1 zu einer Hochregulierung von ribosomalen Proteinen und damit der Translationsrate führen.

Die Identifizierung von ribosomalen Proteinen als potentielle Interaktionspartner von HR23B stellt einen neuen Aspekt in unserem Verständnis der Funktion dieses Proteasom-Shuttling-Proteins dar. Die Entdeckung der Interaktion zwischen HR23B und ribosomalen Proteinen weist auf eine möglicherweise bisher unbekannte Rolle von HR23B in der Regulation der Proteinsynthese hin. Es ist anzumerken, dass die Identifikation von ribosomalen Proteinen als Interaktionspartner von HR23B zusätzliche Untersuchungen erfordert, um die spezifischen Mechanismen und Funktionen dieser Interaktion zu klären. Es ist denkbar, dass HR23B möglicherweise beschädigte oder fehlerhafte ribosomale Proteine erkennt und zu ihrem Abbau oder Reparatur beiträgt. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Interaktionen müssen in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Die Entdeckung von HR23B als möglichen Faktor bei der Regulierung des Abbaus von ribosomalen Proteinen eröffnet neue Perspektiven für die Erforschung der Rolle von HR23B in der Zellhomöostase und möglicherweise Erkrankungen, bei denen eine gestörte Ribosomenbiogenese und Proteinqualitätskontrolle eine Rolle spielen. Defekte in der Biogenese der Ribosomen, der Translation und der Funktion einzelner ribosomaler Proteine, einschließlich Mutationen in diesen, wurden bei verschiedenen angeborenen Störungen beim Menschen beobachtet, die als Ribosomopathien bezeichnet werden (111) (112). Diese Störungen sind durch gewebespezifische phänotypische Anomalien und einem erhöhten Krebsrisiko im späteren Leben gekennzeichnet (113, 114). In Tumorgewebe wurde bereits beobachtet, dass die Expression von RPL6 verändert ist und dass RPL6 und HDM2 den Spiegel des Tumorsuppressors p53 in Reaktion auf ribosomalen Stress stabilisieren (115). In multi-drug resistenten Magenkrebszellen ist RPL6 hochreguliert und die Überexpression von RPL6 korreliert mit einer niedrigen Gesamtüberlebensrate bei Krebspatienten (116). Darüber hinaus zeigten Wu et al. 2011, dass die genetische Herunterregulierung von RPL6 in Magenkrebszellen die Fähigkeit zur Koloniebildung *in vitro* verringert, das Krebswachstum *in vivo* reduziert und die Zellzyklusprogression durch die Herunterregulierung von Cyclin E stoppt (116). Wenn HR23B tatsächlich bei dem proteasomalen Abbau ribosomaler Proteine eine Rolle spielt, könnte eine Überexpression von HR23B in Magenkrebszellen möglicherweise zu einem erleichterten Abbau von RPL6 führen. Zudem konnte in Lungenkrebszellen gezeigt werden, dass eine Verringerung der RPL6-Aktivität die Proliferation und Migration von Krebszellen hemmt und die Apoptose der Zellen fördert (117). Auch hier könnte HR23B möglicherweise diesen Prozess begünstigen. Die Identifizierung von HR23B als möglicher Interaktionspartner von ribosomalen Proteinen eröffnet daher neue Forschungsperspektiven, um das

Zusammenspiel zwischen der Proteinsynthese und der Proteinqualitätskontrolle besser zu verstehen. Weitere Untersuchungen auf diesem Feld sind jedoch nötig, um diesen Zusammenhang zu bestätigen.

In einigen Krebsarten konnte eine Rolle von HDACs bei der Krebsentstehung gezeigt werden, indem sie Einfluss auf die Progression des Zellzyklus und die Transkription nehmen. Darüber hinaus spielen HDACs eine Rolle bei der Krebsentstehung und -regulierung, da sie an den Mechanismen der Apoptose und der Autophagie beteiligt sind (118, 119). Diese tumorfördernden Wirkungen können durch HDAC-Inhibitoren verhindert werden, die die Histondeacetylierung blockieren und dadurch die Zellproliferation und -migration (120) hemmen sowie den Zellzyklus-Stillstand (121) und die Apoptose von Krebszellen einleiten (122). Bei einigen Krebsarten haben HDAC-Inhibitoren bereits *in vitro* und *in vivo* eine antitumorale Wirkung gezeigt (123). SAHA gehört zu der Gruppe der HDACi und wurde 2006 erstmalig für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTLC) von der FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassen (124). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Behandlung von U2OS-Zellen mit SAHA zu einer Abnahme der HR23B-Expression führte. Im Jahr 2009 konnten Fotheringham et al. ebenfalls eine Verringerung der HR23B-Expression nach der Behandlung mit SAHA feststellen. Sie beschrieben eine Rolle von HR23B in der durch HDACi ausgelösten Apoptose. Zusätzlich fanden sie eine Korrelation zwischen den HR23B-Leveln und dem Therapieerfolg von SAHA (125). Khan et al. bestätigten 2010 einen Zusammenhang zwischen HR23B-Leveln und der Empfindlichkeit von CTCL-Zellen gegenüber HDAC-Inhibitoren (126). Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse daraufhin, dass HR23B bei CTCL-Zelllinien die Empfindlichkeit gegenüber der durch HDACi ausgelösten Apoptose beeinflusst. Zudem führte die Veränderung des HR23B-Spiegels in CTCL-Zellen zu einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber den Wirkungen von HDACi (126). Darüber hinaus beschrieben sie HR23B als einen nützlichen Biomarker für die Identifizierung von Tumoren, die positiv auf HDAC-Inhibitoren ansprechen (126). In einer Studie von New et al. 2013 wurde HR23B zusammen mit HDAC6 und Hsp90 als eine Biomarker-Signatur beschrieben, die die Fähigkeit besitzt, Tumoren mit unterschiedlichen Prognosen zu unterscheiden (63). Die Studie zeigte, dass hohe HR23B-Spiegel in Tumorzellen unter HDACi-Therapie zur Apoptose führten. In Zellen mit niedriger HR23B-Expression war eine Korrelation zwischen HDAC-Inhibitor-Behandlung und Autophagie zu beobachten. HDAC6 wurde als negativer Regulator von HR23B identifiziert, der über HR23B auf die proteasomale Aktivität einwirkt. Das Gleichgewicht zwischen HR23B und HDAC6 ist entscheidend, um die Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf Tumorzellen zu bestimmen (63).

Die Ergebnisse von Fotheringham et al. und New et al. liefern somit wichtige Erkenntnisse über die Wechselwirkung zwischen HR23B und HDAC-Inhibitoren. Es wird deutlich, dass HR23B eine Rolle bei der Sensibilisierung von Tumorzellen für Apoptose spielt, während HDAC6 als Gegenspieler wirkt und die pro-apoptotische Aktivität von HR23B herunterregulieren kann. Das Gleichgewicht zwischen HR23B und HDAC6 scheint entscheidend zu sein, um die Effektivität von HDAC-Inhibitoren in der Krebstherapie zu bestimmen. Diese Erkenntnisse sind von möglicher Bedeutung für die Entwicklung individualisierter Krebsbehandlungsansätze.

Für die Analyse von Interaktionspartnern ist die Kombination aus Co-IP und Massenspektrometrie eine etablierte Methode (127). Gegenüber der Analyse mittels SDS-PAGE und Immunodetektion, bei dem für jedes Protein ein Antikörper verfügbar sein muss und einzeln getestet wird, stellt die Massenspektrometrie einen ungerichteten Ansatz dar. Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung ist ein hohes Vorkommen von HR23B im Zellysat. Aufgrund der hohen nativen Expression von HR23B in U2OS-Zellen war es möglich, Co-Immunpräzipitationsexperimente mit endogenem HR23B ohne induzierte Überexpression (Tet-On System) durchzuführen. Neben der guten endogenen Expression von HR23B wurden U2OS-Zellen als geeignete Zelllinie ausgewählt, da HR23B in diesem Zelltyp bereits in früheren Studien untersucht worden war (63). Die massenspektrometrische Analyse bestätigte HR23B als das Zielprotein, das in der IP angereichert wurde. Die hohe Korrelation der beiden biologischen Replikate wurde durch den Pearson-Korrelationskoeffizienten mit einem Wert von 0,82 bestätigt. Zusätzlich konnte über die Durchführung von verschiedenen Signalweg-Analysen bekannte Interaktionspartner von HR23B identifiziert und mit den Datenbankinformationen aus der BioGRID-Datenbank abgeglichen werden. Eine Einschränkung der durchgeführten Co-IP mit massenspektrometrischer Auswertung besteht darin, dass nicht zwischen direkten und indirekten Interaktionen unterschieden werden kann. Gerade diese Unterscheidung ist jedoch wichtig, um die spezifischen Rollen der einzelnen Interaktionspartner besser verstehen zu können. Die fehlende Information über direkte und indirekte Interaktionen stellt daher eine Limitation dieser Arbeit dar. Um in zukünftigen Experimenten wichtige Quervernetzungen und Interaktionsnetzwerke der Proteine zu erfassen, bietet sich das *Crosslinking* (128) oder die Methode des *Topology Mappings* an. Diese Methode ermöglicht es, die identifizierten Bindungspartner als direkte oder indirekte Interaktoren, anderen Proteinen oder Proteinmodule, zuzuordnen und graphisch darzustellen (129). Durch den Nachweis von quervernetzten Peptiden kann sowohl die Existenz einer Interaktion zwischen zwei Proteinen bestätigt werden als auch die Bereiche innerhalb der Proteine, in

denen die Interaktion stattfindet, näher bestimmt werden. Eine weitere Limitation ist die fehlende Validierung. Die Identifizierung potentieller Bindungspartner durch Co-Immunpräzipitation und Massenspektrometrie liefert zunächst nur Hinweise auf mögliche Interaktionen. Eine anschließende funktionale Validierung ist erforderlich, um die biologische Relevanz dieser Interaktion zu bestätigen. Obwohl die Massenspektrometrie eine hohe Durchsatzrate hat, kann die Identifizierung von Bindungspartnern von HR23B begrenzt sein, insbesondere, wenn diese in geringen Mengen oder mit niedriger Affinität mit HR23B interagieren. Zusammenfassend ist die Co-Immunpräzipitation in Kombination mit massenspektrometrischen Untersuchungen eine wertvolle Methode zur Identifizierung potentieller Bindungspartner von HR23B. Sie bietet eine weitreichende Analyse von Proteininteraktionen, aber erfordert zusätzliche funktionale Validierung um spezifische Interaktionen zu bestätigen und nicht spezifische Bindungen auszuschließen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Signalweg-Analyse „Proteinqualitätskontrolle“ identifizierte SQSTM1 unter den Interaktionspartnern. SQSTM1 und HR23B besitzen Ubiquitin-assoziierte Domänen (UBA) und erkennen darüber ubiquitinierte Proteine. Beide Proteine werden daher der Gruppe der UBL/UBA-Proteine zugeschrieben. Jedoch ist ihre funktionelle Rolle in Bezug auf den Proteinabbau unterschiedlich: HR23B gehört zu den proteasomalen Shuttle-Proteinen, während SQSTM1 als autophagisches Shuttle-Protein beschrieben wird (38). Diese Kenntnis wirft die Frage auf, ob autophagische und proteasomale Proteine möglicherweise durch die gemeinsame UBL/UBA-Bindungsdomäne überschneidende Funktionen haben könnten. Es ist denkbar, dass sie bestimmte Zielproteine gemeinsam erkennen und zu unterschiedlichen Abbauwegen leiten, je nach den spezifischen Bedingungen der Zelle. Sie könnten auch zum Hoch- oder Runterregulieren der einzelnen Abbausysteme beitragen, wenn das jeweils andere gestört ist. Die Acetylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Autophagie und könnte auch bei der Modulation der Interaktionen zwischen Shuttle-Proteinen und ubiquitinierten Substraten beteiligt sein. Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die HR23B-Expression unter Hyperacetylierung der Zelle durch SAHA-Behandlung abnimmt. Möglicherweise nimmt der allgemeine proteasomale Abbau in der Zelle durch Hyperacetylierung ab. Studien haben gezeigt, dass Acetylierung eine wichtige regulatorische Rolle bei der Autophagie spielt, indem sie die Initiierung der Autophagie und die Bildung von Autophagosomen beeinflusst (130). Sie wirkt auf wichtige Komponenten wie den ULK1-Komplex, den BECN1-PIK3C3-Komplex und das LC3-Lipidierungssystem (131-133). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Schlüsselproteine wie SQSTM1/p62 und STX17, die an der Autophagosomen-Lysosomen-Fusion beteiligt sind, acetyliert werden

(134, 135). Die Acetylierung der UBA-Domäne von SQSTM1 (autophagisches Shuttle-Protein) stört die intermolekulare Dimerisierung, wodurch die Affinität dieser Domäne für ubiquitinierte Substrate erhöht wird (47, 136). Durch die Störung der Dimerisierung wird die Bindung von SQSTM1 an ubiquitinierte Substrate verbessert, was wiederum die SQSTM1-vermittelte Autophagie fördert (134). Angesichts der Tatsache, dass UBA- oder UBA-ähnliche Domänen auch in anderen Shuttle-Proteinen und Autophagie-Rezeptoren vorhanden sind, ist es möglich, dass die Acetylierung ein genereller Mechanismus ist, um die Affinität zu ubiquitinierten Substraten zu erhöhen. Schließlich kann man vermuten, dass die Behandlung mit HDACi einerseits zu einer Abnahme von HR23B führt, und andererseits durch eine veränderte Affinität in der UBA-Domäne zu einer Hochregulierung der Autophagie führen kann. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreiche Klonierung von SQSTM1 in U2OS-Zellen kann den Grundbaustein für weitere Untersuchungen des Bindungspartnerprofils der einzelnen Shuttling-Faktoren legen. Neben einer Bande auf Höhe von 48 kDa, die sowohl mit dem anti-p62 Antikörper als auch mit dem neu etablierten Flag-Tag detektiert werden konnte, zeigte sich eine zusätzliche Bande. Dies könnten verschiedene Spleißvarianten oder Abbauprodukte von SQSTM1 sein. Da durch den Flag-Antikörper gleiche Banden, außer der auf Höhe von 35 kDa gefunden wurden, ist von unterschiedlichen Spleißvarianten oder Abbauprodukten auszugehen. Für die Shuttling-Faktoren NUB1, UBAC1, UBQLN1 und UBQLN4 wurden Primerpaare entwickelt und verschiedene PCR-Bedingungen getestet. Insbesondere bei der Gestaltung des *reverse* Primers führte die Länge durch den integrierten Flag-Tag und die Linker Sequenz zu veränderten *annealing*-Temperaturen und Schwierigkeiten bei der PCR-Amplifikation. Die erfolgreiche Klonierung der übrigen Shuttling-Faktoren erfordert daher zusätzliche Bemühungen und Optimierungen der PCR-Bedingungen. Die anschließende Co-IP und massenspektrometrische Untersuchung muss in weiteren Experimenten vervollständigt werden. Dieses Vorgehen könnte in weiteren Arbeiten für alle Ub-Rezeptorproteine durchgeführt werden, um ein besseres Verständnis über die Erkennungsprofile und Wechselwirkungen zwischen UPS und Autophagie zu erlangen. Diese dynamische Koordination zwischen Proteasom und Autophagie könnte eine flexible und effiziente Proteinqualitätskontrolle ermöglichen, um auf verschiedene Stressbedingungen zu reagieren und die Proteinhomöostase aufrechtzuerhalten (137).

Die Signalweg-Analyse "Proteinfaltung" zeigte eine Interaktion von HR23B mit verschiedenen Chaperonen, darunter HSP90AB1, HSPA8, CCT6A, CCT5 und CCT8. Insbesondere die Verbindung zu den Chaperonin-Untereinheiten des TCP1-Ringkomplexes (TRiC) ist bemerkenswert. Der TRiC-Komplex spielt eine wesentliche Rolle bei der Faltung

von Proteinen und der Verhinderung ihrer Aggregation (138). Die Identifizierung von HR23B in Verbindung mit Chaperonen wie HSP90A1, HSPD1, HSPA5, HSP90B1, HSPA6, HSPA7, HSPA9 und HSPE1 erweitert das Verständnis für die Beteiligung von HR23B an der Proteinfaltung. Die Identifizierung dieser Interaktionen legt nahe, dass HR23B eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Proteinfaltung und der Vermeidung von Proteinaggregation spielt, indem es mit verschiedenen Chaperonen in Wechselwirkung tritt. Diese neuen Erkenntnisse erweitern unser Verständnis über die Funktion von HR23B im zellulären Proteostase-Netzwerk und deuten auf eine komplexe Regulierung der Proteinfaltung hin, bei der HR23B eine Rolle einnimmt.

Neben der Frage, welche Proteine HR23B bei dem proteasomalen Abbau unterstützt, sollte der Abbauweg von HR23B selbst näher untersucht werden. Durch die Behandlung mit einem Translationshemmer (Cycloheximid) wurde die Halbwertszeit von HR23B ermittelt, welche etwa 16 - 24 h betrug. Da längere Inkubationszeiten mit Cycloheximid potentiell zytotoxisch sein können, konnten konstante Proteinkonzentrationen nicht immer eingestellt werden. Dies zeigte sich in der Actin Ladekontrolle, welche abweichende Proteinmengen zeigte. Es benötigt weitere biologische Replikate, um die HWZ von HR23B zu validieren. Für die Untersuchung des Abbauweges von HR23B wurde der Proteasom-Inhibitor Bortezomib, sowie der Autophagie-Inhibitor Bafilomycin getestet. Der Proteasom-Inhibitor bindet an das 26S Proteasom und blockiert selektiv die proteolytische Aktivität. Bortezomib hat dabei die Besonderheit, dass es für die Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt wird (139). Die Ergebnisse zeigen keinen eindeutigen Abbauweg über das Proteasom oder die Autophagie. Weitere Experimente sind erforderlich, um genaue Aussagen treffen zu können.

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und die Autophagie sind entscheidende Pfade der zellulären Qualitätskontrolle. Diese Wege existieren nicht isoliert, sondern kooperieren und interagieren auf verschiedenen Ebenen. Diese Form der gegenseitigen Beeinflussung ist bereits beschrieben, insbesondere bei Beeinträchtigung des Proteasoms, was eine kompensatorische Aktivierung der Autophagie zur Folge hat. Es gibt mehrere Mechanismen, die zu diesem Effekt beitragen. Dazu zählt zum Beispiel die erhöhte Transkription von p62/SQSTM1 durch Stabilisierung von ATF4, einem Transkriptionsfaktor (140). ATF4 reguliert die Transkription autophagischer Gene als Reaktion auf Aminosäuremangel, ER (endoplasmatisches Retikulum)-Stress und auch auf proteasomale Hemmung (141). Eine Studie zeigte, dass in Zellen, die mit MG132 behandelt wurden, eine erhöhte Menge an p62/SQSTM1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen werden konnte. Es wurde eine Co-Lokalisation von p62 mit Ubiquitin in den Aggregaten verstärkt beobachtet,

die durch die Hemmung des Proteasoms verursacht wurde (142). Das erhöhte Vorkommen von p62 in Zellen bei MG132-Behandlung unterstützt die Vorstellung, dass p62 in Situationen erhöhter Proteasom-Hemmung eine Rolle bei der Kanalisierung ubiquitinerter Substrate in den autophagischen Abbauweg spielen könnte. Dieses Phänomen könnte als eine Art kompensatorischer Mechanismus betrachtet werden, der die Zelle befähigt, alternative Abbauege zu nutzen, um Proteine zu eliminieren, die normalerweise dem Proteasom zugeführt werden.

Insgesamt konnten die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation ribosomale Proteine als Interaktionspartner von HR23B identifizieren und ein gemeinsames Vorkommen in der Zelle zeigen. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von HR23B bei dem Abbau überschüssiger ribosomaler Proteine im Nukleolus hin. Damit erweitern die vorliegenden Ergebnisse das Verständnis der Funktion von HR23B im Ubiquitin-Proteasom-System. Die gewonnenen Erkenntnisse vertiefen das Wissen über die Mechanismen der zellulären Proteinqualitätskontrolle. Dies könnte neue Forschungsansätze eröffnen, die zur Klärung der Entstehungsmechanismen von Proteinopathien beitragen und damit als Grundlage für mögliche Therapieansätze dienen.

6 Zusammenfassung

Proteasom-Shuttling-Faktoren wie HR23B spielen bei der Erkennung und dem Transport von ubiquitinierten Proteinen zum Proteasom eine wesentliche Rolle. Bislang sind die Bindungspartner, die von HR23B erkannt werden, noch wenig erforscht. Die vorliegende Dissertation umfasste die Charakterisierung von HR23B und seinen Interaktionspartnern im Kontext des Ubiquitin-Proteasom-Systems.

Hierzu wurden Co-Immunpräzipitationen mit endogenem HR23B in U2OS-Zellen erfolgreich durchgeführt. Als bisher unbekannte Interaktionspartner von HR23B wurden die ribosomalen Proteine der großen Untereinheit (RPL22L1, RPL4, RPL13A, RPL13) sowie der kleinen Untereinheit (RPS19, RPS2) in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert. Daneben konnten Hitzeschockproteine (HSP90A1, HSPD1, HSPA5, HSP90B1, HSPA6, HSPA7, HSPA9 und HSPE1) in Vorversuchen als bisher unbekannte Interaktionspartner beschrieben werden.

Weiterhin wurden bereits bekannte Interaktionspartner bestätigt. Dies umfasste Proteine der Proteasom-Untereinheiten, der Ubiquitin-assoziierten Domäne sowie andere Shuttleing-Faktoren (z.B. PSMD12, UBA6, UBQLN1). Aus der funktionellen Gruppe der Nukleotidexzisionsreparatur-Proteine wurde eine Interaktion mit XPC, RAD23A und MLH1 bestätigt.

STRING-Interaktionsanalysen demonstrierten eine Interaktion ribosomaler Proteine und HR23B, sowie einen indirekten Zusammenhang, welcher über proteasomale Untereinheiten vermittelt wurde. Am Beispiel von RPL5 (ribosomales Protein) konnte eine Co-Lokalisation mit HR23B im Nukleus von U2OS-Zellen nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der weiteren Charakterisierung von HR23B selbst zeigte sich ein Vorkommen im Zytoplasma und in Nukleoli von U2OS-Zellen, was einen möglichen Zusammenhang mit ribosomalen Proteinen ebenfalls andeutet. Quantitative Analysen zeigten eine Anreicherung von HR23B zugunsten des Zytoplasmas im Vergleich zur Kernfraktion.

Durch Hyperacetylierung infolge einer SAHA-Behandlung kam es zu einer Abnahme der HR23B-Expression. Eine Überexpression von HR23B durch das Tet-On System in U2OS-Zellen führte zu einer erhöhten Translationsrate. Zur Frage des Abbauweges von HR23B selbst zeigte sich, dass der Abbau weder durch Autophagie noch durch das Proteasom vorrangig reguliert wird.

Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass HR23B bei dem Abbau überschüssiger ribosomaler Proteine im Nukleolus assistiert, indem der Shuttleing-Faktor diese in nukleäre Bereiche mit Proteasom-Aktivität transportiert.

Als Grundlage für Untersuchungen des Bindungspartnerprofils von weiteren Shuttling-Faktoren wurde SQSTM1 (als Beispiel eines autophagischen Shuttling-Faktors) erfolgreich kloniert und in U2OS-Zellen exprimiert.

Insgesamt tragen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation dazu bei, das Verständnis der Funktion von HR23B im Ubiquitin-Proteasom-System zu erweitern. Die Identifizierung von ribosomalen Proteinen als Interaktionspartner zeigt einen neuen Aspekt von HR23B im Ubiquitin-Proteasom-System. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen somit zu einem tieferen Verständnis der zellulären Proteinqualitätskontrolle bei und könnten zukünftige Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet vorantreiben, zum Beispiel für mögliche Therapieansätze bei Proteinopathien.

7 Literaturverzeichnis

1. Ponomarenko EA, Poverennaya EV, Ilgisonis EV, Pyatnitskiy MA, Kopylov AT, Zgoda VG, Lisitsa AV, Archakov AI. The Size of the Human Proteome: The Width and Depth. *Int J Anal Chem.* 2016;2016:7436849.
2. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW. Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science.* 2008;319(5865):916-919.
3. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol.* 2018;217(1):51-63.
4. Kulka LAM, Fangmann PV, Panfilova D, Olzscha H. Impact of HDAC Inhibitors on Protein Quality Control Systems: Consequences for Precision Medicine in Malignant Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:425.
5. Hipp MS, Park SH, Hartl FU. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol.* 2014;24(9):506-514.
6. Venne AS, Kollipara L, Zahedi RP. The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics.* 2014;14(4-5):513-524.
7. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 1995;16(7):1090-1094.
8. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ, Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005;44(45):7342-7372.
9. Khoury GA, Baliban RC, Floudas CA. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports.* 2011;1(1):90.
10. Ryšlavá H, Doubnerová V, Kavan D, Vaněk O. Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. *J Proteomics.* 2013;92:80-109.
11. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science.* 2016;353(6294):aac4354.
12. Allfrey VG. Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Can Cancer Conf.* 1966;6:313-335.
13. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964;51(5):786-794.
14. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene.* 2005;363:15-23.
15. Olzscha H. Posttranslational modifications and proteinopathies: how guardians of the proteome are defeated. *Biological Chemistry.* 2019;400(7):895-915.

16. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-479.
17. Komander D, Rape M. The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:203-229.
18. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo j.* 2000;19(1):94-102.
19. Naseri NN, Wang H, Guo J, Sharma M, Luo W. The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2019;705:183-194.
20. Caron C, Boyault C, Khochbin S. Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *BioEssays.* 2005;27(4):408-415.
21. Wang X, Pattison JS, Su H. Posttranslational Modification and Quality Control. *Circulation Research.* 2013;112(2):367-381.
22. Laskey RA, Honda BM, Mills AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature.* 1978;275(5679):416-420.
23. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature.* 2011;475(7356):324-332.
24. Melino G, on behalf of The E. Discovery of the ubiquitin proteasome system and its involvement in apoptosis. *Cell Death & Differentiation.* 2005;12(9):1155-1157.
25. Ciechanover A. The unravelling of the ubiquitin system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(5):322-324.
26. Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1997;386(6624):463-471.
27. Tanaka K. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009;85(1):12-36.
28. Schreiner P, Chen X, Husnjak K, Randles L, Zhang N, Elsasser S, Finley D, Dikic I, Walters KJ, Groll M. Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature.* 2008;453(7194):548-552.
29. Husnjak K, Elsasser S, Zhang N, Chen X, Randles L, Shi Y, Hofmann K, Walters KJ, Finley D, Dikic I. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature.* 2008;453(7194):481-488.
30. Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature.* 2009;458(7237):422-429.
31. Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:291-322.
32. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451(7182):1069-1075.

33. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007;131(6):1149-1163.
34. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annual Review of Biochemistry*. 2017;86(1):193-224.
35. Madura K. Rad23 and Rpn10: perennial wallflowers join the m el e. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004;29(12):637-640.
36. Deveraux Q, Ustrell V, Pickart C, Rechsteiner M. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*. 1994;269(10):7059-7061.
37. Hartmann-Petersen R, Gordon C. Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(2):247-259.
38. Zientara-Rytter K, Subramani S. The Roles of Ubiquitin-Binding Protein Shuttles in the Degradative Fate of Ubiquitinated Proteins in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Cells*. 2019;8(1).
39. Wilkinson CR, Seeger M, Hartmann-Petersen R, Stone M, Wallace M, Semple C, Gordon C. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol*. 2001;3(10):939-943.
40. Elsasser S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, M uller B, Feng MT, T ubing F, Dittmar GA, Finley D. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol*. 2002;4(9):725-730.
41. Walters KJ, Kleijnen MF, Goh AM, Wagner G, Howley PM. Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry*. 2002;41(6):1767-1777.
42. Mueller TD, Kamionka M, Feigon J. Specificity of the interaction between ubiquitin-associated domains and ubiquitin. *J Biol Chem*. 2004;279(12):11926-11936.
43. Watkins JF, Sung P, Prakash L, Prakash S. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. *Mol Cell Biol*. 1993;13(12):7757-7765.
44. Dantuma NP, Heinen C, Hoogstraten D. The ubiquitin receptor Rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation. *DNA Repair (Amst)*. 2009;8(4):449-460.
45. Saeki Y, Sone T, Toh-e A, Yokosawa H. Identification of ubiquitin-like protein-binding subunits of the 26S proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;296(4):813-819.
46. Rosenzweig R, Osmulski PA, Gaczynska M, Glickman MH. The central unit within the 19S regulatory particle of the proteasome. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(6):573-580.
47. Raasi S, Varadan R, Fushman D, Pickart CM. Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(8):708-714.

48. Rao H, Sastry A. Recognition of Specific Ubiquitin Conjugates Is Important for the Proteolytic Functions of the Ubiquitin-associated Domain Proteins Dsk2 and Rad23*. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(14):11691-11695.
49. Chen L, Madura K. Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol*. 2002;22(13):4902-4913.
50. Su V, Lau AF. Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(17):2819-2833.
51. Lewis JD, Tollervey D. Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *Science*. 2000;288(5470):1385-1389.
52. Tate WP, Poole ES. The ribosome: lifting the veil from a fascinating organelle. *Bioessays*. 2004;26(5):582-588.
53. Cmarko D, Smigova J, Minichova L, Popov A. Nucleolus: the ribosome factory. *Histol Histopathol*. 2008;23(10):1291-1298.
54. de la Cruz J, Karbstein K, Woolford JL, Jr. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:93-129.
55. Petibon C, Malik Ghulam M, Catala M, Abou Elela S. Regulation of ribosomal protein genes: An ordered anarchy. *WIREs RNA*. 2021;12(3):e1632.
56. Sung MK, Reitsma JM, Sweredoski MJ, Hess S, Deshaies RJ. Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell*. 2016;27(17):2642-2652.
57. Pillet B, Mitterer V, Kressler D, Pertschy B. Hold on to your friends: Dedicated chaperones of ribosomal proteins. *BioEssays*. 2017;39(1):e201600153.
58. Gossen M, Bujard H. Tetracyclines in the control of gene expression in eukaryotes. In: Nelson M, Hillen W, Greenwald RA, editors. *Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine*. Basel: Birkhäuser Basel; 2001. p. 139-157.
59. Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr Gene Ther*. 2016;16(3):156-167.
60. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
61. Schmidt EK, Clavarino G, Ceppi M, Pierre P. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods*. 2009;6(4):275-277.
62. Sambrook J, Fritsch, E. R., & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989;2nd ed. .
63. New M, Olzscha H, Liu G, Khan O, Stimson L, McGouran J, Kerr D, Coutts A, Kessler B, Middleton M, La Thangue NB. A regulatory circuit that involves HR23B and HDAC6 governs the biological response to HDAC inhibitors. *Cell Death Differ*. 2013;20(10):1306-1316.
64. Masutani C, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T, Takio K, Tanaka K, van der Spek PJ, Bootsma D, et al. Purification and cloning of a nucleotide excision

- repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *Embo j.* 1994;13(8):1831-1843.
65. van der Spek PJ, Eker A, Rademakers S, Visser C, Sugasawa K, Masutani C, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH. XPC and human homologs of RAD23: intracellular localization and relationship to other nucleotide excision repair complexes. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(13):2551-2559.
 66. Katiyar S, Lennarz WJ. Studies on the intracellular localization of hHR23B. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2005;337(4):1296-1300.
 67. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature.* 2011;473(7347):337-342.
 68. Gillet LC, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev.* 2006;106(2):253-276.
 69. Maltseva EA, Rechkunova NI, Sukhanova MV, Lavrik OI. Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Modulates Interaction of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC-RAD23B with DNA via Poly(ADP-ribosyl)ation*. *Journal of Biological Chemistry.* 2015;290(36):21811-21820.
 70. Chen L, Madura K. Evidence for distinct functions for human DNA repair factors hHR23A and hHR23B. *FEBS Lett.* 2006;580(14):3401-3408.
 71. Thompson LH, Brookman KW, Jones NJ, Allen SA, Carrano AV. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol.* 1990;10(12):6160-6171.
 72. Giaccia AJ, Denko N, MacLaren R, Mirman D, Waldren C, Hart I, Stamato TD. Human chromosome 5 complements the DNA double-strand break-repair deficiency and gamma-ray sensitivity of the XR-1 hamster variant. *Am J Hum Genet.* 1990;47(3):459-469.
 73. Hjerpe R, Bett JS, Keuss MJ, Solovyova A, McWilliams TG, Johnson C, Sahu I, Varghese J, Wood N, Wightman M, Osborne G, Bates GP, Glickman MH, Trost M, Knebel A, Marchesi F, Kurz T. UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome. *Cell.* 2016;166(4):935-949.
 74. Gestaut D, Limatola A, Joachimiak L, Frydman J. The ATP-powered gymnastics of TRiC/CCT: an asymmetric protein folding machine with a symmetric origin story. *Curr Opin Struct Biol.* 2019;55:50-58.
 75. Sloan KE, Bohnsack MT, Watkins NJ. The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep.* 2013;5(1):237-247.
 76. Nagahama M, Hara Y, Seki A, Yamazoe T, Kawate Y, Shinohara T, Hatsuzawa K, Tani K, Tagaya M. NVL2 is a nucleolar AAA-ATPase that interacts with ribosomal protein L5 through its nucleolar localization sequence. *Mol Biol Cell.* 2004;15(12):5712-5723.
 77. Mauvezin C, Neufeld TP. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 2015;11(8):1437-1438.

78. Baßler J, Hurt E. Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annual Review of Biochemistry*. 2019;88(1):281-306.
79. Melnikov S, Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2012;19(6):560-567.
80. Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*. 1999;24(11):437-440.
81. Gorenstein C, Warner JR. Coordinate regulation of the synthesis of eukaryotic ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(5):1547-1551.
82. Warner JR, Gorenstein C. The synthesis of eucaryotic ribosomal proteins in vitro. *Cell*. 1977;11(1):201-212.
83. Warner JR. In the absence of ribosomal RNA synthesis, the ribosomal proteins of HeLa cells are synthesized normally and degraded rapidly. *J Mol Biol*. 1977;115(3):315-333.
84. Abovich N, Gritz L, Tung L, Rosbash M. Effect of RP51 gene dosage alterations on ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1985;5(12):3429-3435.
85. Matsumoto M, Hatakeyama S, Oyamada K, Oda Y, Nishimura T, Nakayama KI. Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics*. 2005;5(16):4145-4151.
86. Mayor T, Graumann J, Bryan J, MacCoss MJ, Deshaies RJ. Quantitative profiling of ubiquitylated proteins reveals proteasome substrates and the substrate repertoire influenced by the Rpn10 receptor pathway. *Mol Cell Proteomics*. 2007;6(11):1885-1895.
87. Mayor T, Lipford JR, Graumann J, Smith GT, Deshaies RJ. Analysis of polyubiquitin conjugates reveals that the Rpn10 substrate receptor contributes to the turnover of multiple proteasome targets. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4(6):741-751.
88. Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*. 2003;21(8):921-926.
89. Sung MK, Porras-Yakushi TR, Reitsma JM, Huber FM, Sweredoski MJ, Hoelz A, Hess S, Deshaies RJ. A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *Elife*. 2016;5.
90. Juszkiewicz S, Hegde RS. Quality Control of Orphaned Proteins. *Mol Cell*. 2018;71(3):443-457.
91. Sollner-Webb B, Mougey EB. News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem Sci*. 1991;16(2):58-62.
92. Warner JR. The nucleolus and ribosome formation. *Current Opinion in Cell Biology*. 1990;2(3):521-527.
93. GM C. *The Nucleolus. The Cell: A Molecular Approach*. 2000;2nd edition.

94. Granneman S, Baserga SJ. Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res.* 2004;296(1):43-50.
95. Steitz JA, Berg C, Hendrick JP, La Branche-Chabot H, Metspalu A, Rinke J, Yario T. A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol.* 1988;106(3):545-556.
96. Lam YW, Lamond AI, Mann M, Andersen JS. Analysis of Nucleolar Protein Dynamics Reveals the Nuclear Degradation of Ribosomal Proteins. *Current Biology.* 2007;17(9):749-760.
97. Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M. Nucleolar proteome dynamics. *Nature.* 2005;433(7021):77-83.
98. Wójcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(5):579-589.
99. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AK, Lam YW, Steen H, Mann M, Lamond AI. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol.* 2002;12(1):1-11.
100. Scherl A, Couté Y, Déon C, Callé A, Kindbeiter K, Sanchez JC, Greco A, Hochstrasser D, Diaz JJ. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell.* 2002;13(11):4100-4109.
101. Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. Structure and functions of nucleolin. *Journal of Cell Science.* 1999;112(6):761-772.
102. Reits EA, Benham AM, Plougastel B, Neefjes J, Trowsdale J. Dynamics of proteasome distribution in living cells. *Embo j.* 1997;16(20):6087-6094.
103. Chen M, Rockel T, Steinweger G, Hemmerich P, Risch J, von Mikecz A. Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. *Mol Biol Cell.* 2002;13(10):3576-3587.
104. Antón LC, Schubert U, Bacík I, Princiotta MF, Wearsch PA, Gibbs J, Day PM, Realini C, Rechsteiner MC, Bennink JR, Yewdell JW. Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol.* 1999;146(1):113-124.
105. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honoré N, Doubeikovsky A, Duprez E, Pandolfi PP, Puvion E, Freemont P, de Thé H. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As203-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med.* 2001;193(12):1361-1371.
106. Dino Rockel T, von Mikecz A. Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J Struct Biol.* 2002;140(1-3):189-199.
107. Lafarga M, Berciano MT, Pena E, Mayo I, Castaño JG, Bohmann D, Rodrigues JP, Tavanez JP, Carmo-Fonseca M. Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol Biol Cell.* 2002;13(8):2771-2782.

108. Guerra-Moreno A, Isasa M, Bhanu MK, Waterman DP, Eapen VV, Gygi SP, Hanna J. Proteomic Analysis Identifies Ribosome Reduction as an Effective Proteotoxic Stress Response. *J Biol Chem.* 2015;290(50):29695-29706.
109. Mills EW, Green R. Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science.* 2017;358(6363).
110. Albert B, Kos-Braun IC, Henras AK, Dez C, Rueda MP, Zhang X, Gadal O, Kos M, Shore D. A ribosome assembly stress response regulates transcription to maintain proteome homeostasis. *eLife.* 2019;8:e45002.
111. Kampen KR, Sulima SO, Vereecke S, De Keersmaecker K. Hallmarks of ribosomopathies. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(3):1013-1028.
112. Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood.* 2010;115(16):3196-3205.
113. Aspesi A, Ellis SR. Rare ribosomopathies: insights into mechanisms of cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2019;19(4):228-238.
114. Kang J, Brajanovski N, Chan KT, Xuan J, Pearson RB, Sanij E. Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):323.
115. Bai D, Zhang J, Xiao W, Zheng X. Regulation of the HDM2-p53 pathway by ribosomal protein L6 in response to ribosomal stress. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(3):1799-1811.
116. Wu Q, Gou Y, Wang Q, Jin H, Cui L, Zhang Y, He L, Wang J, Nie Y, Shi Y, Fan D. Downregulation of RPL6 by siRNA inhibits proliferation and cell cycle progression of human gastric cancer cell lines. *PLoS One.* 2011;6(10):e26401.
117. Zhang J, Ma Q, Han Y, Wen H, Zhang Z, Hao Y, Xiao F, Liang C. Downregulated RPL6 inhibits lung cancer cell proliferation and migration and promotes cell apoptosis by regulating the AKT signaling pathway. *J Thorac Dis.* 2022;14(2):507-514.
118. Parbin S, Kar S, Shilpi A, Sengupta D, Deb M, Rath SK, Patra SK. Histone Deacetylases: A Saga of Perturbed Acetylation Homeostasis in Cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2013;62(1):11-33.
119. Patra S, Panigrahi DP, Prahara PP, Bhol CS, Mahapatra KK, Mishra SR, Behera BP, Jena M, Bhutia SK. Dysregulation of histone deacetylases in carcinogenesis and tumor progression: a possible link to apoptosis and autophagy. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2019;76(17):3263-3282.
120. Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi T, Fuseya C, Suzuki A, Konishi I, Shiozawa T. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. *International Journal of Cancer.* 2010;127(6):1332-1346.
121. Petrella A, D'Acunto CW, Rodriguez M, Festa M, Tosco A, Bruno I, Terracciano S, Taddei M, Paloma LG, Parente L. Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: Role of Annexin A1. *European Journal of Cancer.* 2008;44(5):740-749.

122. Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, Altucci L, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nature Medicine*. 2005;11(1):71-76.
123. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(10).
124. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *The Oncologist*. 2007;12(10):1247-1252.
125. Fotheringham S, Epping MT, Stimson L, Khan O, Wood V, Pezzella F, Bernardis R, La Thangue NB. Genome-wide Loss-of-Function Screen Reveals an Important Role for the Proteasome in HDAC Inhibitor-Induced Apoptosis. *Cancer Cell*. 2009;15(1):57-66.
126. Khan O, Fotheringham S, Wood V, Stimson L, Zhang C, Pezzella F, Duvic M, Kerr DJ, La Thangue NB. HR23B is a biomarker for tumor sensitivity to HDAC inhibitor-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(14):6532-6537.
127. Bauer A, Kuster B. Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem*. 2003;270(4):570-578.
128. Lenz S, Sinn LR, O'Reilly FJ, Fischer L, Wegner F, Rappsilber J. Reliable identification of protein-protein interactions by crosslinking mass spectrometry. *Nature Communications*. 2021;12(1):3564.
129. Liu F, Rijkers DT, Post H, Heck AJ. Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry. *Nat Methods*. 2015;12(12):1179-1184.
130. Xu Y, Wan W. Acetylation in the regulation of autophagy. *Autophagy*. 2023;19(2):379-387.
131. Sun T, Li X, Zhang P, Chen WD, Zhang HL, Li DD, Deng R, Qian XJ, Jiao L, Ji J, Li YT, Wu RY, Yu Y, Feng GK, Zhu XF. Acetylation of Beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth. *Nat Commun*. 2015;6:7215.
132. Su H, Yang F, Wang Q, Shen Q, Huang J, Peng C, Zhang Y, Wan W, Wong CCL, Sun Q, Wang F, Zhou T, Liu W. VPS34 Acetylation Controls Its Lipid Kinase Activity and the Initiation of Canonical and Non-canonical Autophagy. *Mol Cell*. 2017;67(6):907-921.e907.
133. Lin SY, Li TY, Liu Q, Zhang C, Li X, Chen Y, Zhang SM, Lian G, Liu Q, Ruan K, Wang Z, Zhang CS, Chien KY, Wu J, Li Q, Han J, Lin SC. GSK3-TIP60-ULK1 signaling pathway links growth factor deprivation to autophagy. *Science*. 2012;336(6080):477-481.
134. You Z, Jiang W-X, Qin L-Y, Gong Z, Wan W, Li J, Wang Y, Zhang H, Peng C, Zhou T, Tang C, Liu W. Requirement for p62 acetylation in the aggregation of ubiquitylated proteins under nutrient stress. *Nature Communications*. 2019;10(1):5792.
135. Shen Q, Shi Y, Liu J, Su H, Huang J, Zhang Y, Peng C, Zhou T, Sun Q, Wan W, Liu W. Acetylation of STX17 (syntaxin 17) controls autophagosome maturation. *Autophagy*. 2021;17(5):1157-1169.

136. Isogai S, Morimoto D, Arita K, Unzai S, Tenno T, Hasegawa J, Sou YS, Komatsu M, Tanaka K, Shirakawa M, Tochio H. Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62 and its interaction with ubiquitin. *J Biol Chem.* 2011;286(36):31864-31874.
137. Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science.* 2019;366(6467):818-822.
138. Jin M, Liu C, Han W, Cong Y. TRiC/CCT Chaperonin: Structure and Function. *Subcell Biochem.* 2019;93:625-654.
139. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2022;97(8):1086-1107.
140. Demishtein A, Fraiberg M, Berko D, Tirosh B, Elazar Z, Navon A. SQSTM1/p62-mediated autophagy compensates for loss of proteasome polyubiquitin recruiting capacity. *Autophagy.* 2017;13(10):1697-1708.
141. B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fournoux P, Bruhat A. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(16):7683-7699.
142. Wilde IB, Brack M, Winget JM, Mayor T. Proteomic characterization of aggregating proteins after the inhibition of the ubiquitin proteasome system. *J Proteome Res.* 2011;10(3):1062-1072.
143. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008;26(12):1367-1372.
144. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res.* 2011;10(4):1794-1805.
145. Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods.* 2007;4(3):207-214.
146. Gatto L, Lilley KS. MSnbase-an R/Bioconductor package for isobaric tagged mass spectrometry data visualization, processing and quantitation. *Bioinformatics.* 2012;28(2):288-289.
147. Smyth GK. limma: Linear Models for Microarray Data. In: Gentleman R, Carey VJ, Huber W, Irizarry RA, Dudoit S, editors. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor.* New York, NY: Springer New York; 2005. p. 397-420.
148. Strimmer K. A unified approach to false discovery rate estimation. *BMC Bioinformatics.* 2008;9(1):303.

8 Thesen

1. Das Proteasom-Shuttling-Protein HR23B wurde sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus mit verschiedenen Methoden nachgewiesen.
2. Unter HDAC-Inhibitor-Behandlung (SAHA) nimmt die HR23B-Expression in der Zelle ab.
3. Co-Immünpräzipitationen in Kombination mit massenspektrometrischer Analyse ermöglichten die Identifizierung neuer Interaktionspartner von HR23B, neben bereits beschriebenen Bindungspartnern.
4. Ribosomale Proteine wurden als neue Interaktionspartner von HR23B identifiziert und ihr gemeinsames Auftreten im Nukleus verifiziert.
5. Bei HR23B-Überexpression nimmt die Translationsrate der Zelle zu.
6. SQSTM1/p62 als Beispiel eines autophagischen Shuttleing-Faktors wurde erfolgreich kloniert und in U2OS-Zellen exprimiert.

I. Anhang

Probenvorbereitung für die Proteomanalyse (beide Proben)

Das Volumen der aufgetauten Proben wurde gemessen. Anschließend wurde 10 %iges SDS hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 2 % zu erreichen. Die Proben wurden im Bioruptor 10 Zyklen bearbeitet (10 Zyklen: 60 sec an, 30 sec aus, 20°C). Danach wurden sie 10 min lang bei 95 °C gekocht. Anschließend wurden die Proben erneut im Bioruptor (10 Zyklen à 60 sec an, 30 sec aus, 20°C) bearbeitet und in 2-ml-Röhrchen übertragen. Es folgte eine 15-minütige Inkubation mit 200 mM DTT (fc: 10mM) bei 45 °C und eine 30-minütige Inkubation mit 200 mM IAA (fc: 15mM) bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben mit 8-fachem Volumen an Aceton versetzt, gevortext und über Nacht eingefroren. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand entfernt. Die Pellets wurden zweimal mit 500 µl eiskaltem 80 %igem Aceton gewaschen, gevortext und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Proteinmenge geschätzt. Anschließend wurden die Proben luftgetrocknet und mit Verdauungspuffer (1M Guanidin in 100mM HEPES pH 8.0) versetzt (fc: 1µg/µl, mindestens 25µl) und für 10 Zyklen im Bioruptor bearbeitet. LysC wurde im Verhältnis von 1:100 (Enzym:Protein) hinzugefügt. Die Proben wurden bei 37 °C und 650 U/min für 4 Stunden inkubiert, wobei in der 1 h 1000 U/min angewendet wurde. Anschließend wurde HPLC-H2O (fc: 0,5µg/µl, mindestens 25µl) und Trypsin im Verhältnis von 1:100 hinzugefügt. Die Proben wurden für 16 h bei 37 °C und 650 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 10% TFA angesäuert, einer OASIS-Reinigung unterzogen, im SpeedVac getrocknet und in MS-Puffer A auf etwa 1 µg/µl rekonstituiert. Für den ersten Probenbatch (Test-Proben) wurden die Peptide 1:10 in einem MS vial verdünnt und 500 ng in das Massenspektrometer injiziert sowie unter digest check Bedingungen gemessen. Für den zweiten Probenbatch wurde iRT-kit zugegeben und in MS vials abgefüllt. Die Proben wurden auf Lumos für die DIA-Analyse geladen. Hierbei wurde 1µg injiziert.

Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/ Massenspektrometrie (LC-MS/MS) für den ersten Probenbatch (Test-Proben)

Die Peptide wurden mit dem nanoAcquity UPLC-System (Waters) getrennt, dass eine Falle (nanoAcquity Symmetry C18, 5 µm, 180 µm x 20 mm) und eine analytische Säule (nanoAcquity BEH C18, 1,7 µm, 75 µm x 250 mm) verwendete. Die analytische Säule war direkt mit einem Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) über die Proxeon Nanospray-Quelle gekoppelt. Lösungsmittel A bestand aus Wasser und 0,1 % Ameisensäure, während Lösungsmittel B aus Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure bestand. Die Proben (500

ng) wurden mit einem konstanten Fluss von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf die Falle geladen, die Falle-Zeit betrug 6 min. Die Peptide wurden über die analytische Säule mit einem konstanten Fluss von 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$ eluiert. Während des Elutionsschritts erhöhte sich der Anteil von Lösungsmittel B linear von 3 % auf 50 % in insgesamt 60 Minuten. Die Peptide wurden über einen Pico-Tip Emitter (360 μm OD x 20 μm ID; 10 μm Spitze, New Objective) in das Massenspektrometer eingebracht, wobei eine Sprayspannung von 2,2 kV angewendet wurde. Die Kapillartemperatur wurde auf 300 °C eingestellt, die RF-Linse auf 30 %. Es wurden vollständige MS-Spektren im Massenbereich von 375-1500 m/z im Profilmodus im Orbitrap mit einer Auflösung von 120.000 erfasst. Die Füllzeit wurde auf maximal 50 ms mit einer Begrenzung von 2×10^5 Ionen festgelegt. Die "Top Speed"-Methode wurde angewendet, um die maximal mögliche Anzahl von Vorläuferionen aus dem Vollscan MS zur Fragmentierung zu übernehmen (Intensitätsschwelle: 5×10^3) und zur Quadrupolisolierung (Fenster: 1,4 Da) sowie zur Messung in der Ionenfalle, bei einer Zykluszeit von 3 Sekunden. Der MIPS (monoisotopische Vorläuferselektion) Peptidalgorithmus wurde angewendet, mit flexiblen Kriterien für unzureichende Vorläuferionen. Die Fragmentierung erfolgte nach Akkumulation von 2×10^3 Ionen oder nach einer Füllzeit von 300 ms für jede Vorläuferion. MS/MS-Daten wurden im Zentroidmodus erfasst, mit schneller Scanrate und fester erster Masse von 120 m/z. Es wurden nur mehrfach geladene (2+ - 7+) Vorläuferionen für MS/MS ausgewählt. Eine dynamische Ausschlusszeit mit maximaler Retentionsdauer von 60 Sekunden und relativen Massenfenster von 10 ppm wurde verwendet. Isotope wurden ausgeschlossen. Nur ein datenabhängiger Scan pro Vorläufer wurde durchgeführt. Ionen wurden für die verfügbare parallelisierbare Zeit injiziert. Eine Sperrmassenkorrektur mit einem Hintergrundion (m/z 445,12003) wurde angewendet. Die Datenerfassung erfolgte mit Xcalibur 4.0/Tune 2.1 (Thermo Fisher Scientific).

Datenanalyse für den ersten Probenbatch (Test-Proben)

Für die quantitative label-freie Analyse wurden die Rohdaten des Orbitrap Fusion Lumos mittels MaxQuant (Version 1.5.3.28) (143) analysiert. MS/MS-Spektren wurden durch die Andromeda-Suchmaschine (144) gegen die Homo sapiens, (20.816 Einträge) und Kontaminanten-Datenbanken (247 Einträge) im SwissProt-Format durchsucht. Die Suchkriterien beinhalteten volle tryptische Spezifität, erlaubten 2 verpasste Spaltstellen und verwendeten Oxidation (M) und Acetylierung (protein N-term) als variable Modifikationen. Die Peptid- und Proteinhits wurden mittels Ziel-Dekoy-Strategie (145) auf eine FDR von 1 % gefiltert. Proteine mit mindestens 2 eindeutigen Peptiden wurden beibehalten. LFQ-Intensitätswerte pro Protein (aus der proteinGroups.txt-Ausgabe von MaxQuant) wurden weiterverwendet. Analysen erfolgten in R Version 3.4.1 (2017-06-30)

unter Verwendung von R-Paketen wie MSnbase (146). Fehlende Werte wurden über eine gemischte Strategie auf Basis von MAR (Missing At Random) und MNAR (Missing Not At Random) Definitionen imputiert. MNAR-Werte wurden nach Methode "MinDet" ersetzt, MAR-Werte mittels k-nearest neighbors (146). Daten wurden zur Reduzierung technischer Variationen quantilnormalisiert. Die differentielle Proteinexpression zwischen Trametinib- und DMSO-Kontrollproben wurde mittels Limma-Paket (147) evaluiert. Unterschiede in der Proteinabundanz wurden per Student's t-Test bestimmt, mit moderierter Varianz durch limma's empirische Bayes-Methode. FDR wurde mittels fdrtool (148) geschätzt.

Datenerfassung und -verarbeitung für DIA-Proben (zweiter Probenbatch)

Die DIA-Proben wurden folgendermaßen verarbeitet: Ca. 1 µg der rekonstituierten Peptidmischungen wurden über eine nanoAcquity UPLC (Waters, Milford, MA) direkt mit dem Massenspektrometer gekoppelt. Peptide wurden über eine Falle (nanoAcquity Symmetry C18, 5 µm, 180 µm × 20 mm) und eine analytische Säule (nanoAcquity BEH C18, 1.7 µm, 75 µm × 250 mm) getrennt. Die analytische Säule war direkt an einen Orbitrap Fusion Lumos Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) gekoppelt. Lösungsmittel A war 0,1% Ameisensäure in Wasser, Lösungsmittel B 0,1% Ameisensäure in Acetonitril. Die Proben wurden mit 5 µL/min auf die Falle geladen, mit 6-minütiger Trapping-Zeit. Die Peptide wurden mit 300 nL/min über die analytische Säule eluiert. Während der Elution stieg der Anteil von Lösungsmittel B in 60 Minuten nichtlinear von 0% auf 40%. Gesamtdauer betrug 75 Minuten inklusive Reinigung. Ein Pico-Tip-Emitter (360 µm OD × 20 µm ID; 10 µm Spitze, New Objective) führte Peptide ins Massenspektrometer, mit 2,2 kV Sprühspannung. Kapillartemperatur lag bei 300 °C, RF-Linse bei 30%. Voll-Scan-MS-Spektren von 350-1650 m/z wurden im Orbitrap mit 120.000 FWHM Auflösung erfasst, bei max. 20 ms Füllzeit und AGC-Ziel von 5×10^5 Ionen. DIA-Scans wurden mit 34 Massensegmenten im MS1-Bereich erfasst, mit 30% HCD-Kollisionsenergie. MS/MS-Scans hatten 30.000 FWHM Auflösung im Orbitrap, nach 1×10^6 Ionen oder 70 ms Füllzeit. Datenerfassung und -verarbeitung nutzten Tune 2.1 und Xcalibur 4.1 Versionen.

Datenanalyse für DIA-Proben

Die DIA-Rohdaten wurden in Spectronaut (v.13, Biognosysis, Schweiz) analysiert. Daten wurden gegen artspezifische (Homo sapiens, 20.816 Einträge) und Kontaminanten-Datenbanken (247 Einträge) im SwissProt-Format durchsucht. Variable Modifikationen wie Methionin-Oxidation und Protein N-terminale Acetylierung wurden berücksichtigt. Maximal 2 verpasste Spaltungen für Trypsin und 5 variable Modifikationen waren erlaubt. Identifikationen wurden gefiltert, um eine FDR (False Discovery Rate) von 1% auf Peptid-

und Proteinebene zu erfüllen. Relative Quantifizierung erfolgte in Spectronaut für jede gepaarte Vergleichskonstellation mit Replikatproben. Daten (Kandidatentabelle) und Analysen (Proteinmengen) wurden exportiert, weitere Analysen und Visualisierungen mit R Version 3.4.1 (2017-06-30) und firmeninternen Skripten durchgeführt. Signifikante Proteine wurden anhand eines log₂ FC-Schwellenwerts von 0,58 und q-Wert <0,05 ausgewählt.

Material:

- Natriumdodecylsulfat (SDS) (#75746, Sigma)
- 1,4-Dithiothreitol (DTT) (#6908, Roth)
- 2-Iodoacetamid (IAA) (#I1149, Sigma)
- Guanidine HCl (#0035.1, Roth)
- HEPES pH 8 (#H3375, Sigma)
- Acetone (#0001037801BS, Biosolve)
- Lysyl Endopeptidase® (LysC) (#125-05061, Wako)
- Sequencing Grade Modified Trypsin (#V5111, Promega)
- Trifluoroacetic acid, ULC/MS-CC/SFC (TFA) (#0020234131BS, Biosolve)
- Acetonitrile, ULC/MS-CC/SFC (#0001204101BS, Biosolve)
- Formic acid 99%, ULC/MS-CC/SFC (#0006914143BS, Biosolve)
- Oasis Buffer A: 0.05% Formic Acid (FA) (v/v) in MilliQ water
- Oasis Buffer B: 80% Acetonitrile, 0.05% FA (v/v), in MilliQ water
- MS Buffer A (5% (v/v) acetonitrile, 0.1% (v/v) TFA in water)
- iRT kit peptides (#Ki-3002-1, Biognosys)
- OASIS ® Oasis 96-well plate vacuum manifold (# 186001831, Waters)
- Waters Oasis ® HLB µElution plates 30 µg (for maximum 100 µg proteins) (#186001828BA, Waters)
- Glass vials and glass inserts for LC-MS (#88909355 vials, #93909134 inserts, #88849362 caps, VDS optilab)
- Bioruptor Plus Sonicator (Diagenode)
- Zentrifuge 5804R mit Festwinkelrotor F-45 (Eppendorf)
- Thermomixer C + Thermotop mit Smartblock 1.5ml (Eppendorf)
- Concentrator Plus (SpeedVac) (Eppendorf)

STRING-Interaktionsnetzwerk von HR23B

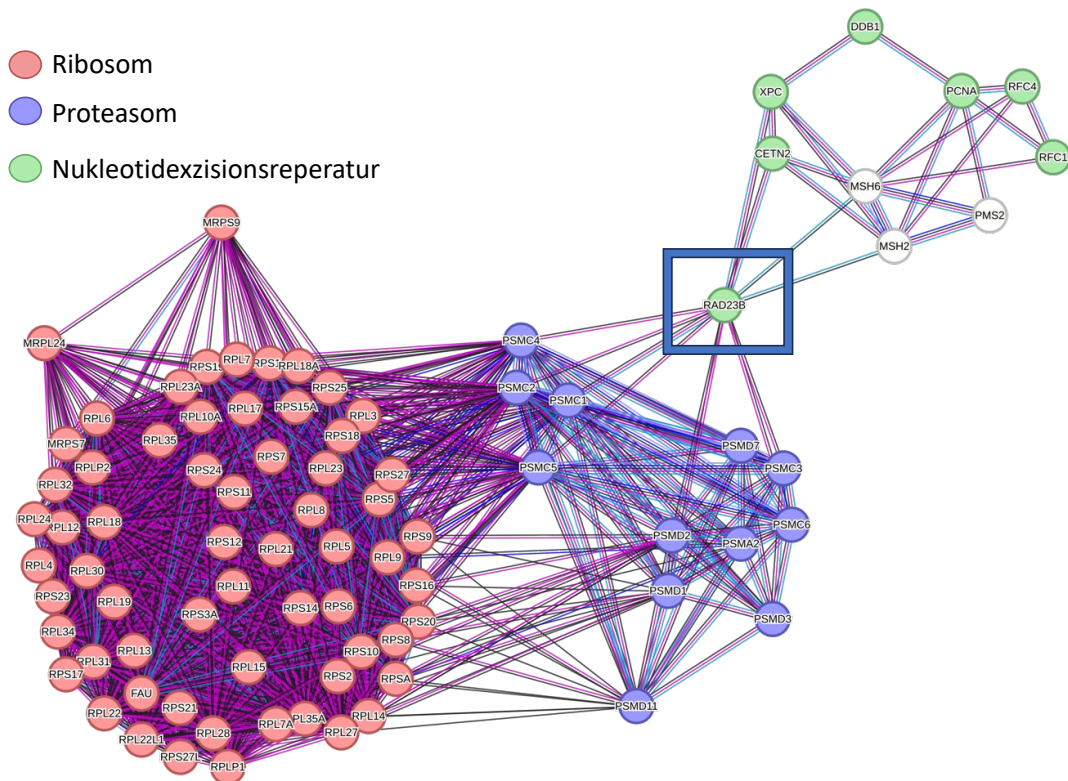


Abbildung 30: STRING-Interaktionsnetzwerk von HR23B und Substraten

Mithilfe des KEGG-Pathway-Analyseprogramms konnten drei Hauptwege identifiziert werden, die mit HR23B in Verbindung stehen und daher farblich gekennzeichnet wurden. Für weiterführende Analysen wurden KEGG-Pathways verwendet, wobei die Pathways "Proteasom", "Nukleotid-Exzisionsreperatur" und "Ribosom" jeweils farblich hervorgehoben wurden. Im blauen Rechteck ist das bait-Protein dargestellt, während die grün gefärbten Interaktionen die Rolle von HR23B in der Nukleotid-Exzisionsreperatur repräsentieren. Die blaue Markierung zeigt die gut erforschte Interaktion von HR23B mit dem Proteasom, während die neu beobachtete Wechselwirkung mit ribosomalen Proteinen rot gefärbt ist. Die Einstellungen der STRING-Analyse basierten auf einem Konfidenzkoeffizienten von 0,7, wobei Experimente, Datenbanken, Co-Expression und Koexistenz als Interaktionsquellen verwendet wurden.

II. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine aufrichtige Dankbarkeit gegenüber allen Personen zum Ausdruck bringen, die mich während meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte, der mir ermöglicht hat die Promotion am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg anzufertigen. Für das entgegengebrachte Vertrauen, die Unterstützung und Motivation bin ich ihm sehr dankbar.

Mein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Heidi Olzscha, die mir die Faszination für Grundlagenforschung näher und das wissenschaftliche Handwerk beigebracht hat. Als Betreuerin dieser Dissertation stand sie immer für Rückfragen zur Verfügung. Mit viel Geduld, konstruktiven Tipps und Gesprächen hat sie diese Arbeit positiv beeinflusst. Ich bedanke mich für das Vertrauen und die Unterstützung, die sie mir entgegengebracht hat.

Dr. Alessandro Ori und Ivonne Heinze aus dem Leibniz-Institut für Alternsforschung, Fritz-Lipmann-Institut möchte ich für die Durchführung der Massenspektrometrie und die Bearbeitung meiner Proben danken.

Ich danke dem Halleschen Promotionskolleg Medizin (HaPKoM) für die Förderung im Rahmen eines Stipendiums.

Dr. Kaya Bork danke ich für die konstruktiven Gespräche, Anregungen und Hilfestellungen. Insbesondere bedanke ich mich bei den gesamten Mitgliedern der AG Horstkorte. Das gute Miteinander und die Hilfsbereitschaft haben immer zu einer guten und produktiven Stimmung beigetragen. Allen voran war Annett Thate eine große Unterstützung im alltäglichen Zurechtfinden im Labor.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden. Meiner Schwester danke ich für ihre stets hilfreiche Hand, meinem Vater für seinen fortwährenden Glauben an mich und meiner Mutter für ihre liebevolle Zuwendung. Vielen Dank an meine Freunde für eure unermüdliche Hilfe, motivierenden Gespräche und Ermutigungen.

III. Eidesstattliche Erklärung

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift