

# ZMB



ZENTRUM FÜR MEDIZINISCHE BIOTECHNOLOGIE  
UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN

## Die UBX-Domäne von UBXD1 organisiert die Ubiquitinbindung am C-Terminus der AAA-ATPase VCP/p97 zum proteasomalen Abbau

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Mike Blüggel  
aus Witten  
September 2022

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/77353

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230403-091013-8

Alle Rechte vorbehalten.

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für strukturelle und medizinische Biochemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Peter Bayer

2. Gutachter: Prof. Stefan Westermann

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dominik Boos

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2022

Universität Duisburg-Essen – Campus Essen  
Zentrum für Medizinische Biotechnologie  
Institut für Strukturelle und Medizinische Biochemie  
Prof. Dr. Peter Bayer  
Universitätsstraße 2  
45141 Essen

*Für meine Familie*  
*Für Larissa und Marius*

*“Razupaltuff.”*  
Das Känguru, Mark-Uwe Kling

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>DAS UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM</b>	<b>3</b>
3.1.1	UBIQUITIN	3
3.1.2	PROTEASOM	5
<b>3.2</b>	<b>AAA-ATPASE P97/VCP</b>	<b>6</b>
3.2.1	STRUKTUR UND INTERAKTION VON P97	6
3.2.2	INTERAKTION MIT P97	9
3.2.3	ATPASE-AKTIVITÄT VON P97	10
3.2.4	ENTFALTUNGSPROZESS DURCH P97	11
<b>3.3</b>	<b>UBXD1</b>	<b>12</b>
3.3.1	STRUKTUR VON UBXD1	13
3.3.2	INTERAKTION MIT P97	15
<b>3.4</b>	<b>PROTEASOMTRANSPORTFAKTOR HR23</b>	<b>16</b>
<b>3.5</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>20</b>
4.1.1	CHEMIKALIEN	20
4.1.2	ANTIKÖRPER	22
4.1.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN UND KITS	22
4.1.4	PROTEINMARKER	23
4.1.5	PUFFER UND LÖSUNGEN	24
4.1.6	ANTIBIOTIKA UND NÄHRMEDIEN	25
4.1.7	PLASMIDE	27
4.1.8	GERÄTE UND SOFTWARE	29
<b>4.2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>31</b>
4.2.1	SITE-DIRECTED MUTAGENESIS	31
4.2.2	RESTRIKTIONSKLONIERUNG	31
<b>4.3</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>33</b>



4.3.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN	33
4.3.2	TRANSFORMATION KOMPETENTER ZELLEN	34
4.3.3	ZELLKULTUR	34
<b>4.4</b>	<b>BIOCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>35</b>
4.4.1	PROTEINEXPRESSION UND -REINIGUNG	35
4.4.2	POLYUBIQUITIN-SYNTHESE	40
4.4.3	FLUORESZENZMARKIERUNG MITTELS ATTO594-NHS ESTER	41
<b>4.5</b>	<b>ANALYTISCHE METHODEN</b>	<b>42</b>
4.5.1	ALANIN-SCREENING	42
4.5.2	ANALYTISCHE GELFILTRATION	43
4.5.3	ATPASE-AKTIVITÄTSASSAY	44
4.5.4	CHEMISCHES UND PHOTOREAKTIVES CROSSLINKING MIT REKOMBINANTEN PROTEINEN	46
4.5.5	CIRCULARDICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE	47
4.5.6	FLUORESZENZANISOTROPIE	48
4.5.7	IMMUNOPRÄZIPITATION	50
4.5.8	ISOTHERMALE TITRATIONS-KALORIMETRIE	51
4.5.9	KERNMAGNETISCHE RESONANZ-SPEKTROSKOPIE (NMR)	52
4.5.10	PEPTID-ARRAY	54
4.5.11	PROTEOLYTISCHER NACHWEIS EINER INTRAMOLEKULAREN DOMÄNENINTERAKTION	55
4.5.12	PULLDOWN	56
4.5.13	WESTERN BLOT	57
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>58</b>
<b>5.1</b>	<b>DIE UBX-DOMÄNE BINDET AN UBIQUITIN</b>	<b>58</b>
<b>5.2</b>	<b>UBXD1 BESITZT EINE ERWEITERTE UBX-DOMÄNE</b>	<b>61</b>
5.2.1	PROTEINREINIGUNG VON UBXD1	61
5.2.2	DIE PUB- UND UBX-DOMÄNE BILDEN EINE KOMPAKTE KONFORMATION	62
<b>5.3</b>	<b>UBX BINDET ÜBER EIN B-FALTBLATTMOTIV AN UBIQUITIN</b>	<b>69</b>
5.3.1	KLONIERUNG VON UBXD1-LINKER-KONSTRUKTEN	70
5.3.2	PROTEINREINIGUNG VON UBIQUITIN	71
5.3.3	UBXD1 BINDET AN MONO-UBIQUITIN	72
<b>5.4</b>	<b>UBXD1 BINDET VORWIEGEND KURZE UBIQUITINKETTEN</b>	<b>79</b>
5.4.1	REINIGUNG DER UBIQUITIN-LIGASE FUSIONS-PROTEINE ZUR POLY-UBIQUITIN SYNTHESE	79
5.4.2	SYNTHESE VON K48-VERKNÜPFTEN UBIQUITINKETTEN	80
<b>5.5</b>	<b>ANORDNUNG DER C-TERMINALEN REGION VON UBXD1 AN P97</b>	<b>84</b>
5.5.1	PROTEINREINIGUNG VON P97-KONSTRUKTEN	84

5.5.2	CROSSLINKING ZEIGT EINE RÄUMLICHE NÄHE ZUR P97-D2-ATPASE-DOMÄNE	85
5.5.3	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER BINDUNG VON UBXD1 AN DIE D2-DOMÄNE	85
<b>5.6</b>	<b>EINFLUSS AUF DIE ATPASE AKTIVITÄT VON P97</b>	<b>89</b>
5.6.1	UBXD1 IST EIN NICHT-KOMPETITIVER ATPASE-INHIBITOR FÜR P97	90
5.6.2	UBXD1 BEEINFLUSST DIE ATPASE-AKTIVITÄT WÄHREND DES ENTFALTUNGSPROZESSES UBQUITINYLIERTER SUBSTRATE NICHT	91
<b>5.7</b>	<b>UBXD1 INTERAGIERT MIT DEM PROTEASOMTRANSPORTFAKTOR HHR23</b>	<b>94</b>
5.7.1	PROTEINREINIGUNG VON HHR23 FUSIONSPROTEINEN	95
5.7.2	DIE PUB-DOMÄNE BINDET AN DIE N-TERMINALE UBL-DOMÄNE VON HHR23A/B	95
5.7.3	INTERMOLEKULARE INTERAKTION VON UBL MIT UBA1 UND UBA2	99
5.7.4	SEQUENTIELLE ZUORDNUNG VON UBA1 MITTELS 3D-NMR-SPEKTROSKOPIE	102
<b>5.8</b>	<b>SUPRAMOLEKULARE LIGANDEN KÖNNEN DIE PUB:UBL BINDUNG AUFHEBEN</b>	<b>107</b>
5.8.1	BINDUNG DER DIMER-PINZETTE AN DIE UBL-DOMÄNE	108
5.8.2	DIE DIMER-PINZETTE KANN DIE BINDUNG ZWISCHEN DER PUB- UND UBL-DOMÄNE AUFHEBEN	111
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>114</b>
6.1	UBX-DOMÄNE ALS FUNKTIONELLES MERKMAL VON UBXD1	114
6.2	UBXD1 ALS SUBSTRATADAPTER	118
6.3	UBXD1 VERBINDET P97-ENTFALTUNGSKOMPLEXE MIT DEM PROTEASOME	121
<b>7</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>128</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>139</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>141</b>
<b>11</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>143</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG</b>	<b>145</b>
12.1	PROTEINAUFREINIGUNG	145
12.1.1	PROTEINREINIGUNG UBXD1	146
12.1.2	PROTEINREINIGUNG MUBE1 UND UBC7	147

12.1.3	PROTEINREINIGUNG P97	148
12.1.4	PROTEINREINIGUNG HR23B	149
<b>12.2</b>	<b>CHEMISCHES UND PHOTOREAKTIVES CROSSLINKING</b>	<b>150</b>
<b>12.3</b>	<b>GST- WESTERNBLOT LADEKONTROLLE</b>	<b>159</b>
<b>12.4</b>	<b>ATPASE-AKTIVITÄT VON P97</b>	<b>160</b>
<b>12.5</b>	<b>ATOMLISTE <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N-HHR23B-UBA1</b>	<b>162</b>
<b>12.6</b>	<b>INTERAKTIONEN MESSUNGEN</b>	<b>163</b>
12.6.1	FLUORESZENZANISOTROPIE UND ITC	163
12.6.2	PEPTID-ARRAY	164
12.6.3	<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC TITRATIONEN ZWISCHEN UBXD1 UND UBIQUITIN	165
12.6.4	<sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC TITRATIONEN VON UBXD1 MIT HR23	166
12.6.5	PROTEINAUFREINIGUNG VOM GECROSSLINKTEN PUB:UBL-KOMPLEX	167
12.6.6	INTERAKTION ZWISCHEN HHR23B UND SUPRAMOLEKULAREN LIGANDEN	168
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b>	<b>169</b>
<b>14</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>171</b>
<b>15</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNGEN</b>	<b>172</b>

# 1 Zusammenfassung

Die AAA-ATPase p97 ist eine ATPase mit unterschiedlichen Funktionen, die durch eine Vielzahl an Cofaktoren ermöglicht werden. UBXD1 ist ein p97-Cofaktor, der eine besondere Rolle einnimmt. Im Gegensatz zu den anderen Cofaktoren besitzt UBXD1 zwei p97-Bindestellen (N-Terminus, PUB-Domäne), sowie einer UBX-Domäne und kann sowohl die N-Domäne als auch den C-Terminus von p97 binden. UBXD1 ist in verschiedenen Prozessen wie dem Abbau von Lysosomen und Mitochondrien beteiligt und Störungen führen zur Anhäufung fehlgefalteter Proteine. Obwohl UBXD1 eine wichtige Rolle in diesen Prozessen einnimmt, ist die Funktion dieses Proteins nur unzureichend verstanden.

Diese Arbeit konzentriert sich darauf, die Funktion von UBXD1 als Ubiquitinbindungspartner und seinen Einfluss auf den Entfaltungsprozess und die anschließende Prozessierung ubiquitinylierter Substrate zu untersuchen. Durch eine Kombination aus Crosslinking mit massenspektrometrischer Analyse und berechneter Strukturmodelle konnte eine erweiterte UBX-Domäne (eUBX: Linker-UBX, 269-410) im C-terminalen Bereich von UBXD1 als strukturelles Merkmal identifiziert werden, das homolog zur erweiterten UBX-Domäne von ASPL ist. Durch Interaktionsstudien (Fluoreszenzanisotropie, Isothermale Titrationskalorimetrie, Crosslinking, Alanin-Scan und Peptid-Array) konnte nachgewiesen werden, dass dieses strukturelle Merkmal effektiv an Ubiquitin und kurze Ubiquitinketten bindet. Zusätzlich konnte die Interaktion zwischen UBXD1 und Ubiquitin NMR-spektroskopisch auf atomarer Ebene untersucht werden. Durch die Ausbildung eines  $\beta$ -Stranges ist diese erweiterte UBX-Domäne in räumlicher Nähe zur PUB-Domäne assoziiert, die den C-Terminus von p97 bindet. Dieses Modul aus PUB-eUBX ist am C-terminalen Ende des p97-Hexamers lokalisiert und in räumlicher Nähe zur Pore der p97-D2-Domäne. Diese räumliche Nähe ermöglicht es der Linker-Region zwischen der PUB- und UBX-Domäne an die D2-Domäne von p97 zu binden. Mittels detaillierter biochemischer Charakterisierung (Fluoreszenzanisotropie mit unterschiedlichen Mutanten und Deletionskonstrukten) konnte in UBXD1 eine dritte p97-Bindestelle identifiziert werden. Durch Aktivitätsassays konnte gezeigt werden, dass UBXD1 keinen Einfluss auf die ATPase-Aktivität während des Entfaltungsprozesses ubiquitinylierter Proteine hat. Dennoch liegt UBXD1 während der Substratentfaltung gebunden an den p97:Ufd1:Npl4-Entfaltungskomplex vor, was darauf hindeutet, dass UBXD1 ungefaltete ubiquitinylierte Substrate nach dem Verlassen der p97-Pore für weitere Prozessierungsschritte bindet. Die Interaktion mit dem Proteasomtransportfaktor HR23 unterstützt diese Hypothese, da sich durch die Bindung der UBL-Domäne an UBXD1 die zuvor geschlossene HR23-Konformation öffnet und die freien UBA-Domänen das Ubiquitin binden können.

## 2 Abstract

The AAA-ATPase p97 is an ATPase with different functions, depending on the interaction with various cofactors. UBXD1 is a p97 cofactor that plays a special role. In contrast to the other cofactors, UBXD1 has two p97 binding sites and can bind both the N domain and the C terminus of p97. UBXD1 is involved in various processes such as lysosome and mitochondrial degradation and disruption leads to the accumulation of misfolded proteins. Although UBXD1 plays an important role in these processes, the function of this protein is poorly understood.

This work focuses on the functional investigation of UBXD1 as a ubiquitin binding partner and its influence on the unfolding processing of ubiquitinated substrates.

Through a combination of crosslinking with mass spectrometric analyses and computed structural models, an extended UBX domain (eUBX: Linker-UBX, 269-410) could be identified as a new structural feature in the C-terminal region of UBXD1. It is homologue to the extended UBX domain of ASPL. Interaction studies (fluorescence anisotropy, isothermal titration calorimetry, crosslinking, an alanine scan and a peptide array) have shown that this structural feature binds effectively to ubiquitin and short ubiquitin chains. In addition, the interaction between UBXD1 and ubiquitin could be studied by NMR spectroscopy at an atomic level. Through the formation of a  $\beta$ -strand, this extended UBX domain is associated in close proximity to the PUB domain that binds to the C-terminus of p97. As a result, this PUB-eUBX module is located at the C-terminal end of the p97 hexamer and in close proximity to the pore of the p97 D2 domain. This spatial proximity allows the linker region between the PUB and UBX domains to bind to the D2 domain of p97. In this way, a third p97 binding site could be identified in UBXD1 by detailed biochemical characterization (fluorescence anisotropy with different mutants and deletion constructs). Activity assays showed that UBXD1 has no influence on ATPase activity during the unfolding process of ubiquitinated proteins. However, UBXD1 is bound to the p97:Ufd1:Npl4 complex during the substrate unfolding, suggesting that UBXD1 binds unfolded ubiquitinated substrates after exiting the p97 pore for further processing steps. The interaction with the proteasome transport factor HR23 supports this hypothesis, since the binding of the UBL domain to UBXD1 opens the previously closed HR23 conformation and the free UBA domains can bind the ubiquitin.

## 3 Einleitung

### 3.1 Das Ubiquitin-Proteasome System

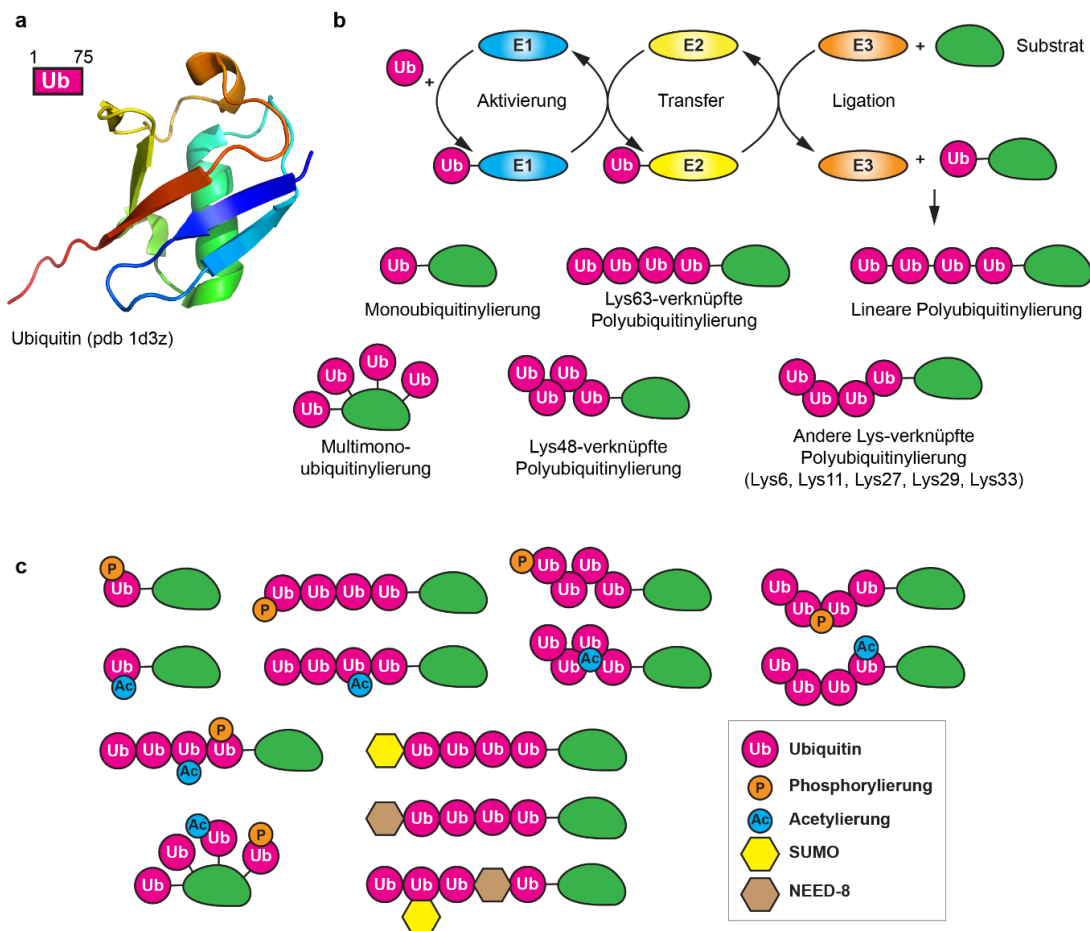
Die Proteinhomöostase der Zelle wird durch die Kontrolle der Proteinexpression und der Balance des Proteinabbaus aufrechterhalten. Der Proteinabbau findet dabei über zwei Hauptwege innerhalb der Zelle statt: Zum einen werden Proteine in Lysosomen durch eine saure Umgebung und Proteasen abgebaut. Zum anderen können Proteine über das Proteasom abgebaut werden. In beiden Fällen werden Proteine als Abbausignal mit Ubiquitin posttranslational modifiziert, was man als Ubiquitylierung bezeichnet<sup>1,2</sup>.

#### 3.1.1 Ubiquitin

Zur Regulierung des Proteinabbaus werden Proteine ubiquityliert. Ubiquitin ist ein kleines hochstabiles Protein mit einer Größe von 76 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 8,6 kDa<sup>1,3</sup>. Die Struktur von Ubiquitin ist ein konservierter  $\beta$ -Faltblattkern (siehe Abb. 3.1 a) mit einem flexiblen 6 Aminosäure langen C-Terminus. Über eine hydrophobe Bindetasche (L8, I44, H68, V70) bindet Ubiquitin die meisten seiner Bindungspartner<sup>1,4,5</sup>. Die Ubiquitylierung ist eine wichtige posttranslationale Modifikation. Dabei wird der C-terminale Glycinrest mittels Enzymkaskade über eine Isopeptidbindung an eine  $\epsilon$ -Aminogruppe gekoppelt (siehe Abb. 3.1 b)<sup>6</sup>. Diese Kopplungsreaktion kann wiederholt ablaufen, sodass sich Ubiquitinketten bilden. Dabei können monoubiquitylierte, multimonoubiquitylierte Substrate entstehen, wobei Ubiquitin an freie  $\epsilon$ -Aminogruppen des Substrates gekoppelt werden. Lineare Polyubiquitylierung findet statt, indem die Kopplung über die Aminogruppe des N-Terminus (M1) von Ubiquitin stattfindet. Über die Lysine von Ubiquitin (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) können bestimmte Verknüpfungen gebildet werden; dabei können homogene oder gemischte Ubiquitinketten gebildet werden (siehe Abb. 3.1 b).

Die verschiedenen Strukturen, Flexibilität und Distanz der Ubiquitineinheiten in Ubiquitinketten haben dabei ihre jeweilige eigene Funktion und Bindungspartner<sup>1</sup>. Die K48-verknüpften Ubiquitinketten können mit dem Proteasom interagieren, wodurch K48-polyubiquitylierte Substrate abgebaut werden<sup>7-9</sup>. Die K48-verknüpften Ubiquitinketten sind das typische Signal für den proteasomalen Abbau. Eine nicht proteolytische Funktion haben K48-Ubiquitinketten z. B. im Zusammenhang mit der AAA-ATPase p97. Dabei interagiert p97 mit unterschiedlichen Cofaktoren, welche K48-polyubiquitylierte Substrate binden können<sup>7,10,11</sup>. Durch die Bildung des Komplexes wird die ATPase aktiviert, was zur Extraktion von ubiquitylierten Substraten an zellulären Kompartimenten oder Proteinkomplexen führt<sup>7</sup>. Bei K63-verknüpften Ubiquitinketten können K63-ubiquitylierte Substrate vereinzelt durch das Proteasom abgebaut werden<sup>12,13</sup>. Hinzu kommt, dass diese Substrate durch Autophagie,

einem Proteasom-unabhängig Mechanismus abgebaut werden können<sup>7</sup>. Autophagie ist ein zellulärer Mechanismus, bei dem beschädigte Organellen durch die Bildung von Autophagosomen und die anschließende Fusionierung mit Lysosomen abgebaut werden<sup>14</sup>. K63-Ubiquitinketten sind zusätzlich beim Proteintransport, Signaltransduktion oder der DNA-Reparatur zu finden<sup>15</sup>. Durch die Inhibierung des Proteasoms kommt es zu einem Anstieg aller Lysin-verknüpften Kettentypen, mit Ausnahme von K63, was darauf hinweist, dass ebenfalls die anderen Kettentypen, nicht nur K48, als Signal zum Proteinabbau dienen<sup>15</sup>. Die Komplexität der Möglichkeiten von Ubiquitin als PTM wird durch die Kombination unterschiedlicher Kettentypen der Ubiquitynylierung und posttranslationaler Modifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung oder der Einbau Ubiquitin-ähnlicher Proteine wie SUMO oder NEED-8 an Ubiquitin selbst erweitert (siehe Abb. 3.1 c)<sup>16</sup>.

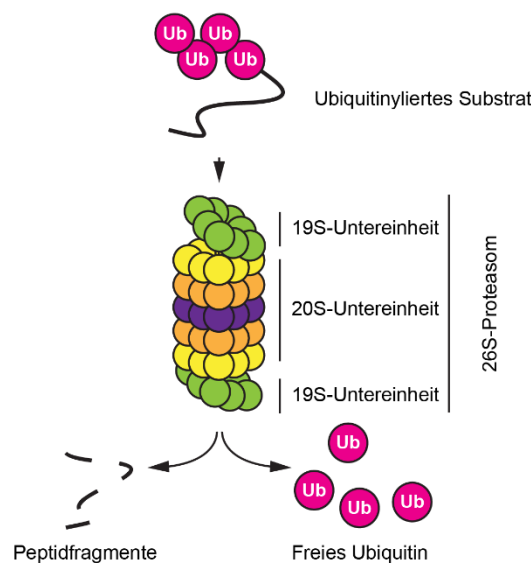


**Abb. 3.1 Ubiquitin als Posttranslationale Modifikation.**

**a:** Struktur von Ubiquitin (pdb 1d3z) zeigt das konservierte  $\beta$ -Faltblattmotiv. **b:** Enzymkaskade zur Ubiquitynylierung nach Dikic *et al.*<sup>4</sup> und Komander *et al.*<sup>1</sup>. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 adenyliert Ubiquitin und überträgt es auf einen seiner Cysteinreste. Anschließend wird Ubiquitin auf einen Cysteinrest des ubiquitinkonjugierenden Enzyms E2 übertragen. Das E2-Enzym katalysiert diese Reaktion selbst. Die Ubiquitin-Protein-Ligase E3 überträgt das Ubiquitin vom E2-Enzym auf den Lysinrest des Substrats<sup>6</sup>. Dieser Zyklus kann wiederholt werden und bildet somit polyubiquitynylierte Substrate, wobei das aktivierte Ubiquitin an bestimmte Lysinreste gekoppelt wird. **c:** Beispiele für posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung, SUMOylierung oder NEEDylierung) für unterschiedliche Ubiquitinketten nach Swatek und Komander<sup>16</sup>.

### 3.1.2 Proteasom

Das Proteasom / 26S-Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, das aus einer katalytischen 20S-Untereinheit und einer regulatorischen 19S-Untereinheit besteht und im Zellkern sowie dem Cytosol zu finden ist<sup>6,17</sup>. An eine 20S-Untereinheit binden zwei 19S-Untereinheiten und bilden dadurch das 26S-Proteasom (siehe Abb. 3.2). Die 19S-Untereinheit erfüllt beim Proteasom drei regulatorische Funktionen. Über die Bindung an Polyubiquitin sorgt die Untereinheit dafür, dass gezielt nur polyubiquitinylierte Proteine abgebaut werden. Durch eine Isopeptidase wird das kovalent an das Protein gekoppelte Polyubiquitin abgespalten und somit vor dem Abbau geschützt. Das freigesetzte Ubiquitin kann dadurch wiederverwendet werden. Die Entfaltung der Proteine erfolgt durch sechs AAA-ATPasen, welche sich in der 19S-Untereinheit befinden. Die Energie zur Entfaltung der Proteine wird durch ATP-Hydrolyse gewonnen<sup>6</sup>. Die katalytische 20S-Untereinheit baut die entfalteten Proteine mittels Proteolyse ab, bis Peptide mit einer Länge von sieben bis neun Resten entstehen. Diese werden ins Cytosol freigesetzt, wo sie durch zelluläre Proteasen zu einzelnen Aminosäuren abgebaut werden<sup>6</sup>.



**Abb. 3.2 Proteasomaler Abbau von Proteinen nach Berg und Tymoczko<sup>6</sup>.**

Das 26S-Proteasom besteht aus zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten und einer katalytischen 20S-Untereinheit. Ubiquitinylierte Proteine werden durch die 19S-Untereinheit erkannt und gebunden. Als Isopeptidase spaltet die 19S-Untereinheit die Ubiquitine vom Substrat, sodass das Substrat durch das Proteasom abgebaut werden kann.



### 3.2 AAA-ATPase p97/VCP

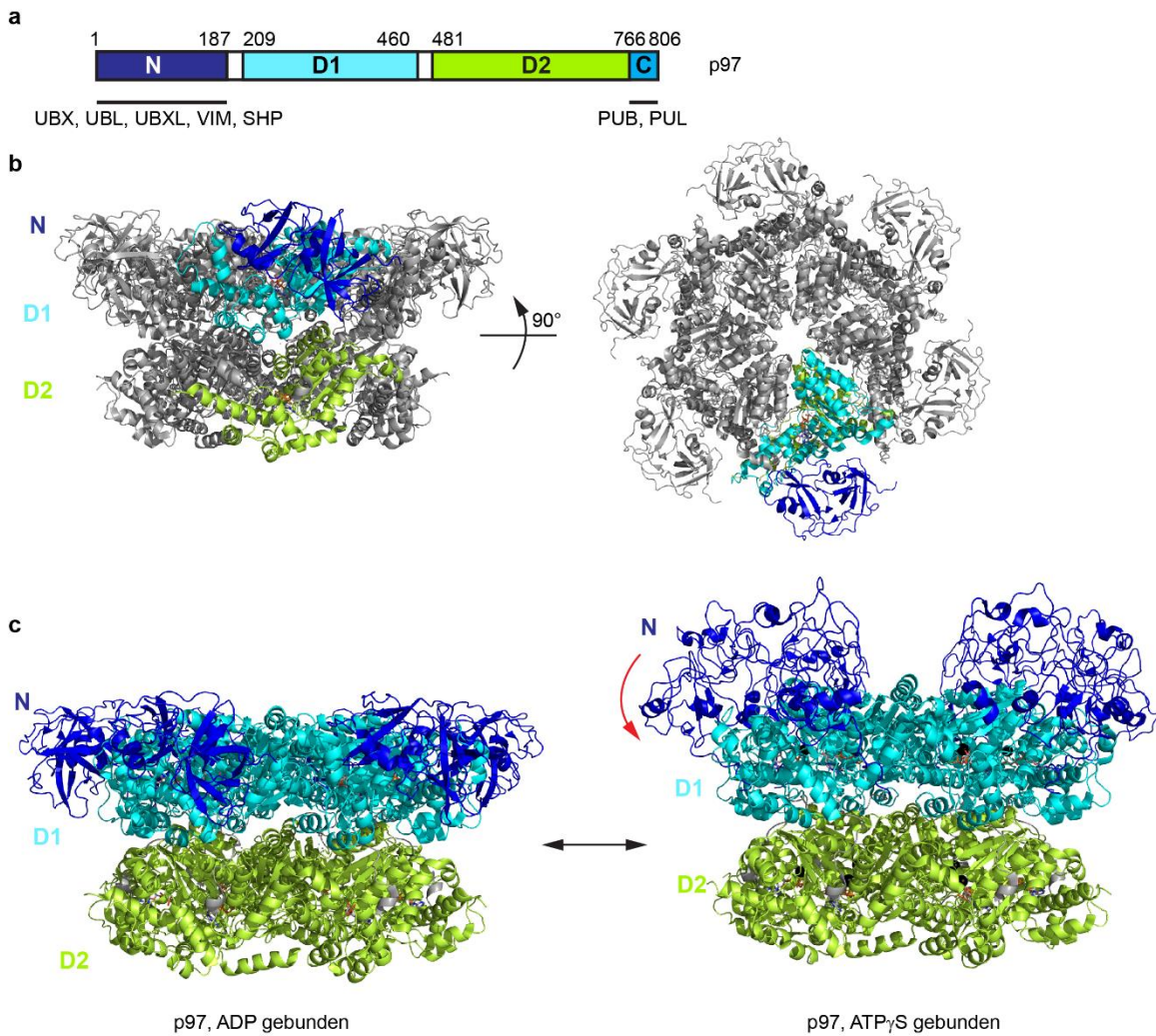
Das Protein p97 / VCP (*Vasolin Containing Protein*) ist ein Homohexamer und gehört zu den AAA-ATPasen (*ATPase Associated with diverse cellular Activities*)<sup>18,19</sup>. Die ATPase p97 übernimmt eine große Rolle in diversen zellulären Prozessen wie ER-assoziiierter, Ribosomal-assoziiierter oder Mitochondrial-assoziiierter Proteinabbau, sowie Autophagie, DNA-Reparatur und Membranfusion<sup>20-25</sup>. Um die Vielzahl an Aufgaben zu übernehmen interagiert p97 mit unterschiedlichen Cofaktoren wie z.B. UBXD1<sup>26</sup>. Zudem sind die Cofaktoren wichtig für die Substratrekrutierung und die zelluläre Lokalisation von p97. Als molekulare Maschine kann p97 in den zuvor genannten Prozessen fehlgefaltete Proteinsubstrate entfalten<sup>18</sup>. Zum humanen p97 wurden bisher auch zahlreiche p97-Homologe in *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc48)<sup>27,28</sup>, *Xenopus laevis*<sup>29</sup>, *Arabidopsis thaliana*<sup>30</sup>, *Trypanosomen*<sup>31</sup> und *Thermoplasma acidophilum*<sup>32,33</sup> beschrieben. Die starke Konservierung dieses Proteins unterschreicht die wichtige Funktion von p97 in unterschiedlichen Lebewesen. Die Funktion von p97 in diversen zellulären Prozessen kann durch Mutationen im p97-Gen gestört werden, was zur Ausbildung unterschiedlicher Krankheitsbilder führt. Die einzelnen Mutationen können zur Änderung der p97-Konformation beitragen, was den Entfaltungsprozess beeinträchtigen kann<sup>34</sup>. Bisher sind 29 Aminosäurepositionen mit 44 Mutationen bekannt, die sowohl neurologische Erkrankungen wie ALS (Amyotrophe Lateralsklerose) oder frontemporale Demenz, Erkrankungen der Muskeln (Einschlusskörpermyopathie) oder der Knochen (Paget Knochenkrankheit) auslösen können<sup>35</sup>. Das Auftreten dieser Krankheitsbilder kann als MSP1 (Einschlusskörpermyopathie mit Paget Knochenkrankheit und frontemporaler Demenz, kurz IBMPFD) zusammengefasst werden<sup>35</sup>.

#### 3.2.1 Struktur und Interaktion von p97

Das p97-Protein besteht aus 806 Aminosäuren und bildet ein Hexamer mit einer Höhe von 80 Å und einem Durchmesser von 140-160 Å. Ein p97 Monomer besteht aus einer N-Domäne (1-199), zwei ATPase-Domänen (D1: 209-460, D2: 481-763) und einem unstrukturierten 40 Aminosäuren langen C-Terminus (766-806) (siehe Abb. 3.3 a).

Die p97-N-Domäne besteht aus zwei Subdomänen, einer N-terminalen doppelten Ψ-Fassfaltung und die C-terminale Domäne eine viersträngige β-Fassfaltung ausbildet<sup>36</sup>. Beide Subdomänen werden durch einen Linker verbunden. Die ATPase-Domänen (D1 und D2) setzen sich ebenfalls aus zwei Subdomänen zusammen. Zum einem aus einer N-terminalen α/β-Subdomäne und aus einer C-terminalen α-helikalen Subdomäne<sup>36</sup>. Durch die zwei ATPase-Domänen D1 (209-460) und D2 (481-763) generiert p97 durch ATP-Hydrolyse Energie für den Entfaltungsprozess und die koordinierte Bewegung der Domänen.

Jede ATPase-Domäne besitzt ein Walker A- (P-Loop; G(x)<sub>4</sub>GKT) zur Bindung und ein Walker B- (hhhhDE, h = Hydrophobe Aminosäure) Motiv zur Hydrolyse von ATP<sup>26</sup>. Durch Cryo-Elektronenmikroskopie konnten unterschiedliche Konformationen des p97-Hexamers durch die Bindung von ATP und ADP festgestellt werden (pdb 5ftk und 5ftn)<sup>37</sup>. Durch die Bindung von ADP an die ATPase-Domänen D1 und D2, nimmt p97 eine *down*-Konformation ein, wobei sich die N-Domäne nach unten klappt und sich mit der D1-Domäne auf einer Ebene befindet (siehe Abb. 3.3 c, links). Durch die Bindung von ATP bzw. das nicht-hydrolysierbare ATP<sub>γ</sub>S befindet sich das Hexamer in einer *up*-Konformation (siehe c, rechts)<sup>37</sup>. Diese Konformationen können sich dabei abwechseln und somit zu einer rotierenden Konformationsänderung führen, die die Gestalt einer Wendeltreppe annimmt. Das *up/down*-Equilibrium hängt dabei vom gebundenen ATP/ADP sowie unterschiedlicher Mutationen ab, die auch in p97-verknüpften Krankheitsbildern auftauchen, wie R95G und T262A<sup>34</sup>. Die sich abwechselnde Konformationen sind dabei wichtig für die Entfaltung fehlgefalteter Proteine. Der C-Terminus bildet die letzten 40 Aminosäuren (766-806) und liegt unstrukturiert vor. In der Kristallstruktur ist der C-Terminus aufgrund seiner Flexibilität nicht sichtbar.



**Abb. 3.3 Struktur der AAA-ATPase p97.**

**a:** Domänenarchitektur von p97. Domänen sind farblich markiert: N-Domäne, dunkelblau; D1-Domäne, cyan; D2-Domäne, grün; C-Terminus blau. Für die jeweiligen Domänen sind Interaktionspartner eingezeichnet. **b:** Proteinstruktur der p97-Hexamerstruktur (pdb 5ftk). Ein Monomer ist farblich dargestellt nach dem Farbschema aus a. Links: Seitenansicht, Rechts: Topansicht. Aufgrund der hexameren Struktur bildet sich in der Mitte eine zentral gelegene hydrophobe Pore, wodurch die fehlgefalteten Proteine entfaltet werden. **c:** Konformationsänderungen durch die Bindung von ADP oder ATP. Links: *down*-Konformation durch gebundenes ADP (pdb 5ftk). Rechts: *up*-Konformation durch gebundenes ATP $\gamma$ S (pdb 5ftn). Gebundenes ADP / ATP $\gamma$ S ist als Stabmodell dargestellt. Abbildungen wurde mit PyMol erstellt.

### 3.2.2 Interaktion mit p97

Die unterschiedlichen p97-Cofaktoren können aufgrund ihrer Interaktion / Domänen in sieben Gruppen unterteilt werden (siehe Tab. 3.1).

**Tab. 3.1 p97-Interaktionspartner.**

Domäne	p97-Interaktion	Bindungspartner <sup>26,38</sup>
UBX ( <i>Ubiquitin regulatory X</i> )	N-Domäne	p47 <sup>39</sup> , p37 <sup>40</sup> , Erasin, FAF1 <sup>41</sup> , SAKS <sup>42</sup>
UBXL ( <i>UBX-like</i> )	N-Domäne	Npl4 <sup>43</sup> , Out1 <sup>44</sup>
BS1/Shp box ( <i>binding site 1</i> )	N-Domäne	Ufd1 <sup>43</sup> , Derlin-1 <sup>45,46</sup>
VBM ( <i>VCP binding motif</i> )	N-Domäne	Ataxin-3 <sup>47</sup>
VIM ( <i>VCP interacting motif</i> )	N-Domäne	UBXD1 <sup>48,49</sup> , gp78 <sup>50</sup>
PUB ( <i>Peptide:N-glycanase/UBA or UBX-containing protein</i> )	C-Terminus, PIM	UBXD1 <sup>49,51</sup> , PNGase <sup>52,53</sup> , HOIP <sup>54</sup>
PUL ( <i>PLAP, Ufd3p and Lub1p</i> )	C-Terminus, PIM	PLAA <sup>55</sup>

An die N-Domänen können unterschiedliche Cofaktoren binden. Die Cofaktoren können über UBX- und UBL-Domänen durch das konservierte F/P-P-R/K-Motiv an die p97-N-Domäne binden<sup>19</sup>. Analog zum FPR-Loop der UBX-Domäne zeigt die Kristallstruktur der UBXL-Domäne von YOD1, dass dieser Cofaktor mit seinem YPP-Loop an die hydrophobe Bindetasche von p97-N bindet<sup>19,56</sup>. Anders als eine Domäne, können lineare Peptidsequenzen VIM (*VCP interacting motif*, Konsensussequenz RX<sub>5</sub>AAX<sub>2</sub>R), VBM (*VCP binding motif*, Konsensussequenz: EhRRRRLxhh, h = Hydrophobe Aminosäure) und SHP (*BS1, binding segment*, Konsensussequenz: hx<sub>1-2</sub>F/Wx<sub>0-1</sub>GxGx<sub>2</sub>L, h = Hydrophobe Aminosäure) ebenfalls an die N-Domäne binden<sup>19</sup> (siehe Abb. 3.3 a).

Beim C-Terminus (766-806) von p97 werden die letzten 10 Aminosäuren als PIM (*PUB interacting motif*, Sequenz: <sup>796</sup>TEDNDDDL<sup>806</sup>YG<sup>806</sup>) von Cofaktoren durch die PUB- oder PUL-Domäne gebunden<sup>19,26,51,52,54</sup>. Die Bindung zwischen PIM und PUB/PUL basiert auf hydrophoben und elektrostatischen Interaktionen, die p97-Y805 und die sauren Aminosäuren in PIM binden. Die PUB-/PUL-Domänen haben eine hydrophobe Bindungstasche, welche von geladenen Aminosäuren gerahmt ist und somit die elektrostatischen Bindungen ausbilden kann<sup>19</sup>. Die Interaktion mit dem C-Terminus ist dabei durch PTMs gesteuert. Die für die Interaktion wichtige Aminosäure Y805 kann phosphoryliert werden, wodurch die Bindung zwischen PIM und PUB/PUL nicht mehr stattfinden kann<sup>51,52</sup> (siehe Abb. 3.3 a).

### 3.2.3 ATPase-Aktivität von p97

Das p97 besitzt zwei ATPase-Domänen (D1 und D2) die durch ATP-Hydrolyse die Energie für die Entfaltung bereitstellen. Unter optimalen Bedingungen hat p97 eine Michaelis-Menten-Konstante von ungefähr  $K_M = 0,33 \text{ mM}$  und eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von  $v_{\max} = 0,52 \text{ nmol Pi / min / } \mu\text{g p97}^{57}$ . Je nach Beschaffenheit und Zellorganismus kann die ATPase-Aktivität von p97 und seinen Homologen anders ausfallen. Die D1-Domäne ist für die Hexamerisierung des Proteins zuständig und die D2-Domäne vorwiegend für die ATPase-Aktivität<sup>57</sup>. Für die Aktivität sind zweiwertige Kationen notwendig, wobei Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) im Gegensatz zu Mangan, Cobalt, Kupfer, Eisen, Zink, Calcium, Chrom und Cadmium die besten Ergebnisse liefert. Zu hohe Konzentrationen an Magnesium und Salz (NaCl) wirken hingegen inhibierend<sup>57</sup>. Die ATPase-Aktivität wird durch unterschiedliche Faktoren reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass wie zuvor beschrieben hohe Salzkonzentrationen inhibierend wirken, zudem ist die Aktivität abhängig von den ATP- und ADP-Konzentrationen. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit ist bei 3 mM ATP erreicht, wohingegen ADP inhibierend wirkt<sup>57</sup>. Positiv wirken sich hingegen hohe Temperaturen von 50-55 °C aus<sup>57</sup>.

Doch haben nicht nur physiologische Faktoren wie Temperatur und Salzgehalt, sondern auch p97-Cofaktoren einen Einfluss auf die ATPase-Aktivität. Der Cofaktoren p47<sup>58</sup> inhibiert die ATPase-Aktivität von p97 als nicht-kompetitiver Inhibitor in zwei Phasen. In der ersten Phase inhibiert p47 bei niedrigeren Konzentrationen die ATPase-Aktivität um 68 %. Bei steigender p47-Konzentration kommt es zur zweiten Phase der Inhibition von bis zu 30 %. Die unterschiedliche Inhibition durch p47 hängt dabei von dem molaren Verhältnis von p47 zu p97 ab. In Phase 1 liegt eine 1:1 Bindung vor, bei steigender Konzentration binden p47-Trimere an p47 was zu einer verringerten Inhibition führt<sup>59</sup>. Für p37 konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität von 100 % auf 380 % steigert<sup>59</sup>. Bei UBXD1 konnte Trusch *et al.* zeigen, dass der UBXD1-N-Terminus die N-Domäne in einer *down*-Konformation fixiert und somit die Aktivität inhibiert<sup>48</sup>. In einem Entfaltungskomplex wie z.B. p97:Ufd1:Npl4 wird die ATPase-Aktivität hingegen positiv stimuliert<sup>60</sup>.

### 3.2.4 Entfaltungsprozess durch p97

Fehlgefaltete Proteine werden durch Ubiquitin als PTM zum Abbau markiert, anschließend durch p97-Komplexe erkannt und entfaltet<sup>18</sup>. Ein gut untersuchter Komplex ist der Entfaltungskomplex aus p97 mit Ufd1:Npl4. Die Proteine Ufd1 (*Ubiquitin fusion degradation 1*) und Npl4 (*Nuclear Protein Localization 4*) bilden zusammen eine Heterodimeren Komplex, welcher durch die Npl4-UBXL-Domäne an die p97-N-Domäne binden kann<sup>43</sup>. Beide Proteine binden Ubiquitin und können somit die Entfaltung polyubiquitinylierter Proteine durch p97 einleiten<sup>60</sup>. Aufgrund der hexameren Struktur bildet sich in der Mitte eine zentral gelegene hydrophobe Pore, wodurch die fehlgefalteten Proteine entfaltet werden (siehe Abb. 3.3 b, rechts). Tonddast-Navaei und Stan haben 2013 molekulardynamische Berechnungen zum Entfaltungsprozess eines Substratpeptides durch p97 durchgeführt<sup>61</sup>. Sie konnten zeigen, dass die benötigte Energie geringer ist, wenn das Substrat durch die Pore der D1-Domäne (cis-Seite) eingefädelt wird, als durch die Pore der D2-Domäne (trans-Seite). Twomey *et al.*<sup>62</sup> konnten 2019 durch Cryo-EM die Struktur des p97:Ufd1:Npl4-Komplexes, während der Entfaltung eines ubiquitinylierten Proteins aufklären. Dabei erfolgte das Einfädeln des Ubiquitins zur Entfaltung über die Pore der D1-Domäne. Die Energie zur Entfaltung des ubiquitinylierten Proteins erfolgt durch einen rotierenden Mechanismus aus ATP Bindung, Hydrolyse und Freisetzung von ADP in den sechs D2-Domänen<sup>62</sup>. Dieser Vorgang wird wiederholt bis das Protein vollständig durch die Pore des p97-Hexamers geschleust und somit entfaltet wurde.

### 3.3 UBXD1

Bei UBXD1 (*UBX domain-containing protein 1*), auch UBXN6 genannt handelt es sich um einen Cofaktor der AAA-ATPase p97/VCP (*Vasolin containing protein*)<sup>49</sup>.

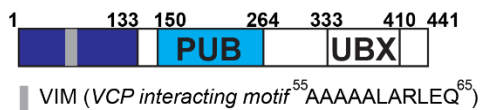
Das UBXD1-Gen ist im Menschen auf Chromosom 19p13 lokalisiert und ist 1820 Nukleotide lang. Das Gen liegt in zwei Splicevarianten vor. Die längere Version ist 441 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 49,75 kDa, wohingegen die kürzere Variante nur aus 338 Aminosäuren besteht und somit 53 Aminosäuren weniger am N-Terminus aufweist<sup>63</sup>. Das UBXD1-Protein ist evolutionär in Eukaryonten (außer Fungi) konserviert<sup>63-65</sup>, es zeigt eine 80 % Sequenzidentität und eine 87 % Sequenzähnlichkeit zwischen Mensch (*Homo sapiens*) und der Maus (*Mus musculus*). Zwischen Ratte (*Rattus*) und Maus (*Mus musculus*) besteht eine Identität von 96 % und eine Ähnlichkeit von 97 %, was dazu führt dass es zwischen Mensch (*Homo sapiens*) und der Ratte (*Rattus*) eine Identität von 79 % und eine Ähnlichkeit von 88 % gibt<sup>63</sup>. UBXD1 wird reichlich in Zellen exprimiert und ist im Zellkern, dem Centrosom, dem Cytosol, Lysosomen, Endosomen sowie den frühen Endosomen zu finden<sup>64</sup>.

Als p97-Cofaktor bindet UBXD1 über zwei Bindestellen an das hexamere p97. Der N-Terminus mit seiner VIM (*VCP interacting motif*)-Helix bindet an die N-Domäne von p97<sup>48,49</sup>. Dabei inhibiert der N-Terminus die ATPase-Aktivität von p97<sup>48</sup>. Die PUB (*Peptide:N-glycanase and UBA or UBX-containing proteins*)-Domäne bindet dabei an die letzten 10 Aminosäuren des p97-C-Terminus, auch PIM (*PUB interacting motif*) genannt<sup>49,51</sup>. Unter den p97-Cofaktoren ist UBXD1 eine Besonderheit, da es der einzige Cofaktor ist, der zwei p97-Bindestellen hat<sup>22,26,49</sup>. Über die funktionelle Bedeutung von UBXD1 als Cofaktor ist bisher wenig bekannt. Kern *et al.*<sup>49</sup> hat aufgrund der zwei p97-Bindestellen in UBXD1 postuliert, dass UBXD1 als Reset-Knopf für die Mechanismen von p97 fungieren könnte. Durch die Studien von Nagahama *et al.*<sup>65</sup> konnte gezeigt werden, dass UBXD1 einen regulatorischen Einfluss auf den Proteasome-unabhängigen ER-assoziierten Proteinabbau (ERAD-System) ausübt, da knock-down- und Überexpressions-Studien gezeigt haben, dass es dabei zu Störungen im ERAD-System kommen kann<sup>65</sup>.

Papadopoulos *et al.*<sup>21</sup> haben gezeigt, dass UBXD1 zusammen mit p97, YOD1 (*Ubiquitin thioesterase*) und PLAA (*phospholipase A2-activating protein*) in einem ELDR (*Endo-Lysosomal Damage Response*)-Komplex für die Autophagie von beschädigten Lysosomen nachweisbar ist. Auch ohne weitere Cofaktoren bildet UBXD1 einen funktionierenden Proteinkomplex mit p97 der zur Bindung von Caveolin-1 bei Endosomen führt<sup>66</sup>.

### 3.3.1 Struktur von UBXD1

Das humane UBXD1 besteht aus einem N-Terminus (1-149) mit dem p97-Bindemotiv VIM (52-63), einer PUB-Domäne (150-264) und einer C-terminalen UBX-Domäne (siehe Abb. 3.4).



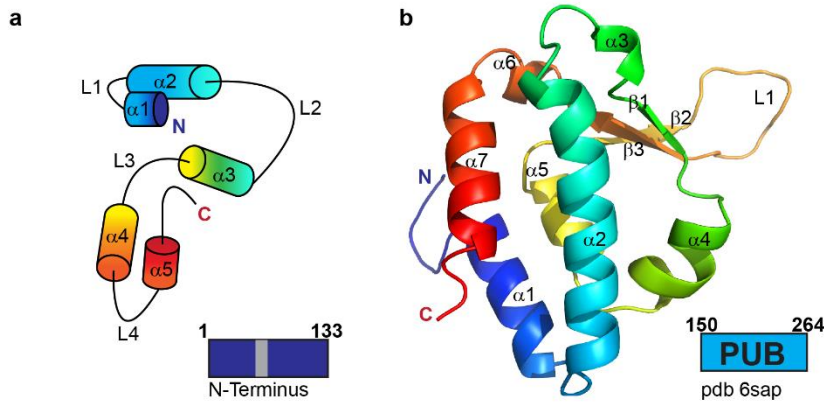
#### Abb. 3.4 Domänenstruktur von UBXD1.

UBXD1 ist 441 Aminosäuren lang und besitzt drei Domänen: Der N-Terminus, welches das VIM-Motiv enthält (55-65), die PUB-Domäne (150-264) und die UBX-Domäne (333-410).

Der N-Terminus von UBXD1 ist intrinsisch unstrukturiert mit einem  $\alpha$ -helicalen Charakter (46 %  $\alpha$ -Helix, 18 %  $\beta$ -Strang, 33 % unstrukturiert)<sup>48</sup>. Trush *et al.*<sup>48</sup> hat ein Strukturmodell berechnet, indem der N-Terminus 5  $\alpha$ -Helices bildet ( $\alpha$ 1: 1-5,  $\alpha$ 2: 10-25,  $\alpha$ 3: 50-65,  $\alpha$ 4: 77-91,  $\alpha$ 5: 102-108). Das VIM Motiv ist 11 Aminosäuren lang (55-65) und liegt am N-Terminus in der dritten  $\alpha$ -Helix des Strukturmodells (siehe Abb. 3.5 a). Das VIM-Bindemotiv ist hoch konserviert und lässt sich als Konsensussequenz  $RX_5AAX_2R$  beschreiben, welche mit der N-Domäne von p97 interagiert<sup>48,49</sup>. Durch die Bindung des N-Terminus an p97 wird die ATPase-Aktivität von p97 inhibiert<sup>48</sup>.

Die PUB-Domäne von UBXD1 wird definiert von Aminosäure 150 bis 264 und ist 13,8 kDa groß. Die NMR-Struktur (pdb 6sap) wurde 2019 veröffentlicht und besteht aus 7  $\alpha$ -Helices mit 3  $\beta$ -Strängen, die sich zu einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt zusammenlagern (siehe Abb. 3.5 b). Dabei bilden 4  $\alpha$ -Helices eine antiparallele Anordnung aus  $\alpha$ 1 (153-164),  $\alpha$ 2 (168-187),  $\alpha$ 5 (214-220) und  $\alpha$ 7 (250-261)<sup>51,67</sup>. Die Struktur der UBXD1-PUB-Domäne hat dabei eine hohe Ähnlichkeit zu homologen PUB-Domänen wie die der PNGase-<sup>52,53</sup>, HOIP-<sup>54,68</sup> und SPATA2-PUB-Domäne<sup>69</sup>. Ein einzigartiges Motiv der UBXD1-PUB-Domäne ist eine erweiterte Loop-Struktur (L1) (siehe Abb. 3.5 b)<sup>51</sup>. Homolog zu anderen PUB-Domänen bindet die UBXD1-PUB-Domäne an den C-Terminus von p97, auch PIM (*PUB interacting motif*, Sequenz: <sup>796</sup>TEDNDDDLYG<sup>806</sup>) genannt. Die PIM-Bindestelle repräsentiert dabei die konservierte  $\Phi$ - $\Psi$  Bindungstasche der PNGase- und HOIP-PUB<sup>52-54,68,69</sup>, welche ebenfalls die PIM Sequenz binden kann. Durch eine Kinase katalysierte Phosphorylierung an p97-Tyrosin 805 kann die Bindung zwischen PUB und p97 inhibiert werden<sup>38,51</sup>.

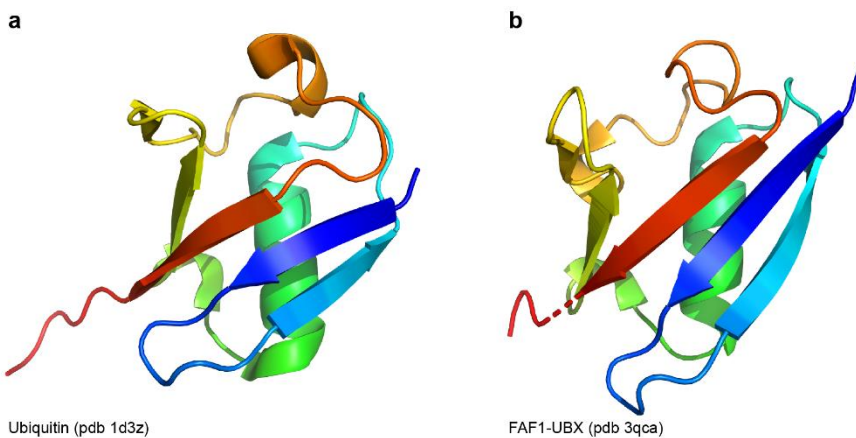




**Abb. 3.5 UBXD1-Domänen Strukturen.**

**a:** Strukturmodell nach Trush et al.<sup>48</sup> vom UBXD1-N-Terminus.  $\alpha 1$ : 1-5,  $\alpha 2$ : 10-25,  $\alpha 3$ : 50-65,  $\alpha 4$ : 77-91,  $\alpha 5$ : 102-108. **b:** NMR-Struktur der PUB-Domäne (150-264), pdb: 6sap.

Die UBX-Domäne (*Ubiquitin regulatory X*, Aminosäure 333-410) ist eine konservierte Domäne in der Proteinfamilie, die eine UBX- oder UBX-ähnliche Domäne besitzen und bilden die größte Gruppe an p97-Cofaktoren<sup>26,38,70</sup>. Die UBX-Domäne hat ein konserviertes  $\beta$ -Faltblatt Motiv ( $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ) und ist ein Strukturhomolog zu Ubiquitin<sup>70,71</sup> (siehe Abb. 3.6). Homologe UBX-Domänen binden über ein F/P-P-R/K-Motiv an die N-Domäne von p97<sup>38,70,71</sup>. Dieser hydrophobe Bereich wurde als die Hauptbindestelle in der UBX-Domäne identifiziert<sup>72</sup>. Die Funktion der UBXD1-UBX-Domäne ist bisher unbekannt, da ihr das kanonische F/P-P-R/K-Motiv fehlt, um an die p97-N-Domäne zu binden<sup>20,49,70</sup>.



**Abb. 3.6 Die UBX-Domänen zeigen eine Ubiquitin Faltung.**

**a:** NMR-Struktur von Ubiquitin (pdb 1d3z). **b:** Kristallstruktur der FAF1-UBX-Domäne (pdb 3qca). Die UBX-Domäne weist eine Strukturähnlichkeit zu Ubiquitin auf und zeigt dieselbe Orientierung der  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices.

### 3.3.2 Interaktion mit p97

Die Interaktion zwischen UBXD1 und p97 findet über den N-Terminus und die PUB-Domäne statt<sup>48,49,51</sup>. Der N-Terminus und die VIM-Helix binden an die N-Domäne von p97<sup>48,49</sup>. Interaktionsstudien haben gezeigt, dass die PUB-Domäne dagegen den die letzten 10 Aminosäuren des C-Terminus, auch PIM (*PUB interacting motif*) genannt, von p97 bindet<sup>51</sup>. Der N-Terminus konnte von Kern *et al.*<sup>49</sup> als Bindestelle für die N-Domäne von p97 identifiziert werden. Beim N-Terminus konnten zwei Bindungsepitope für die p97-N-Domäne nachgewiesen werden: die aus anderen p97-Cofaktoren bekannte VIM (*VCP interacting motif*)-Helix und ein Bindungsepitop in der zweiten  $\alpha$ -Helix des N-Terminus<sup>48</sup>.

Die PUB-Domäne bindet über eine konservierte hydrophobe Bindetasche zwischen der zweiten und vierten  $\alpha$ -Helix (siehe Abb. 3.5 b) mit Y181 und Y194 an p97-Y805<sup>51</sup>. Der Rand der Bindetasche besteht dabei aus positiv geladenen Aminosäuren (K180, K193, K196, K198, K202 und R207), welche die sauren Aminosäuren in PIM (p97: <sup>796</sup>TEDNDDDLYG<sup>806</sup>) zusätzlich binden. Mutationen in der VIM-Helix (RL62/63AA) und dem N-Terminus (DI11/12AA)<sup>48</sup>, sowie der PUB-Domäne (Y181A, N184D, Y194F, N201D)<sup>51</sup> führen zur Inhibition bis zum totalen Bindungsverlust der jeweiligen Bindestelle an p97.

Als UBXD1:p97-Komplex ist UBXD1 in unterschiedlichen zellulären Prozessen involviert. Beim Abbau von beschädigten Lysosomen bindet der ELDR (*Endo-Lysosomal Damage Response*)-Komplex an polyubiquitinylierte Lysosomen, um die Bildung von Autophagosomen zu fördern. Der ELDR-Komplex setzt sich dabei aus p97, YOD1, PLAA und UBXD1 zusammen<sup>21</sup>. Beim Abbau von geschädigten Zellorganellen ist UBXD1 an der Mitophagie, dem Abbau beschädigter Mitochondrien beteiligt<sup>73</sup>. Zusätzlich zur Mitophagie ist UBXD1 mit p97 auch an Mitochondrien-assoziiierter Degradation (MAD) beteiligt<sup>74</sup>.

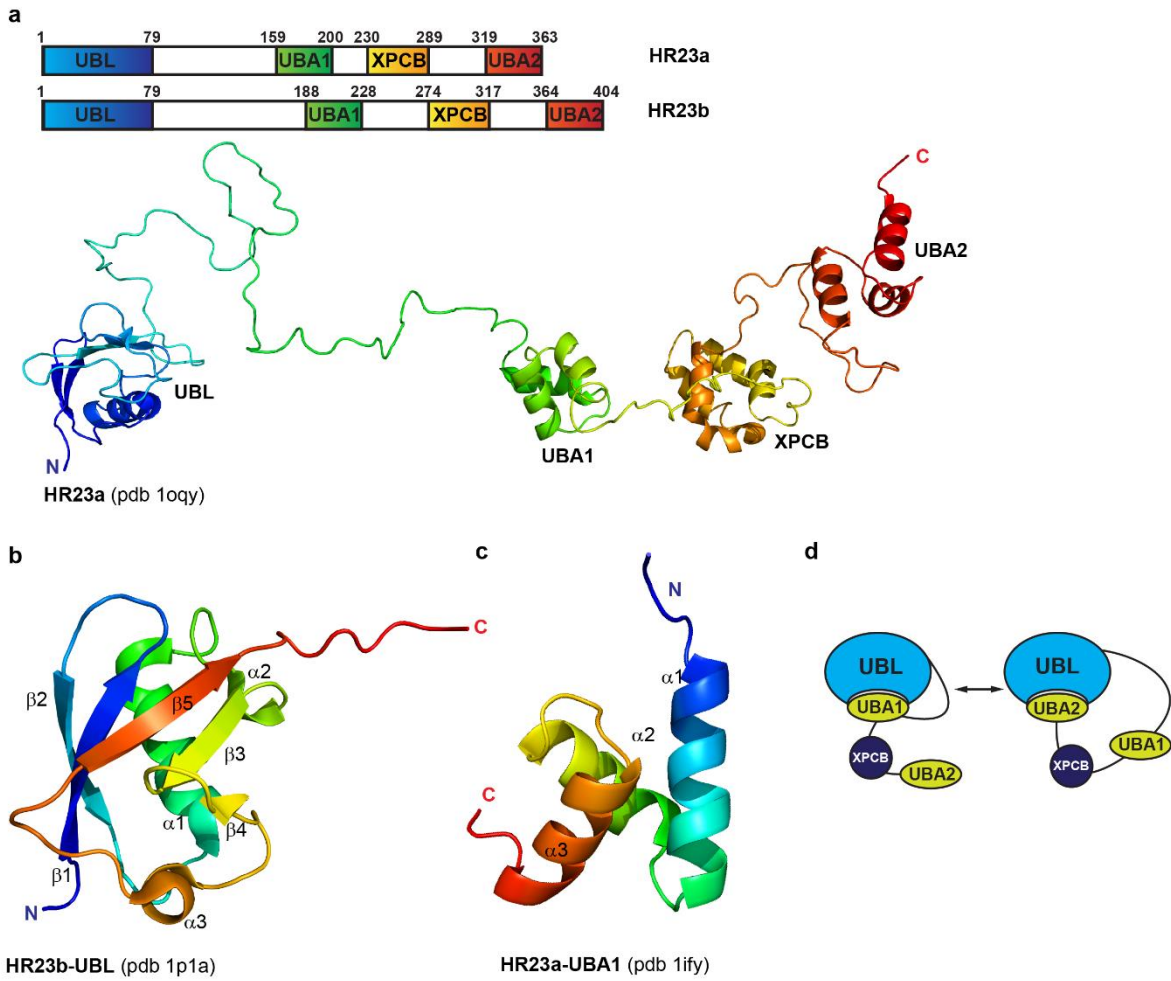
### 3.4 Proteasomtransportfaktor HR23

Das Protein HR23 (*UV excision repair protein RAD23*) weist im Menschen zwei Isoformen A (1-363) und B (1-409) auf (siehe Abb. 3.7 a). Sie gehören zur Familie der UBL/UBA-Proteinfamilie, welche sich durch die UBA (*Ubiquitin associated*)-Domänen und UBL (*Ubiquitin-like*)-Domäne auszeichnen. Es besteht aus einer N-terminalen UBL-Domäne, sowie einer zentralen UBA1- und einer C-terminalen UBA2-Domäne. Zwischen beiden UBA-Domänen befindet sich eine XPCB (*xeroderma pigmentosum group c binding*)-Domäne (siehe Abb. 3.7 a). Die voneinander unabhängigen Domänen werden dabei durch unstrukturierte Linkerregionen getrennt.

Die UBL-Domäne von HR23 ist 79 Aminosäuren lang und zeigt eine Ubiquitinähnliche Tertiärstruktur<sup>75,76</sup>. Homologe UBL-Domänen sind ebenfalls um die 80 Aminosäuren lang<sup>76</sup>. Die HR23-UBL-Domäne besteht aus drei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ 1-3), sowie aus 5  $\beta$ -Strängen ( $\beta$ 1-5) die sich zu einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt zusammenlagern (siehe Abb. 3.7 b).

UBA-Domänen sind kleine Domänen welche meistens aus 45 Aminosäuren bestehen und sind in unterschiedlichen Proteinen zu finden, welche am Ubiquitin-Proteasom-Prozess beteiligt sind<sup>77,78</sup>. Die Struktur besteht aus drei kompakten  $\alpha$ -Helices die sich aneinander lagern (siehe Abb. 3.7 c). Bei HR23 haben beide UBA-Domänen einen konservierten hydrophoben Bereich (HR23a-UBA1: I167, I170, Y175, V180, V18, A183, L184, P191, A194, V195, L196), der die Struktur stabilisiert und an den Bindungspartner wie z.B. Ubiquitin bindet<sup>77,79</sup>.

HR23 ist beteiligt an der DNA Reparatur sowie dem Proteasom-vermittelten Proteinabbau<sup>80-82</sup>. Beim vermittelten Proteinabbau fungiert es als Proteasomtransportfaktor für ubiquitylierte Proteine zum Proteasom. Dazu interagiert die UBL-Domäne mit Rpn1 oder Rpn10 der 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms, die UBA-Domänen binden dabei an Ubiquitin<sup>83-87</sup>. Die UBA-Domänen favorisieren bei der Bindung K48-verknüpfte Ubiquitinketten und binden ebenfalls an K63-Ubiquitinketten, allerdings mit einer niedrigeren Affinität / höhere Dissoziationskonstante als K48-Ubiquitinketten<sup>85,88</sup>. Um die zum proteasomalen Abbau bestimmten polyubiquitylierten Proteine zu erkennen, interagiert die UBL-Domäne mit verschiedenen Ubiquitinbindenden Proteinen wie PNGase<sup>89</sup> oder S5a<sup>80,90</sup>. HR23 stabilisiert dazu noch Substrate des 26S-Proteasoms und inhibiert die Bildung von K48-verknüpften Ubiquitinketten<sup>76,79,91</sup>.



**Abb. 3.7 Proteinstruktur von HR23.**

**a:** Domänenarchitektur von HR23 Isoform A und B (oben). Unten: Proteinstruktur von HR23a in offener Konformation (pdb 1oqy). **b:** Proteinstruktur der HR23b-UBL-Domäne (pdb 1p1a). **c:** Proteinstruktur der HR23a-UBA1-Domäne (pdb 1ify). **d:** Intramolekulare Bindung der UBL-Domäne an die UBA-Domänen nach Walters *et al.*<sup>80</sup> und Kamiya *et al.*<sup>89</sup>.

### 3.5 Zielsetzung

Die AAA-ATPase p97 ist zusammen mit unterschiedlichen Cofaktoren wie PLAA, YOD1, Ufd1:Npl4, HOIP, PNGase oder p47 in diversen zellulären Prozessen (ER-assoziiertes, Ribosomen-assoziiertes oder Mitochondrien-assoziiertes Proteinabbau, sowie Autophagie, DNA-Reparatur und Membranfusion) beteiligt. Der Cofaktor UBXD1 wurde im Zusammenhang mit dem ER-assoziierten Abbau von Proteinen, Mitophagie, mitochondrialem Proteinabbau und dem Abbau geschädigter Lysosomen beschrieben. Dabei konnte bisher keine direkte Bindung zwischen UBXD1 und den polyubiquitinylierten Substraten von p97 nachgewiesen werden.

Um die genaue Funktion von UBXD1 als möglichen Ubiquitinbindungspartner zu untersuchen, soll sowohl die Bindung zwischen UBXD1 und Ubiquitin biochemisch charakterisiert als auch der Einfluss auf die p97-ATPase-Aktivität und ggf. der Entfaltungprozess von ubiquitinylierten Substraten untersucht werden.

Da für die Charakterisierung rekombinantes Protein benötigt wird, sollen die Proteinkonstrukte von UBXD1, Ubiquitin, p97 und HR23 in *E. coli* exprimiert und mittels FP-LC aufgereinigt werden. Alternativ zur Proteinexpression in Bakterienzellen, sollen Proteinkonstrukte in Säugetierzellen HEK293 exprimiert werden. Für die qualitativen Interaktionsstudien sollten mit den Proteinkonstrukten Pulldown-Experimente und eine massenspektrometrische Analyse gecrosslinkter Proteinkomplexe durchgeführt werden.

Um quantitativ die Dissoziationskonstanten der Bindungen zwischen UBXD1 zu Ubiquitin zu bestimmen, sollen Messungen mittels Isothermaler Titrationkalorimetrie sowie Fluoreszenzanisotropie-Titrations und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrations durchgeführt werden. Über Mutationen und Trunkationen der Proteinkonstrukte sollen mögliche Bindestellen deletiert oder geschwächt werden, um somit ihren Einfluss auf die Bindung zwischen UBXD1 und Ubiquitin zu untersuchen. Durch NMR-Experimente wie  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrations sollen die an der Bindung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Um die mögliche Ubiquitin-Bindestelle von UBXD1 weiter eingrenzen zu können, soll ein Alanin-Mutationsscan und ein Peptid-Array mit der UBXD1-Aminosäuresequenz und einer Mutantenmatrix durchgeführt werden. Da es keine vollständige Proteinstruktur von UBXD1 gibt, sollen durch chemisches Crosslinking und massenspektrometrische Analyse strukturelle Informationen generiert werden. Durch Datenbank-basierte Modellrechnungen (iTASSER) und Strukturmodellberechnungen mittels künstlicher Intelligenz (AlphaFold) soll mithilfe der Crosslinking-Daten ein finales UBXD1-Strukturmodell berechnet werden, das als Basis für die Interpretation der Interaktionsdaten von UBXD1 mit Ubiquitin dienen soll.

Da es sich bei UBXD1 um einen Cofaktor von p97 handelt, soll die Organisation von UBXD1 an p97 biochemisch charakterisiert werden. Dazu sollen die zuvor beschriebenen Methoden mit UBXD1 und p97 sowie mit Mutanten und Deletionskonstrukten mit Fluoreszenzanisotropie-Titrationsen und chemischen und photoreaktiven Crosslinking wiederholt werden. Die Interaktion von UBXD1 mit Ubiquitin und p97 soll im Zusammenhang der Entfaltung polyubiquitinylierter Substrate im Entfaltungskomplex untersucht werden. Dazu soll mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie die Entfaltung von ubiquitinylierten Substraten mit einem Entfaltungs-Assay gemessen werden. Da p97 für die Entfaltung ATP hydrolysieren muss, soll der Einfluss von UBXD1 auf die ATPase-Aktivität parallel mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie ein ATPase-Aktivitätsassay durchgeführt werden.

Da p97 im Proteasom-abhängigen Proteinabbau involviert ist und die UBXD1-PUB-Domäne eine Homologie zur PNGase-PUB-Domäne aufweist, soll desweiteren die mögliche Interaktion zwischen dem Proteasomtransportfaktor HR23 und UBXD1 ebenfalls quantitativ mittels NMR-Spektroskopie, Fluoreszenzanisotropie-Titrationsen und massenspektrometrischer Analyse eines gecrosslinkten UBXD1-PUB:hHR23-UBL-Komplexes untersucht werden.

Die aus diesen Experimenten gewonnen Erkenntnisse sollen das Gesamtbild von UBXD1 als p97-Cofaktor und seine Funktion in zellulären Prozessen weiter ergänzen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Tab. 4.1 Verwendete Chemikalien.

Nomenklatur	Abkürzung	Hersteller (Art.Nr.)
(-)-Riboflavin		Sigma Aldrich (R9504)
$\beta$ -Mercaptoethanol	$\beta$ ME	Carl Roth (4227.3)
1,4-Dithiothreitol	DTT	Carl Roth GmbH (6908)
4-4-Benzyl-L-phenylalanine	BpA	AmBeed (A126709)
Agar Agar		Carl Roth GmbH (5210.2)
Albumin	BSA	AppliChem panreac (A6588)
Ammoniumchlorid	$\text{NH}_4\text{Cl}$	Carl Roth (K298)
Ammoniumchlorid ( $^{15}\text{N}$ , 99 %)	$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	Cortecnet
Atto594-Maleimid		Atto-Tec GmbH (AD 594-45)
Atto594-NHS Ester		Atto-Tec GmbH (AD 594-31)
Biotin		AppliChem Panreac (A0969)
Brilliant Blue R250		Carl Roth GmbH (3862.1)
Bromphenolblau		Carl Roth GmbH (T116.1)
Calciumchlorid	$\text{CaCl}_2$	Carl Roth GmbH (A119.1)
Cobaltchlorid-Hexahydrat	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Fluka (17739)
D(+)-Glucose		Carl Roth GmbH (X9972)
D-Glukose		Carl Roth (X997)
D-Glukose ( $^{13}\text{C}6$ , 99 %)		Cambridge Isotope laboratories Inc. (CLM-1396-10)
Diammoniumhydrogencitrat		Fluka (09833)
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma Aldrich (D8418)
Dinatriumhydrogenphosphat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	AppliChem Panreac (A3599)
Disuccinimidylsulfoxid	DSSO	Thermo Scientific (A33545)
D-Pantothenic acid		Sigma Aldrich (R2250)
Dpnl (FastDigest)		ThermoFisher Scientific (FD1704)
EDTA Dinatriumsalzdihydrat		Carl Roth GmbH (8043.2)
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich (44944)
Eisessig (Essigsäure)	HAc	Fisher Scientific UK (A/0400/PB17)
Ethanol analytisch	EtOH	Fisher Scientific UK (E/0650DF/17)
Fetales Rinderserumalbumin (dialysiert)	FBS	Gibco (A33820-01)
Fetales Rinderserumalbumin Supreme	FBS	PAN Biotech (P30-3031)
Folsäure		Sigma Aldrich (F7876)
GST-HRV3C-Protease	PreSc	Eigene Herstellung
Hefeextrakt		AppliChem Panreac (A1552)
HEPES		Carl Roth (9105)
Imidazol		Carl Roth GmbH (X998.4)
IPTG		AppliChem Panreac (A1008)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	IPTG	AppliChem Panreac (A1008)
Kaliumdihydrogenphosphat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Carl Roth GmbH (3904.1)
Kupfersulfat	$\text{CuSO}_4$	Carl Roth GmbH (P023.1)
L-Arabinose		Carbolution (CC06011)
L-Glutathion, reduziert		AppliChem Panreac (A2084)
Lysozym		AppliChem Panreac (A3711)
Magnesiumsulfat	$\text{MgSO}_4$	Fluka (63139)
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat	$\text{MnCl} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich (203734)

Mangansulfat	Mn <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fluka (63139)
Methanol		Fisher Scientific UK
Milchpulver	MP	AppliChem Panreac (A0830)
Natriumchlorid	NaCl	AppliChem Panreac (A4661)
Natriumhydroxid	NaOH	Bernd Kraft (06020.3600)
Nicotinamid		AppliChem Panreac (A0959)
Pfu-Plus! DNA Polymerase modifiziert, rekombinant		Roboklon Eurx (E1118-02)
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	SERVA (32395)
Photo-Leucine	pLeu	Thermo Scientific (22610)
Photo-Methionine	pMet	Thermo Scientific (26615)
Ponceau S		Carl Roth (5938.1)
Rubidiumchlorid	RbCl	Sigma Aldrich (R2252)
Salzsäure (37 %)	HCl	Sigma Aldrich (30721)
SDS granulated		AppliChem Panreac (A7249)
Thiaminhydrochlorid		Carl Roth GmbH (T911.1)
Thrombin-Protease (Humanes Plasma)		Merck (605195)
Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochlorid	TCEP	Sigma (646547)
Triton X-100		Carl Roth (3051.3)
Trypsin-Lösung (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA)		PAN biotech (P10-023100)
Trypton		AppliChem Panreac (A1553)
Tween 20		AppliChem Panreac (A4974)
Vitamin B12		Sigma Aldrich (V2876)
Zinksulfat-Heptahydrat	ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH (K301.1)



### 4.1.2 Antikörper

Im folgenden sind die zum Nachweis von Proteinen verwendeten Antikörper aufgelistet:

**Tab. 4.2 Verwendete Antikörper für Westernblot und Co-Immunopräzipitation.**

Antigen (Organismus)	Organismus	Kettentyp	Mono-/ Polyklonal	Klon	Hersteller	
GST (Schistosoma japonicum)	Maus	IgG <sub>1</sub>	monoklonal	3D4	sc-57753	Santa Cruz
UBXD1 (human)	Maus	IgG <sub>1</sub>	monoklonal	2F8- 24	ab81555	abcam
p97/VCP (792-806, human)	Maus	IgG <sub>2b</sub>	monoclonal	5	sc-57492	Santa Cruz
Poly-ubiquitinyliert- Proteine	Maus	IgG <sub>1</sub>	monoklonal	FK2	04-263	Merck
Ufd1 (human)	Maus	IgM	monoklonal	5e2	sc-81630	Santa Cruz
Npl4 (1-300, human)	Maus	IgG <sub>1</sub>	monoklonal	D1	sc- 365796	Santa Cruz

Als Sekundärantikörper wurde der Anti-Maus-HRP (*horse radish peroxidase*) Antikörper (Kat. NA931, GE Healthcare) verwendet.

### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien und Kits

Im Folgenden sind die wichtigsten Verbrauchsmaterialien und die verwendeten Kits aufgelistet (Tab. 4.3).

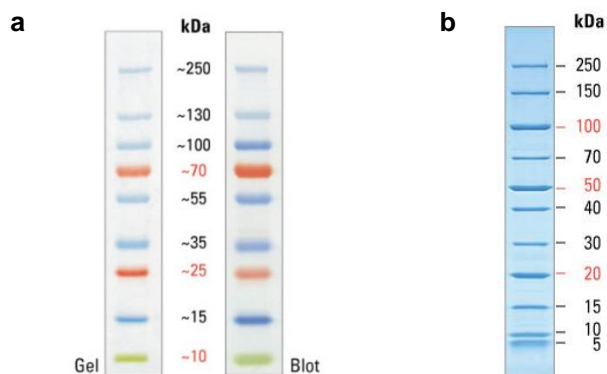
**Tab. 4.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien und Kits.**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
CD-Quarzküvetten Suprasil 110-QS	Hellma-Analytics
Fluoreszenzküvette (Ultramikro 45 µL)	Hellma-Analytics
Handschuhe	Diagonal
NMR-Röhrchen	Schott Economics
Shigemi Röhrchen (NMR)	Shigemi, Inc.
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt
PD10 Säulen	GE Healthcare
Petrischalen 10 cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zellkulturflasche T75 (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Low binding Eppis	Eppendorf
Filtertip Spitzen 1-1000 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen, 10 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen, 1000 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen, 200 µL	Sarstedt
Pipettenspitzen, 5 mL	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße 2,0 mL	Greiner bio-one
Sterilfilter, 0,22 µm	Millipore

Zentrifugalkonzentrator, Vivaspin Turbo 10.000 MWCO	Sartorius Stedim	
Zentrifugalkonzentrator, Vivaspin Turbo 3.000 MWCO	Sartorius Stedim	
Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Sarstedt	
Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Sarstedt	
Zentrifugiergefäße, 1 L	Beckmann Coulter	
Zentrifugiergefäße, 80 mL (Ultrazentrifuge)	Beckmann Coulter	
<b>Kit</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Hersteller</b>
Nucleo Spin Plamid Kit	Reinigung von Plasmid-DNA	Machery & Nagel

#### 4.1.4 Proteinmarker

Als Proteinmarker für die SDS-Gele wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 26616, Abb. 4.1, A) und Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, 26630, Abb. 4.1, B) verwendet.



**Abb. 4.1** Verwendeter Proteinmarker.

**a:** PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, **b:** Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder.

#### 4.1.5 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben der angesetzten Lösungen auf 1 L dd. H<sub>2</sub>O, Abweichungen sind in Tab. 4.4 aufgeführt.

**Tab. 4.4 Verwendete Puffer.**

10x PBS-Stock	80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7,4
5x M9-Salz-Stock	64 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5 g NaCl	
Biotin-Thiamin-Lösung	10 mg Biotin 10 mg Thiamin	1 mL, zum Lösen des Biotins Na <sub>2</sub> HPO <sub>4(s)</sub> hinzugeben
Coomassie-Entfärber	50 mL Eisessig 75 mL EtOH 875 mL A. bidest.	
Coomassie-Färbelösung	1,25 g Brilliant Blue R250 227 mL EtOH 227 mL A. bidest. 46 mL Eisessig	
NaKPi-Puffer	50 mM NaKPi (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	pH 6,5
PMSF-Lösung	100 mM PMSF	
RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 30 mM Kaliumacetat 15 % Glycerin	pH 5,8 mit HOAc
RF2-Lösung	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin	pH 6,8 mit NaOH
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 0,1 % SDS 250 mM Glycin	
SDS-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris-HCl 50 % Glycerin 10 % SDS 14 mM β-ME 0,01 % Bromphenolblau	pH 6,8
Spurenelemente-Stock	2 g Na <sub>2</sub> EDTA 1,67 g FeCl <sub>3</sub> • 6 H <sub>2</sub> O 500 mg CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O 18 mg ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 16 mg CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O 12 mg MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O 18 mg CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	In 100 mL dd. H <sub>2</sub> O
Spurenelemente-Stock I nach Amy	1,5 g CaCl <sub>2</sub> • H <sub>2</sub> O 3,0 g Na <sub>2</sub> EDTA 2,5 g Fe(III)Cl <sub>3</sub>	In 100 mL dd. H <sub>2</sub> O

Spurenelemente-Stock II nach Amy	1,83 g CuCl <sub>2</sub> • H <sub>2</sub> O 1,8 MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O 0,27 g ZnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O 0,27 g CoCl <sub>2</sub>	In 100 mL dd. H <sub>2</sub> O
TB-Puffer (10x)	23,1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,17 M) 125,4 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,72 M)	
Trenngelpuffer	1,5 mM Tris-HCl	pH 8,8
Vitamin-Stock	2 mg Biotin 2 mg Folsäure 5 mg Thiamin 5 mg Pantothersäure 0,1 mg Vitamin B12 5 mg Nicotinamid 5 mg Riboflavin	In 100 mL dd. H <sub>2</sub> O
Tank Blot Puffer (10x)	30,27 g Tris 144 g Glycin 4 mL SDS (10 %)	Verdünnung (1x) in 20 % Methanol
Ponceau S Lösung	0,1 g Ponceau S 5 mL Eisessig	In 100 mL dd. H <sub>2</sub> O
DPBS (PanReac Biotech)		500 mL
Halt Protease Inhibitor (100x)	Thermo Scientific (1860932)	100 µL

#### 4.1.6 Antibiotika und Nährmedien

Zur Selektion der plasmidtragenden Bakterienzellen und für die humane Zellkultur wurden folgende Antibiotika verwendet (Tab. 4.5):

**Tab. 4.5 Verwendete Antibiotika.**

Antibiotikum	Stock-Konzentration	Abkürzung	Hersteller (Art.Nr.)
Ampicillin	100 mg/mL in dd. H <sub>2</sub> O	Amp	Carl Roth GmbH (K029.2)
Chloramphenicol	30 mg/mL in 80 % EtOH	CM	Carl Roth GmbH (3886.1)
Kanamycin	50 mg/mL in dd. H <sub>2</sub> O	Kan	Carl Roth GmbH (T832.4)
Penicillin-Streptomycin	10.000 U/mL Penicillin 10 mg/mL Streptomycin	PenStrep	PAN Biotech (P06-07100)

Alle Angaben für die Nährmedien beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf 1 L. Alle Nährmedien wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert, Abweichungen sind in Tab. 4.6 angegeben. Das angegebene Nährmedium der Zellkultur, DMEM wurden nicht autoklaviert.

**Tab. 4.6 Verwendete Nährmedien.**

LB-Medium	10 g Tryptone 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
LB-Platten	500 mL LB-Medium 7,5 g Agar → autoklavieren 500 µL Kan/Amp-Stock 125 µL CM-stock für Rosetta2-Zellen
M9 Minimal Medium	6,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 g NaCl 1 L dd.H <sub>2</sub> O → autoklavieren 1,5 mL Spurenelemente-Stock 1 mL Vitamin-Stock 100 µL 1 M CaCl <sub>2</sub> 2 mL 1 M MgSO <sub>4</sub> 3 g D-Glukose ( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) 0,7 g <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl für Proteinmarkierung mit Photo-Leucin und - Methionin 20 mg Photo-Leucine 20 mg Photo-Methionin
M9 Minimal Medium nach Lewis Kay	6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 g NaCl → autoklavieren 3 g D-Glukose 1 g <sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl 1 mL 1 M MgSO <sub>4</sub> 100 µL 1 M CaCl <sub>2</sub> 1 mL Biotin-Thiamin-Lösung 1 mL Spurenelemente-Stock I nach Amy 100 µL Spurenelemente-Stock II nach Amy
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose
TB-Medium	12 g Trypton 24 g Hefeextrakt 4 mL Glycerin In 900 mL dd. H <sub>2</sub> O → autoklavieren 100 mL TB-Puffer (10x)
DMEM	500 mL DMEM (Panreac Biotech, P04-04510) 10 % FBS Supreme 1 % PenStrep

### 4.1.7 Plasmide

Für die Arbeiten zur Proteininteraktionen wurde unterschiedliche Konstrukte mittels Restriktionsklonierung und Site-directed Mutagenese (kurz: SDM) kloniert. Die verwendeten Plasmide sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Einige der vorliegenden Plasmide wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Meyer (Universität Duisburg Essen, ZMB, Deutschland; Tab. 4.7, Ursprung: Meyer Gruppe) bereitgestellt.

**Tab. 4.7 Verwendete Plasmide zur Proteinexpression. (MB = Mike Blüggel, MK = Matthias Kracht, JvdB = Johannes van den Boom, n.b. = Angaben nicht bekannt)**

BC-Nummer	Protein	Aminosäure	Vektor	Schnittstellen	Affinitäts-tag	Protease Erkennungsmotiv	Klonierungsverfahren / Ursprung
530	HRV3C (PreSc)	161-342	pGEX	n.b.	GST	n.b.	Bayer Gruppe
1133	p97	1-806	pET15b	NdeI/BamHI	His6	Thrombin	Meyer Gruppe
1141	UBXD1-PUB	150-264	pET28a	NdeI/HindIII	His6	Thrombin	Restriktion, MB
1249	p97-ND1L	1-480	pET15b	NdeI/BamHI	His6	PreSc	Meyer Gruppe
1280	p97-ΔC	1-765	pET15b	NdeI/BamHI	His6	Thrombin	SDM auf 1133, MB
1281	UBXD1	1-441	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST	PreSc	Meyer Gruppe
1299	UBXD1-298PreSc	1-449	pET28a	n.b.	His8 Cterm	-	Meyer Gruppe, MK
1306	UBXD1-RL62/63AA	1-441	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST	PreSc	SDM auf 1281, MB
1309	UBXD1-DI11/12AA,RL62/63AA	1-441	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST	PreSc	SDM auf 1306, MB
1328	Ubiquitin	1-75	pET23a	n.b.	GST	-	Meyer Gruppe
1329	Ubiquitin	1-75	pET23a	n.b.	-	-	Meyer Gruppe
1330	UBXD1-ΔUBX-C	1-332	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST	PreSc	SDM auf 1281, MB
1332	UBXD1-ΔUBX-C-RL62/63AA	1-332	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST	PreSc	SDM auf 1330, MB
1333	UBXD1-ΔUBX-C-DI11/12AA,RL62/63AA	1-332	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST	PreSc	SDM auf 1332, MB
1340	UBXD1-Linker	236-337	pET41b	Apal/HindIII	GST	PreSc	Restriktion, MB
1353	UBXD1-Linker	263-330	pET41b	Apal/HindIII	GST	PreSc	SDM auf 1340, MB
1364	UBXD1	1-441	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST, StrepTagII	PreSc	SDM auf 1281, MB
1367	UBXD1-269PreSc	1-449	pET28a	n.b.	His8 Cterm	-	Meyer Gruppe, JvdB
1369	UBXD1-ΔUBX-C	1-332	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST, StrepTagII	PreSc	SDM auf 1281, MB
1386	Ubiquitin-M1C	1-78	pET23a	n.b.	-	-	SDM auf 1329, MB
1387	mUbe1	1-924	pET28a	n.b.	His6	Thrombin	Meyer Gruppe
1388	Ubc7	1-165	pGEX6P1	n.b.	GST	Thrombin	Meyer Gruppe
1409	SUMO1	1-101	pGEX2T	n.b.	GST	PreSc	Meyer Gruppe
1410	Ubiquitin-I44A	1-75	pET23a	n.b.	-	-	Meyer Gruppe
1412	Ubiquitin-F4BpA	1-75	pET23a	n.b.	-	-	SDM auf 1329, MB
1417	UBXD1-Linker-UBX-C	269-441	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST (N) His8 (C)	PreSc	BioCat GmbH
1422	StrepTagII	1-8	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1423	UBXD1	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1437	Ubiquitin	1-75	pET23a	NdeI/HindIII	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1445	UBXD1-R275A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1446	UBXD1-F277A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1447	UBXD1-Q278A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1448	UBXD1-L282A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1449	UBXD1-Q285A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1450	UBXD1-F286A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1451	UBXD1-E287A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1452	UBXD1-L288A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1453	UBXD1-P289A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1454	UBXD1-D291A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1455	UBXD1-F293A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1456	UBXD1-L338A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1457	UBXD1-R340A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH
1458	UBXD1-R342A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	BioCat GmbH

1459	UBXD1-P344A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1460	UBXD1-D345A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1461	UBXD1-L348A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1462	UBXD1-Q350A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1463	UBXD1-T352A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1470	p97-N	1-199	pET28a	NcoI/BamHI	His8	TEV	Biocat GmbH
1478	UBXD1-Linker-UBX-C	269-441	pGEX6P1	BamHI/EcoRI	GST	PreSc	Biocat GmbH
1479	UBXD1-ΔC	1-411	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1480	UBXD1-ΔUBX-C	1-332	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1481	UBXD1-ΔLinker-UBX-C	1-264	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1483	UBXD1-R272A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1484	UBXD1-R274A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1485	UBXD1-K301A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1486	UBXD1-R305A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1487	UBXD1-R307A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1488	UBXD1-S315A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1489	UBXD1-V316A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1490	UBXD1-L317A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1491	UBXD1-K320A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1492	UBXD1-K325A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1493	UBXD1-Y363A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1494	UBXD1-R367A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1495	UBXD1-E368A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1496	UBXD1-D373A	1-441	pcDNA3.1(+)	BamHI/EcoRI	StrepTagII	-	Biocat GmbH
1499	hHR23a-UBL	1-78	pGEX6P1	BamHI/XhoI	GST	PreSc	Biocat GmbH
1500	hHR23b-UBL	1-78	pGEX6P1	BamHI/XhoI	GST	PreSc	Biocat GmbH
1509	UBXD1-PUB-V226A	150-264	pET28a	NdeI/HindIII	His6	Thrombin	Biocat GmbH
1510	UBXD1-PUB-L228Q	150-264	pET28a	NdeI/HindIII	His6	Thrombin	Biocat GmbH
1511	UBXD1-PUB-E237K	150-264	pET28a	NdeI/HindIII	His6	Thrombin	Biocat GmbH
1512	UBXD1-PUB-L242Q	150-264	pET28a	NdeI/HindIII	His6	Thrombin	Biocat GmbH
1540	hHR23b-UBL-F69BpA	1-78	pGEX6P1	BamHI/XhoI	GST	PreSc	Biocat GmbH
1541	hHR23b-UBL-K51S/K76S	1-78	pGEX6P1	BamHI/XhoI	GST	PreSc	Biocat GmbH
1542	hHR23b-UBL-K51S/K78S	1-78	pGEX6P1	BamHI/XhoI	GST	PreSc	Biocat GmbH
1543	hHR23b-UBL-UBA1	1-228	pGEX6P1	BamHI/XhoI	GST	PreSc	Biocat GmbH
1544	hHR23b-UBA1	188-228	pGEX6P1	BamHI/XhoI	GST	PreSc	Biocat GmbH
1545	hHR23b-UBA2	364-404	pGEX6P1	BamHI/XhoI	GST	PreSc	Biocat GmbH

#### 4.1.8 Geräte und Software

Im Folgenden sind alle verwendeten Geräte aufgelistet (Tab. 4.8) sowie die dazugehörige Software.

**Tab. 4.8 Verwendete Geräte und Software.**

<b>Gerät/Software</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	BD53	Binder
Cleanbench	HERA safe	Thermo Scientific
UV Crosslinker	Cat. 1778	Carl Roth
MultiPep RSi Spotter		Intavis Bioanalytical instruments
CD-Spektrometer	J-710	JASCO
Fluoreszenzspektrometer	FP-8300	JASCO
FP-LC	ÄKTA prime-plus	GE Healthcare Life Science
SDS-Gel-Schüttler	Duomax 1030	Heidolph
Großraumzentrifuge	Avanti JE, JLA 9.100	Beckmann
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph
Micro-ITC	MicroCal iTC200	Malvern Instruments
Mikrowelle		Sharp
NMR-Spektrometer	Bruker Ultrashield 700 MHz	Bruker BioSpin
Scanner	Scanjet 8200	HP
SDS-Gelapparatur	XCell Mini Protean 3	BioRad
Tank blot		BioRad
Spannungsgeber	PowerPac basic	BioRad
Thermoschüttler	Thermoschüttler HAT	Infors
Tisch-Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tisch-Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonopuls	Bandelin
Ultrazentrifuge	Ultrazentrifuge, 45Ti	Beckmann
Ultrazentrifugen-Gefäße	Optima Max-XP, SS-34	Beckmann
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf



---

<b>Software</b>	
CARA	Auswertung der NMR-Spektren <sup>92</sup>
DiChroWeb	Auswertung CD-Spektroskopie <sup>93-95</sup> <a href="http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml">http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml</a> (Stand 01.09.2022)
GraphPadPrism	Darstellung der Bindungskurven, Chromatogramme
HADDOCK	<i>docking</i> -Rechnung von Proteinkomplexen <sup>96,97</sup> <a href="https://www.bonvinlab.org/software/haddock2.2/">https://www.bonvinlab.org/software/haddock2.2/</a> (Stand 01.09.2022)
MicroCal ITC Origin Analysis	Auswertung der ITC-Daten
PrimeEvaluation	Auswertung und Exportieren der Chromatogramme
PrimeView	Live-Ansicht der FPLC Anlage
ProtParam	Kalkulation von Proteineigenschaften <a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a> (Stand 01.09.2022)
Pymol	Darstellung von Strukturen
Topspin 3.5	Bedienung NMR-Spektrometer, Prozessierung NMR-Spektren

---

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Site-directed Mutagenesis

Zur Erstellung verschiedener Mutationen der verwendeten Proteine für Bindungsstudien wurde die Site-directed Mutagenese (kurz: SDM) verwendet. UBXD1 (aa 1-332; VIMx Mutante: aa 1-441 DI11/12/AA, RL62/63AA; 269PreSc and 298PreSc Protease Erkennungssequenz), Ubiquitin (M1C, F4BPA) und p97 (aa 1-766, aa 1-480) Mutanten wurde mittels QuikChange und den in Tab. 4.11 aufgeführten Primern produziert. Für die PCR-Reaktion der Mutante wurden 20 ng DNA, 2 mM dNTPs, 2 µM je Primer mit 5 Units Pfu-Plus DNA Polymerase nach Herstellerangaben für die Polymerase von Roboklon durchgeführt. Anschließend wurde der Elternstrang durch die Zugabe von 1 µL DpnI Restriktionsenzym bei 37 °C für 1 h verdaut. Nach dem DNA-Verdau wurden 4 µL der PCR-Reaktion mittels Hitzeschock in NEB5α-Zellen transformiert, auf einer LB-Agarplatte ausplattiert, die DNA einzelner Klone isoliert und die jeweiligen Klone mittels DNA-Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) auf die entsprechende Mutation analysiert.

**Tab. 4.9 PCR-Programm für QuikChange Mutagenese**

Temperatur (T [°C])	Zeit (t [sec.])
95 °C	60 sec
95 °C	30 sec
T <sub>m</sub> [55-60°C]	30-60 sec
68 °C	60 sec / kbp x 18
68 °C	420 sec
12 °C	Pause

### 4.2.2 Restriktionsklonierung

Zur Klonierung isolierter Domänen wurde mit Restriktionsenzymen gearbeitet. Dabei wurde der entsprechende Vektor (1,5 µg pET41b-PreSc) mit 1 µL ApaI und 1 µL HindIII in einem Reaktionsansatz von 20 µL für 5 Minuten bei 37 °C verdaut. Der geschnittene Vektor wurde anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel geladen und das Gel für 30 Minuten bei 100 V laufen gelassen. Die entsprechende Bande des linearisierten Vektors wurde aus dem Gel mit NucleoSpin PCR clean up Kit von Macherey und Nagel aufgereinigt.

Für die PCR vom Linker wurde als Ausgangsplasmid UBXD1-wt (interne BC Nummer 1281) verwendet. Für die PCR wurden 20 ng Plasmid, 10 µM je Primer, 4 µL 10 mM dNTPs, sowie 5 U an Pfu Plus Polymerase (Roboklon, Berlin, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 50 µL angesetzt. Das PCR-Protokoll ist Tab. 4.10 zu entnehmen. Die PCR Reaktion wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert und die entsprechende Bande des PCR-Produktes aus dem Agarosegel mittels Kit aufgereinigt. Für den Verdau des PCR-Produktes wurden 150 ng Produkt mit 1 µL ApaI und 1 µL HindIII in einem Gesamtvolumen von 30 µL für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Hitzeinaktivierung (80 °C, 10 Minuten) wurde das PCR clean

up wiederholt. Für die Ligation wurde das Verhältnis Vektor:PCR-Produkt von 1:3, 1:5 und 1:10 eingesetzt mit je 2,5 U an T4 Ligase (metabion, Steinkirchen, Deutschland) für 1 Stunde bei 16 °C inkubiert. Für die Transformation wurden je Ansatz 5 µL in chemisch kompetente NEB5α-Zellen transformiert und anschließend auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

**Tab. 4.10 PCR-Programm für UBXD1 *UBX extension* (263-337).**

Temperatur (T [°C])	Zeit (t [sec.])	
95 °C	180 sec	
95 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	x 25
72 °C	420 sec	
12 °C	Pause	

**Tab. 4.11 Nukleotidsequenz der zur Restriktionsklonierung und Mutagenese eingesetzten Oligonukleotide. Tm bezieht sich auf die Schmelztemperatur zum Ausgangsvektor.**

Konstrukt	Oligonukleotide (Sequenz 5' zu 3')	Tm °C
UBXD1	TAGGGCCCGCGGAGCCCGTGCG	61 °C
(aa 263-337)	TACAAGCTTTTATCACGTGTAGTTGTACTTGCGCAG	59 °C
UBXD1	GAGCAGCGGGGTGATAACGCAAGTACAAC	56 °C
(aa 263-330)	GTTGTACTTGCGTTATCACCCCGCTGCTC	56 °C
UBXD1	GGGGCTGCGCTGATAATACTACACGCTG	58 °C
(aa 1-332)	CAGCGTGTAGTTGTATTATCAGCGCAGCCCC	58 °C
UBXD1	GGAGTTCAAGGCCGAGCTAAGTTCAAGAGCGCGG	60 °C
(DI11/12AA)	CCGCGCTCTTGAAGTTAGCTGCGGCCCTTGAAGTCC	61 °C
UBXD1	CTGCTGCCCTAGCCGAGCTGAGCAGAAGCAGTCC	59 °C
(RL62/63AA)	GGACTGCTTCTGCTCAGCTGCGGCTAGGGCAGCAG	59 °C
UBXD1	CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGCCCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAGATG	62 °C
(StrepTagII)	AAGAAATTCTTTCAGGAG	
	CTCCTGAAAGAATTTCTTCATCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGGGCCCC	60 °C
	TGGAACAGAACTTCCAG	
UBXD1-	TTTCAGGGACCCCTGGACAGGCAGCGCCGC	65 °C
269PreSc Site	GAGGACTTCAAGCTTGCGCGCACGGGCTC	71 °C
UBXD1-	CTCACAGCAGAGCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGCCCTGGGATCCGAGATC	49 °C
298PreSc Site	AAGCGG	
	CCGCTTGATCTCGGATCCCAGGGGCCCTGGAACAGAACTTCCAGCTCTGCT	49 °C
	GTGAG	
p97-ΔC	CAGCAGAGTCGGTGATAATTTGGCAGCTTCAGATTCC	59 °C
(aa 1-766)	GGAATCTGAAGCTGCCAAATTATCACCGACTCTGCTG	58 °C
Ubiquitin	GGAGCTAGCCATATGTGCCAGATCTTCGTGAAG	56 °C
(M1C)	CTTACGAAGATCTGGCACATATGGCTAGCTCC	57 °C
Ubiquitin	GCCATATGCAGATCTAGGTGAAGACCCTGACC	58 °C
(F4BpA)	GGTCAGGGTCTTACCTAGATCTGCATATGGC	59 °C

### 4.3 Mikrobiologische Methoden

#### 4.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Transformation der Plasmid DNA wurden NEB5 $\alpha$ -Zellen verwendet (Tab. 4.12). Zur Proteinexpression wurden BL21 (DE3) T1r- oder Rosetta2-Zellen verwendet. Rosetta2-Zellen sind BL21-Derivate, welche ein zusätzliches chloramphenicolresistentes Plasmid tragen, um die sieben *E. coli*-inkompatiblen Codons (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC und CGG) zu exprimieren. Zur Expression mit 4-4-Benzyl-L-phenylalanine wurden BL21 (DE3) Zellen verwendet, die zusätzlich das Plasmid pEVOL-pBpF von addgene (Kat. 31190) enthalten verwendet.

**Tab. 4.12 Verwendete Bakterienstämme zur DNA- und Proteinexpression.**

Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21 (DE3) Rosetta 2-Zellen	F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm pRARE2 (CmR)	Sigma Aldrich - eigene Vervielfältigung
NEB5 $\alpha$ -Zellen	huA2 $\Delta$ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 $\phi$ 80 $\Delta$ (lacZ) M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17	New England BioLabs - eigene Vervielfältigung
BL21 (DE3) T1r- Zellen	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm $\lambda$ (DE3) tonA	Sigma Aldrich - eigene Vervielfältigung

#### Chemisch kompetente NEB5 $\alpha$ - und Rosetta2-Zellen

Für die Herstellung der chemisch kompetenten Rosetta2-Zellen wurde eine Übernacht-Kultur (LB-Medium) mit Chloramphenicol (30  $\mu$ g/mL) angesetzt. Am folgenden Tag wurden 5 mL der Übernacht-Kultur in 50 mL Hauptkultur (Chloramphenicol 30  $\mu$ g/mL) überimpft und bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen lassen. Für die Herstellung der chemisch kompetenten NEB5 $\alpha$ -Zellen wird kein Antibiotikum verwendet. Anschließend wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min bei 4000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 17 mL kalter RF1-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (4000 g, 4 °C, 15 min), das erhaltene Zellpellet in 4 mL RF2-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die inkubierte Zellsuspension wird in 50  $\mu$ L aliquotiert und nach dem Schockgefrieren in flüssigen Stickstoff bei -80 °C gelagert. Die BL21 (DE3) T1r-Zellen wurden von Alma Rute hergestellt und die BL21 (DE3) pEVOL-pBpF-Zellen wurden von Dr. Johannes van den Boom (AG Prof. Meyer, Universität Duisburg-Essen) bereitgestellt.

### **4.3.2 Transformation kompetenter Zellen**

#### **NEB5 $\alpha$ -, BL21(DE3)T1r- und Rosetta2-Zellen**

Mittels Hitzeschock wurde die Plasmid-DNA in die chemisch kompetenten Zellen transformiert. Hierzu wurde zu einem Aliquot 50 ng DNA oder 4  $\mu$ L SDM-Ansatz gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend fand ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec statt. Nach dem erfolgten Hitzeschock wurden die Zellen erneut für 2 min auf Eis inkubiert, in 250  $\mu$ L SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 450 rpm inkubiert. Danach wurden die transformierten Zellen auf eine LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Zur Selektion der plasmidtragenden Bakterienzellen wurden die in Tab. 4.5 aufgelisteten Antibiotika verwendet (Tab. 4.5).

### **4.3.3 Zellkultur**

Zur Überexpression von rekombianten Proteinen in humanen HEK293 Zellen wurden die HEK293 Zellen (Sequenziert 2019 durch Microsynth Seqlab, Schweiz) in DMEM Medium mit 10 % fetalem Rinderserum und 1 % Penicillin / Streptomycin in 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Zelllinie wurden Mycoplasmentests durchgeführt. Bei einer Zelldichte von 50-60 % wurden die entsprechenden Plasmide mit einem Transfektionsansatz transfiziert. Dazu wurden für eine 10 cm Zellkulturschale 200  $\mu$ L PBS, 4  $\mu$ L 293Free Transfektionsreagenz und 2  $\mu$ g Plasmid-DNA in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde anschließend tropfenweise ins Medium gegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Nach erfolgter Überexpression wurden die Zellen mit Lysispuffer (1x PBS (pH 7,4), 0,05% IGEPAL, Halt Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail) für 60 Minuten auf Eis ausgeschlossen und das Zelllysat mittels Zentrifugation (13.200 rpm, 1 h, 4 °C) von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt.

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 Proteinexpression und -reinigung

Zur Proteinexpression der verschiedenen Proteine wurde TB Medium für unmarkierte Proteine und M9 Minimal Medium zur  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ -Isotopenmarkierung verwendet. Waren die Expressionsbedingungen nicht bekannt wurde zur Bestimmung der optimalen Expressionsbedingungen für jedes Proteinkonstrukt ein Expressionstest durchgeführt. Je nachdem ob das Protein Isotopenmarkiert vorliegen sollte, wurde zusätzlich zu LB- und TB- auch die Expressionsbedingungen in Minimal M9-Medium bestimmt.

Die transformierten *E. coli* Zellen wurden für eine Vorkultur im entsprechenden Medium für 20 h bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Die Bedingungen der Expression sind in Tab. 4.13 aufgeführt. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm (kurz:  $\text{OD}_{600}$ ) von  $1,0 \pm 0,2$  wurden die Expression unter Zugabe von IPTG gestartet. Für die Proteinmarkierung mit 4-4-Benzyl-L-phenylalanine (kurz: BpA) wurden zur Induktion zusätzlich 0,2 % L-Arabinose und 269 mg 4-4-Benzyl-L-phenylalanine (gelöst in 1 mL 1 M NaOH) hinzugegeben.

**Tab. 4.13 Bedingungen der Proteinexpression aller verwendeten Proteinkonstrukte.**

(s) = solid, Feststoff, (l) = liquid, gelöster Stoff.

Protein	Medium	Zellen	c (IPTG)	T [°C]	t [h]
Zusätze / Liter					
UBXD1 und Mutanten	TB	Rosetta2	1 mM	18 °C	20 h
UBXD1-PUB	M9	Rosetta2	100 $\mu\text{M}$	37 °C	4 h
UBXD1-UBX extension	M9	Rosetta2	250 $\mu\text{M}$	37 °C	3 h
UBXD1-eUBX	M9	Rosetta2	500 $\mu\text{M}$		
p97 und Mutanten	TB	BL21(DE3)T1r	500 $\mu\text{M}$	18 °C	20 h
p97-pLeu/pMet	M9	BL21(DE3)T1r	500 $\mu\text{M}$	18 °C	20 h
	+ 20 mg Photo-Leu <sub>(s)</sub>				
	+ 20 mg Photo-Met <sub>(s)</sub>				
p97-N	M9	Rosetta2	500 $\mu\text{M}$	30 °C	20 h
p97-ND1IL	M9 Lewis Kay	BL21(DE3)T1r	500 $\mu\text{M}$		
Ubiquitin	TB, M9	Rosetta2	400 $\mu\text{M}$	18 °C	20 h
Ubiquitin-F4BPA	TB	Rosetta2	400 $\mu\text{M}$ IPTG	18 °C	20 h
	+ 269 mg BpA <sub>(l)</sub>		0,2 % L-Arabinose		
Ubiquitin-GST	TB	Rosetta2	1 mM	18 °C	20 h
SUMO1	TB	Rosetta2	500 $\mu\text{M}$	18 °C	20 h
mUbe1	TB	Rosetta2	1 mM	18 °C	20 h
Ubc7	TB	Rosetta2	1 mM	18 °C	20 h
hHR23-UBL und Mutanten	M9	Rosetta2	500 $\mu\text{M}$	30 °C	20 h
hHR23b-UBL-F69BpA	TB	Rosetta2	500 $\mu\text{M}$ IPTG	30 °C	20 h
	+ 269 mg BpA <sub>(l)</sub>		0,2 % L-Arabinose		
hHR23b-UBA1, -UBA2	TB / M9	Rosetta2	500 $\mu\text{M}$	30 °C	20 h
hHR23b-UBL-UBA1	TB / M9	Rosetta2	500 $\mu\text{M}$	30 °C	20 h
Ufd1:Npl4 (Proteine bereitgestellt von AG Prof. Meyer, Universität Duisburg-Essen. Gereinigt nach <sup>98</sup> )					

Nach erfolgter Expression wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet von 1 L in 25 mL 1x PBS (pH 7,4) gelöst. Zur Proteinreinigung wurden die Zellen mit 1 mM PMSF und Lysozym für 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend mittels Ultraschall (6x 30 sec, 60 % Intensität) aufgeschlossen. Um das Zelllysate vom Zellpellet zu trennen, wurden die aufgeschlossenen Zellen für 1 h bei 30.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Um noch weitere Schwebeteilchen vom Lysat zu trennen, wurde der Überstand durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert. Je nach Affinitätstag der Fusionsproteine wurden unterschiedliche Proteinreinigungen durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurden die Proteine standardmäßig in 1x PBS Puffer gereinigt, abweichend wurden die Proteine für den ATPase Aktivitätsassay in 20 mM Tris mit 150 mM NaCl anstelle von 1x PBS als Puffergrundlage gereinigt.

**Tab. 4.14 Protokoll der Methoden zur Proteinaufreinigungen unterschiedlicher Fusionsproteine.**

GSH = Glutathionsepharose-Affinitätschromatographie, IMAC = Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie, AC = Anionenaustauschchromatographie, KC = Kationenaustauschchromatographie.

Protein	Fusionstag	Affinitätsreinigung	Proteaseverdau	Gelfiltration [X ja / - nein]	Besonderheit
UBXD1 und Mutanten	GST	GSH	PreSc	X	-
UBXD1-PUB	His6	IMAC	Thrombin	X	-
UBXD1-UBX extension	GST	GSH	PreSc	X	-
UBXD1-eUBX	GST	GSH / IMAC	PreSc	-	-
p97 und Mutanten	His6	IMAC, AC	PreSc	X	-
p97-pLeu/pMet	His6	IMAC, AC	PreSc	X	-
p97-N	His8	IMAC	TEV	X	-
p97-ND1L	His6	IMAC	PreSc	X	-
Ubiquitin	-	KC	-	X	Perchlorsäurefällung
Ubiquitin-F4BPA	-	KC	-	X	Perchlorsäurefällung
Ubiquitin-GST	GST	GSH	-	X	-
SUMO1	GST	GSH	PreSc	X	-
mUbe1				X	-
Ubc7				X	-
hHR23-UBL und Mutanten	GST	GSH	PreSc	X	-
hHR23b-UBL-F69BpA	GST	GSH	PreSc	X	-
Ufd1:Npl4 (Proteine bereitgestellt von AG Prof. Meyer, Universität Duisburg-Essen. Gereinigt nach <sup>98</sup> )					

### Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie

Die Reinigung der His<sub>6</sub>-Fusionsproteine erfolgte über eine IMAC an einer FPLC-Anlage (ÄKTA prime-plus, GE Healthcare Life Science, Freiburg). Nach Aufschluss der Zellen und Filtration der löslichen Proteine wurde eine Ni-NTA-Säule (HisTrap™ HP, 5 mL, GE Healthcare Life Science, Freiburg) mit dem Lysat beladen. Die Reinigung erfolgte nach dem in Tab. 4.15 aufgeführten Programm. Zusätzlich wurde während der gesamten Reinigung die Extinktion bei 280 nm für die aromatischen Aminosäuren gemessen.

**Tab. 4.15 Reinigungsprogramm für IMAC.**

Schritt	Puffer	Volumen [mL]	Gradient [%]	Funktion
Säule äquilibrieren	15 mM Imidazol, 1x PBS (pH 7,4)	25	0	
Probenauftrag		X	0	Auto zero
Waschen	15 mM Imidazol, 1x PBS (pH 7,4)	100	0	
Elution	15 mM Imidazol, 1x PBS (pH 7,4) 500 mM Imidazol, 1x PBS (pH 7,4)	20	0-8	8 mL Fraktion
		40	8	8 mL Fraktion
		80	8-20	5 mL Fraktion
		50	20	5 mL Fraktion
		100	20-60	5 mL Fraktion
		25	60	5 mL Fraktion
		50	60-100	5 mL Fraktion
		25	100	5 mL Fraktion
Flussrate: 1,0 mL/min				
Drucklimit: 0,4 MPa				

Nach abgeschlossener IMAC wurden die Peaks mittels SDS-Page analysiert und die Fraktionen einkonzentriert (Vivaspin, MWCO der entsprechenden Größe, Sartorius), welche das entsprechende Fusionsprotein und die minimale Menge an Abbauprodukten enthielten. Für die folgende Gelfiltration wurde das Volumen auf 2 mL reduziert. Nach abgeschlossener Reinigung jeder Proteinvariante / Mutante wurde die Ni-NTA-Säule mittels 6 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung und 100 mM EDTA gereinigt und mit 100 mM NiSO<sub>4</sub>-Lösung neu beladen, um eventuelle Rückstände zu entfernen.



### Glutathion-S-Transferase Affinitätschromatographie

Das filtrierte Zelllysate mit GST-Fusionsprotein wurde auf eine GSH-Säule geladen. Die Reinigung erfolgte mit 1x PBS Puffer und der Waschschrift mit Hochsalzdient dazu unspezifische Bindungen an das Säulenmaterial zu lösen. Für die Elution wurde ein linearer Gradient von 0 % bis 100 % über ein Volumen von 100 mL gefahren.

**Tab. 4.16 Reinigungsprogramm für GSH Reinigung.**

Schritt	Puffer	Volumen [mL]	Funktion
Säule äquilibrieren	1x PBS (pH 7,4)	100	-
Probenauftrag		X	-
Waschen	1x PBS (pH 7,4)	100	-
Hochsalz	500 mM NaCl, 1x PBS (pH 7,4)	100	-
Waschen	1x PBS (pH 7,4)	100	-
Elution	20 mM Glutathion, 1x PBS (pH 7,4)	100	5 mL Fraktion

Flussrate: 1,0 mL/min

Drucklimit: 0,4 MPa

Nach abgeschlossener IMAC wurden die Fraktionen mittels SDS-Page analysiert und diejenigen Fraktionen einkonzentriert (Vivaspin, MWCO der entsprechenden Größe, Sartorius), welche das entsprechende Fusionsprotein und die minimale Menge an Abbauprodukten enthielten. Durch die Zugabe von 3 µL PreSc pro mg Fusionsprotein wurde das GST-tag vom rekombinanten Protein entfernt. Zur Trennung des GST-tags vom rekombinanten Protein wurde anschließend eine Gelfiltration durchgeführt.

### Anionenaustauschchromatographie

Nach abgeschlossener IMAC-Reinigung wurden die Fraktionen mittels SDS-Gel analysiert und die entsprechenden Fraktionen gesammelt und mit 50 mM Tris (pH 7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub> auf 20 mM KCl verdünnt. Um weitere Verunreinigungen von dem gewünschten Protein zu trennen, wurde eine Anionenaustauschchromatografie mit dem verdünnten Proteingemisch durchgeführt. Dazu wurde eine Anionenaustauschersäule (DEAE FF, HiTrap™ 5 mL, GE Healthcare) mit dem in Tab. 4.17 aufgeführten Programm verwendet. Nach der Anionenaustauschchromatografie wurden die Fraktionen erneut mittels SDS-Gel analysiert und die Fraktionen mit dem gewünschten Protein einkonzentriert (Vivaspin, 10.000 MWCO, Sartorius), in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -25 °C gelagert.

**Tab. 4.17 Reinigungsprogramm für die Anionenaustauschchromatografie.**

Schritt	Puffer	Volumen [mL]	Gradient [%]	Funktion
Säule äquilibrieren	50 mM Tris (pH 7,4), 5 mM MgCl <sub>2</sub>	25	0	
Probenauftrag		X	0	Auto Zero
Waschen	50 mM Tris (pH 7,4), 5 mM MgCl <sub>2</sub>	25	0	2 mL/Fraktion
Elution	50 mM Tris (pH 7,4), 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 M KCl	100	0-100	2 mL/Fraktion

Flussrate: 1,0 mL/min

Drucklimit: 0,4 MPa

### Kationenaustauschchromatographie

Nach der erfolgten Ultrazentrifugation der aufgeschlossenen *E. coli* Zellen mit ungetagten Ubiquitin wurde mit dem klaren Überstand eine Perchlorsäurefällung durchgeführt. Dafür wird zum Überstand langsam bei 4 °C unter Rühren 2,5 mL 15 %iger Perchlorsäure hinzugegeben und das Gemisch für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgt eine weitere Ultrazentrifugation, um die gefällten Proteine vom Ubiquitin zu trennen. Der klare Überstand wurde anschließend auf ein Volumen von 5 mL mittels Zentrifugalkonzentratoren reduziert und für die Kationenaustauschchromatographie 1:100 auf 500 mL mit 25 mM Ammoniumacetat (pH 4,5) verdünnt. Die Reinigung erfolgte nach dem in Tab. 4.18 aufgeführten Programm und einer starken Kationenaustauschersäule (HiTrap SP HP, 5 mL, GE Healthcare).

**Tab. 4.18 Reinigungsprogramm für die Kationenaustauschchromatographie.**

Schritt	Puffer	Volumen [mL]	Gradient [%]	Funktion
Säule äquilibrieren	25 mM NH <sub>4</sub> Ac (pH 4,5)	25	0	
Probenauftrag		X	0	Auto Zero
Waschen	25 mM NH <sub>4</sub> Ac (pH 4,5)	50	0	
Elution	25 mM NH <sub>4</sub> Ac (pH 7,6), 200 mM NaCl	100	0-100	2 mL/Fraktion
Flussrate: 1,0 mL/min				
Drucklimit: 0,4 MPa				

Für die anschließende Gelfiltration wurden die Fraktionen, welche das Ubiquitin enthielten einkonzentriert und eine Gelfiltration durchgeführt.

### Gelfiltration / Größenausschlusschromatographie

Als letzter Reinigungsschritt der Proteinaufreinigung wurde eine Gelfiltration / Größenausschlusschromatographie durchgeführt, welche Proteine nach ihrem Molekulargewicht trennt. Je nach Molekulargewicht und Menge des rekombinanten Proteins wurden die Säulen Superdex 75 pg 16/60, 26/60 oder 200 pg 16/60 und 26/60 verwendet. Als Puffer wurde der Basispuffer für die entsprechenden Experimente verwendet, wie 1x PBS (pH 7,4) oder 20 mM Tris (pH 7,4) mit mindestens 200 mM KCl.

#### 4.4.2 Polyubiquitin-Synthese

Zur Synthese von K48-verknüpften Ubiquitinketten wurde das von Dong *et al.* publizierte Protokoll modifiziert<sup>99</sup>. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde mit Atto594-Maleimid markiertes M1C-Ubiquitin verwendet. Für die Kettenreaktion wurden 12 mg Atto594-M1C-Ubiquitin (finale Konzentration 10  $\mu$ M) mit 5  $\mu$ M E1 Enzym mUbe1 in 50 mM HEPES (pH 8,0), 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM ATP, 1 mM DTT für 15 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Nach der Zugabe von 120 mg unmarkiertem Ubiquitin (finale Konzentration 1 mM) und 50  $\mu$ M E2 Enzym Ubc7 wurde die Reaktion für 20 h bei 37 °C inkubiert. Zur Aufreinigung der Produkte wurde das Reaktionsgemisch 1:20 in 25 mM Ammoniumacetat (pH 4,5) verdünnt und mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Die Säule (SP HP 5 mL, GE Healthcare) wurde dazu mit 25 mM  $NH_4Ac$  (pH 4,5) äquilibriert und die Elution erfolgte mit 200 mM NaCl, 25 mM  $NH_4Ac$  (pH 7,6) über einen 100 mL Gradienten von 0-100 %. Die Ubiquitinketten wurden in einem 3 kDa Centricon einkonzentriert und anschließend mittels Größenausschlusschromatographie (HiLoad 26/60 Superdex 75 pg, GE Healthcare) in 1x PBS Puffer (pH 7,4) nach ihrer Größe hin aufgetrennt. Analysiert wurden die Produkte mittels SDS-Gel und die Fluoreszenzmarkierung mittels Fluoreszenzscanner Typhoon kontrolliert.

#### 4.4.3 Fluoreszenzmarkierung mittels Atto594-NHS Ester

Für die Messung der Fluoreszenzanisotropie der Bindungen zwischen zwei Proteinen, wurde einer der Bindungspartner kovalent am N-Terminus und ggf. Lysinen mit dem Fluorophor Atto594 markiert. Dazu werden 2 mg gereinigtes Protein in einem 1 mL Ansatz mit einem 1,1x fachen Überschuss der eingesetzten Stoffmenge an Atto594-NHS-Ester in 1x PBS (pH 7,4) angesetzt. Die Reaktion findet in einem lichtundurchlässigen braunen 1,5 mL Reaktionsgefäß bei 24 °C und 400 rpm für 1 h statt. Gestoppt wird die Reaktion mit 100 mM Tris (pH 7,4), um den nicht reagierten Atto594-NHS-Ester abzufangen. Anschließend wird der Reaktionsansatz mittels PD10-Säulen (Sephadex G-25 M, PD-10, GE Healthcare, Buckinghamshire) unter Ausschluss von Licht gereinigt und in Fraktionen von je 500 µL gesammelt.

Zur Fluoreszenzmarkierung von Ub-M1C wurden 5 mg gereinigtes Protein mit 2,5 mM Atto594-Maleimid und 2,5 mM TCEP bei 25 °C, 400 rpm für 1 h inkubiert und der Reaktionsansatz anschließend mittels Gelfiltration (Superdex 75 pg 10/300 GL) in 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> gereinigt.

Anschließend wurden 20 µL der Fraktionen mit jeweils 20 µL SDS-Probenpuffer (2x) versetzt, bei 95 °C erhitzt und ein SDS-Gel mit den Proben beladen. Das fertige SDS-Gel wurde anschließend am BioDoc-Analyzer mit UV-Licht angeregt, um das fluoreszenzmarkierte Protein zu identifizieren. Zur Kontrolle wurde das SDS-Gel noch mit Comassie gefärbt. Die Fraktionen, welche das fluoreszenzmarkierte Protein enthalten, werden im 3 kDa Centricon einkonzentriert (1,5 mL). Anschließend wurde die Proteinkonzentration und der *Degree of labeling*-(DOL) mittels Absorbtionsmessung bei 601 nm und 280 nm nach Gleichung 1 bestimmt.

$$\text{DOL} = \frac{A_{601 \text{ nm}} \times \epsilon_{\text{Protein}}}{(A_{280 \text{ nm}} - A_{601 \text{ nm}} \times \text{CF}_{280 \text{ nm}}) \times \epsilon_{\text{ATTO594}}} \quad \text{Gleichung (1)}$$

$A_{601 \text{ nm}}$  = Absorbtion bei 601 nm

$A_{280 \text{ nm}}$  = Absorbtion bei 280 nm

$\epsilon_{\text{Protein}}$  = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient der gelabelten Proteins

$\epsilon_{\text{ATTO594}}$  = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von ATTO594

$\text{CF}_{280 \text{ nm}}$  = Korrekturfaktor für ATTO594 bei 280 nm

## 4.5 Analytische Methoden

### 4.5.1 Alanin-Screening

Zur Differenzierung, welche Aminosäure der UBX-Domäne an der Bindung zu Ubiquitin beteiligt ist, wurden oberflächenexponierte Aminosäuren im Bereich zwischen 272 bis 373 zu einem Alanin mutiert und in einem Pulldown-Experiment mit dem Ubiquitin-GST Fusionsprotein untersucht. Für die Untersuchung der Bindung wurden folgende Mutanten in einen pcDNA3.1(+)-Vektor mit einem N-terminalen StrepTagII-Affinitätstag kloniert: R272A, R274A, R275A, F277A, Q278A, L282A, Q285A, F286A, E287A, L288A, P289A, D291A, F293A, K301A, R305A, R307A, S315A, V316A, L317A, K320A, K325A, L338A, R340A, R342A, P344A, D345A, L348A, Q350A, T352A, Y363A, R367A, E368A und D373A (siehe Tab. 4.7). Die Plasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert (siehe 4.3.3) und die Zellen nach 24 h in 500  $\mu$ L Lysispuffer (PBS, 0,05 % IGEPAL, Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail) aus der Zellkulturschale mittels Zellschaber gelöst und für 60 min in einem 1,5 mL Low-binding Reaktionsgefäß auf Eis inkubiert. Der klare Zellüberstand wurde anschließend durch Zentrifugation (13.200 rpm, 1 h, 4 °C) von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt und die Proteinkonzentration mittels Bradford Microassay Protokoll in Dreifachbestimmung ermittelt. Als Input für den Pulldown wurden 2 mg Gesamtproteinmenge auf 600  $\mu$ L Gesamtvolumen verwendet.

Je Alaninmutante wurden 100  $\mu$ L Glutathion High Capacity Magnetic Agarose Beads wurden mit 400  $\mu$ L PBS (pH 7,4) gewaschen und für 20 h bei 4 °C mit 3 mg Ubiquitin-GST Fusionsprotein in einem Volumen von 400  $\mu$ L mit PBS (pH 7,4) inkubiert, um die Beads vollständig zu sättigen. Anschließend wurden die Beads drei Mal mit je 200  $\mu$ L PBS gewaschen. Zur Untersuchung der Interaktion wurden 2 mg Gesamtproteinmenge des Zelllysats verwendet und für 4 h bei 4 °C mit den gesättigten Beads inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Beads 3x mit je 200  $\mu$ L PBS gewaschen. Die Elution erfolgte anschließend mit 30  $\mu$ L 2x SDS-Probenpuffer durch Erhitzen der Probe für 5 Minuten bei 95 °C. Zum Nachweis der interagierenden Alaninmutanten wurde wie beschrieben ein Westernblot mit Anti-UBXD1 Antikörper durchgeführt. Dafür wurden 20  $\mu$ g Gesamtprotein der jeweiligen Alaninmutante und 15  $\mu$ L der Elution auf ein 5-20 % BioRad TGX Gel geladen.

#### 4.5.2 Analytische Gelfiltration

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen wurde eine analytische Größenausschlusschromatographie durchgeführt und die Masse des Proteins über einen definierten Standard berechnet. Der BioRad-Proteinstandard (siehe Tab. 4.20) wurde nach Anweisung vorbereitet und 250  $\mu$ L für die 10/30 und 1 mL für die 16/60 Säule injiziert. Für die Kalibriergerade wurden die Retentionszeiten gegen den dekadischen Logarithmus ( $\log_{10}$ ) des Molekulargewichtes aufgetragen und die Auswertung der gemessenen Proben erfolgte durch die lineare Regression der Kalibrierung. Dazu wurden die Größen-ausschlusschromatogramme mit einer Superdex 75 pg 10/300 GL für UBXD1-298PreSc und

-269PreSc oder einer Superdex 75 pg 16/60 für die gecrosslinkten UBXD1-PUB:hHR23b-UBL Proben an einer BioRad FPLC verwendet. Die verwendeten Puffer, Flussraten und Säulen sind Tab. 4.19 zu entnehmen. Für alle Läufe wurden Fraktionen von einem Volumen von 500  $\mu$ L (Superdex 75 pg 10/300) bzw. 1 mL (Superdex 75 pg 16/60) gesammelt.

**Tab. 4.19 Messbedingungen der analytischen Gelfiltration.**

Probe	Säule	Puffer	Flussrate
UBXD1-298PreSc	Superdex 75 pg 10/300 GL	50 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 % Glycerin, 1 mM DTT	0,5 mL/min
UBXD1-269PreSc	Superdex 75 pg 10/300 GL	50 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 % Glycerin, 1 mM DTT	0,5 mL/min
PUB:UBL CX	Superdex 75 pg 16/60	1x PBS (pH 7,4)	1 mL/min

**Tab. 4.20 Proteingrößenstandard (BioRad).**

Protein	Molekulargewicht [kDa]
Thyroglobulin	670
$\gamma$ -Globulin	158
Ovalbumin	44
Myoglobin	17
Vitamin B12	1,35

### 4.5.3 ATPase-Aktivitätsassay

Um den Einfluss von UBXD1 auf die ATPase-Aktivität der AAA-ATPase p97 zu untersuchen, wurde der Umsatz an Phosphat in [nmol Phosphat / min / µg p97] mittels ATPase-Aktivitätsassay gemessen. Dafür wurde der von Song *et al.* für p97 optimierte ATPase-Assay verwendet<sup>57</sup>. Für den Reaktionsansatz wurden 0,5 µM p97 in einem Volumen von 0,2 mL in Assay-Puffer (50 mM Tris pH 8,0, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA) verdünnt und für 15 Minuten bei 37 °C und 600 rpm mit 3 mM ATP inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,8 mL Stopplösung (0,5 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Ammoniummolybdat, 2 % [v/v] H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Der Nachweis des durch die ATP-Hydrolyse entstandenen Phosphates erfolgt mittels Colorimetrie durch einen gebildeten Phosphat-Molybdat-Komplex. Der bläuliche Farbkomplex entsteht durch die Zugabe von 10 µL frisch angesetzter 10 % [w/v] Ascorbinsäurelösung und wird nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 750 nm und 25 °C gemessen. Die umgesetzte Menge an Phosphat wurde mit Hilfe einer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Kalibrierung berechnet.

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik wurden 0,5 µM p97 ± 2 µM UBXD1 mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM ATP) umgesetzt. Für die ATPase-Aktivität der unterschiedlichen Komplexkombinationen wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: p97:UBXD1-wt Komplex (0,5 µM p97 + 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 5 µM UBXD1), p97:UBXD1-VIMx Komplex (0,5 µM p97 + 2 µM UBXD1-VIMx Mutante) und der Entfaltungskomplex mit Ufd1/Npl4 (0,5 µM p97 ± 2 µM UBXD1 ± 0,1 µM Ufd1/Npl4). Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und  $v_{max}$  sowie zur Berechnung des Lineweaver-Burk-Plots wurden die Daten mit GraphPad Prism ausgewertet. Als Positivkontrollen wurden die chemischen Inhibitoren von p97 CB5083 und NMS853 mit einer Konzentration von 1 µM in Fünffachbestimmung gemessen<sup>100</sup>.

Die Michaelis-Menten Konstante wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$v = \frac{v_{max} \times c(ATP)}{K_m + c(ATP)} \quad \text{Gleichung (2)}$$

v	Umsatzgeschwindigkeit [nmol Pi min <sup>-1</sup> µg <sup>-1</sup> ]
c(ATP)	ATP-Stoffmengenkonzentration / Substratkonzentration [mM]
$v_{max}$	Maximale Umsatzgeschwindigkeit [nmol Pi min <sup>-1</sup> µg <sup>-1</sup> ]
$K_m$	Michaelis-Menten Konstante [mM]

Der Lineweaver-Burk-Plot wurde aus den linearisierten Daten erstellt. Die Parameter aus der Michaelis-Menten-Kinetik wurden verwendet, um die Inhibitionkonstante von UBXD1 zu berechnen:

$$K_i = \frac{v_{\max}^{\text{app}}}{v_{\max}} \times (1 + c) \quad \text{Gleichung (3)}^6$$

$K_i$	Inhibitionkonstante [ $\mu\text{M}$ ]
$v_{\max}^{\text{app}}$	$v_{\max}$ von p97 mit UBXD1 [ $\text{nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ]
$v_{\max}$	$v_{\max}$ von p97 ohne Inhibitor [ $\text{nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ]
$c(\text{UBXD1})$	Stoffmengenkonzentration von UBXD1 [ $\mu\text{M}$ ]



#### 4.5.4 Chemisches und Photoreaktives Crosslinking mit rekombinanten Proteinen

Für das kovalente Verknüpfen von Proteinkomplexen wurde der chemische Crosslinker Disuccinimidylsulfoxid (DSSO,  $c = 50 \text{ mM}$  in DMSO) verwendet, sowie für das photoreaktive Crosslinking die UV-reaktiven Aminosäuren photo-Leucin (pL), photo-Methionin (pM) und p-Benzoyl-L-phenylalanin (BpA). Für die Reaktionen mit DSSO wurden die Proben (siehe Tab. 4.21) in PBS-Puffer (pH 7,4) angesetzt und bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  im Thermoblock für 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von  $20 \text{ mM}$  Tris (pH 7,4) gestoppt. Für die lichtreaktiven Aminosäuren wurden die Proteinkomplexe (siehe Tab. 4.21) zuvor auf Eis inkubiert und unter UV-Licht für 30 Minuten auf Eis mittels CL-1000 Ultraviolet Crosslinker mit einer  $365 \text{ nm}$  Lampe ( $5 \times 8 \text{ Watt}$ ) bestrahlt. Technische Replika wurden unter einem ACE-Projekt zusammengefasst, während biologische Replika aus verschiedenen Proteinreinigungen als separate ACE-projekte klassifiziert wurden. Für alle Proben wurden Low-binding Reaktionsgefäße, sowie sterile, DNase/RNase freie Pipettenspitzen und für die MS verwendbares DMSO zum Lösen des DSSO Crosslinkers verwendet. Die Probenvorbereitung, sowie die LC/MS/MS Analyse der Proben wurde durchgeführt von Svenja Heimann und Dr. Farnusch Kaschani der *Analytical Core Facility* der Universität Duisburg-Essen.

Tab. 4.21 Verwendete Crosslinking Proben.

ACE Projekt	Probe	Proteinkonzentrationen $c$ [ $\mu\text{M}$ ]	V [ $\mu\text{L}$ ]
<b>UBXD1 + DSSO</b>			
353	MB04	$10 \mu\text{M}$ UBXD1 + $1 \text{ mM}$ DSSO	$500 \mu\text{L}$
371	MB10	$10 \mu\text{M}$ UBXD1 + $250 \mu\text{M}$ DSSO	$500 \mu\text{L}$
372	MB18	$10 \mu\text{M}$ UBXD1 + $250 \mu\text{M}$ DSSO	$500 \mu\text{L}$
425	MB13 - MB15	$10 \mu\text{M}$ UBXD1 + $250 \mu\text{M}$ DSSO	$100 \mu\text{L}$
<b>UBXD1-298PreSc + DSSO</b>			
422	MB01 - MB03	$10 \mu\text{M}$ UBXD1-Fragmente + $250 \mu\text{M}$ DSSO	$133 \mu\text{L}$
<b>UBXD1 + Ubiquitin + DSSO</b>			
372	MB16	$10 \mu\text{M}$ UBXD1 + $20 \mu\text{M}$ Ubiquitin + $250 \mu\text{M}$ DSSO	$500 \mu\text{L}$
425	MB07 - MB09	$10 \mu\text{M}$ UBXD1 + $25 \mu\text{M}$ Ubiquitin + $875 \mu\text{M}$ DSSO	$100 \mu\text{L}$
<b>UBXD1 + Ubiquitin-F4BpA</b>			
556	MB01 - MB04	$10 \mu\text{M}$ StrepTagII-UBXD1 + $50 / 125 / 250 \mu\text{M} / 2,5 \text{ mM}$ Ubiquitin-F4BpA	Beads
<b>UBXD1 + p97 + DSSO</b>			
425	MB01, MB02	$10 \mu\text{M}$ UBXD1 + $25 \mu\text{M}$ p97 + $875 \mu\text{M}$ DSSO	$100 \mu\text{L}$
<b>UBXD1 + p97-pL/pM</b>			
393	MB01	$10 \mu\text{M}$ p97-pL/pM + $25 \mu\text{M}$ UBXD1	$200 \mu\text{L}$
<b>UBXD1 + hHR23b-UBL + DSSO</b>			
630	MB01-MB03	$50 \mu\text{M}$ UBXD1 + $500 \mu\text{M}$ UBL + $1,1 \text{ mM}$ DSSO	$50 \mu\text{L}$
	MB06-MB09	$50 \mu\text{M}$ UBXD1 + $500 \mu\text{M}$ UBL + $1,1 \text{ mM}$ DSSO Fraktionen der Gelfiltration	$330 \mu\text{L}$
<b>UBXD1 + HHR23b-UBL-F69BpA</b>			
631	MB01-MB04	$50 \mu\text{M}$ UBXD1 + $0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 \text{ mM}$ UBL	$20 \mu\text{L}$
	MB05	$200 \mu\text{M}$ UBXD1 + $1 \text{ mM}$ UBL	$20 \mu\text{L}$

#### 4.5.5 Circular dichroismus-Spektroskopie

Durch die Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie lassen sich Aussagen über die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturmerkmale  $\beta$ -Faltblätter,  $\alpha$ -Helices und unstrukturierte Anteile treffen. Zur Kontrolle der Faltung der gereinigten Proteine und deren Mutanten für Interaktionsstudien wurden CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 190-260 nm in einer Quarzglasküvette von 1 mm Dicke aufgenommen und die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente mittels DiChroWeb berechnet<sup>93-95</sup>. Die Messungen wurden mit einem JASCO J-710 CD-Spektrometer (JASCO, Groß-Umstadt) bei 25 °C durchgeführt und als Referenz wurde eine Messung mit salzfreiem Puffer (50 mM NaKPi, pH 6,5-7,4) erstellt, die von den Probenmessungen subtrahiert wurde. Für die Messung wurden 5 Einzelspektren gemittelt. Zur Auswertung wurden die Daten von mdeg in MRE (*Mean Residual Molar Ellipticity*) umgerechnet (Gleichung 4).

**Tab. 4.22 Parameter zur Aufnahme der CD-Spektren.**

<b>Messeinstellungen</b>	
Wellenlängenbereich	190 – 260 nm
Proteinkonzentration	10 $\mu$ M
Akkumulation	5x
Aufnahmezeitraum	1 Sek. / Datenpunkt
Bandbreite	2,0 nm
Schichtdicke	1 mm
Basislinienkorrektur	50 mM NaKPi-Puffer (pH 6,5-7,4)

$$\text{MRE} = \frac{\text{mdeg}}{10 \times (c[\text{mol/L}] \times n(\text{Aa}) \times d[\text{cm}])} \quad \text{Gleichung (4)}$$

- mdeg      Drehung des Lichtes [mdeg]
- c            Stoffmengenkonzentration des Proteins [mol/L]
- n            Anzahl der Aminosäuren
- d            Schichtdicke der Küvette [cm]

#### 4.5.6 Fluoreszenzanisotropie

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten unterschiedlicher Protein-Komplexen, wurden Proteine mit dem Fluorophor Atto594 markiert oder bereits fluoreszenzmarkiertes Rhodamin-Ubiquitin oder 5,6-FAM markierte Peptide verwendet. Die Messungen wurden im jeweilig angegebenen Puffer an einem Fluoreszenz-Spektrometer (JASCO FP-8300, Groß-Umstadt) durchgeführt. Soweit es mit notwendigen Material möglich war, wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt sowie Kontrollen des jeweiligen Proteins mit Atto594-GST, um unspezifische Bindungen an das Fluorophor zu untersuchen.

**Tab. 4.23 Paramter zur Messung der Fluoreszenzanisotropie der Fluorophore 5,6-FAM, Atto594 und Rhodamin. (\* = G-Faktor einzelner Messung als Beispiel).**

<b>Messeinstellungen</b>			
Fluorophor	5,6-FAM	Atto594	Rhodamin
Anregungs-Wellenlänge ( $\lambda_{ex}$ )	495 nm	605 nm	570 nm
Emissions-Wellenlänge ( $\lambda_{em}$ )	518 nm	620 nm	585 nm
Ex-Bandbreite	5 nm	5 nm	5 nm
Em-Bandbreite	5 nm	5 nm	5 nm
Sensitivität	550 V	550 V	650 V
Akkumulation	5x	5x	5x
Aufnahmezeitraum	5 Sek / Datenpunkt	5 Sek / Datenpunkt	5 Sek / Datenpunkt
Temperatur	25 °C ± 0,1 °C	25 °C ± 0,1 °C	25 °C ± 0,1 °C
Vorlage	100 nM	100 nM	100 nM
G-Faktor	1,0627*	2,6178*	2,3983*

Die Proben wurden mit vertikal polarisiertem Licht angeregt und die Emissionsintensitäten von horizontal ( $I_H$ ) und vertikal ( $I_V$ ) polarisiertem Licht getrennt aufgezeichnet. Mit diesen Werten wurde die Anisotropie ( $r$ ) berechnet (Gleichung 5).

$$r = \frac{I_V - G \times I_H}{I_V + 2G \times I_H} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Die Auswertung der Datenpunkte erfolgte mit GraphPadPrism (Gleichung 8). Dazu wurden die Datenpunkte von Messungen, welche zum Vergleich gemeinsam dargestellt werden sollen, normiert (Gleichung 6) und in die gemessenen Punkte eine Kurve des Modells „one site specific binding (w. offset)“ gelegt (Gleichung 8). Anhand der gefitteten Kurve wurde die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) und deren Streuung (Gleichung 7) berechnet. Die Berechnung der Streuung des Mittelwertes ( $s_{rel}$ ) der relativen Anisotropie erfolgte nach Gleichung 9.

$$r_{\text{rel.}} = \frac{r - r_0}{r_{\text{max}} - r_0} \quad \text{Gleichung (6)}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (r - \bar{r})^2}{n - 1}} \quad \text{Gleichung (7)}$$

$$r = r_0 + (r_{\text{max}} - r_0) \frac{\left( ([P] + [A] + K_D) - \sqrt{([P] + [A] + K_D)^2 - (4 \times [A] \times [P])} \right)}{(2 \times [A])} \quad \text{Gleichung (8)}$$

$$s_{\text{rel.}} = \left| \frac{s}{\bar{r}} \cdot \bar{r}_{\text{rel.}} \right| \quad \text{Gleichung (9)}$$

$r_{\text{rel.}}$	Relative Anisotropie
$r$	Datenpunkt Anisotropie
$r_0$	Anisotropie des freien Analyten
$r_{\text{max}}$	Maximale Anisotropie
$s$	Streuung
$\bar{r}$	Mittelwert der Anisotropie
$n$	Anzahl der Messpunkte
$A$	Analyt (Fluoreszenzmarkierter Bindungspartner)
$P$	Protein
$[AP]$	Gleichgewichtskonzentration vom Komplex AP
$[A]$	Stoffmengenkonzentration des vorliegenden Analyten [ $\mu\text{mol/L}$ ]
$[P]$	Gesamtstoffmengenkonzentration des Proteins
$s_{\text{rel.}}$	Relativer Fehler
$\bar{r}_{\text{rel.}}$	Mittelwert der relativen Anisotropie

**Tab. 4.24 Parameter für die Nicht-lineare Regression "one specific binding (w. offset)".**

Parameter	
Anisotropie des freien Analyten ( $r_0$ )	keine Begrenzung
Amplitude der Anisotropie ( $r = r_{\text{max}} - r_0$ )	$> 0,0$
Proteinkonzentration ( $P$ )	$= 0,1$
Dissoziationskonstante ( $K_D$ )	$> 0,0$

#### 4.5.7 Immunopräzipitation

Für die Ufd1-Immunopräzipitation des ternären Komplexes aus Ufd1, Npl4, UBXD1 und p97 wurden 50 µL Protein L-Agarose Beads drei Mal mit 500 µL IP-Puffer (50 mM HEPES (pH 8,0), 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % Triton X-100) gewaschen und anschließend mit 2 µM Anti-Ufd1-Antikörper inkubiert. Die Proteinkomplexe (5 µM Ufd1, 5 µM Npl4, 5 µM p97 und 2,5, 5 oder 10 µM UBXD1) wurden in 200 µL Gesamtvolumen für 20 h bei 4 °C mit den Beads in IP-Bindungspuffer (50 mM HEPES, 150 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 0,25 % Lysozym, 1 mM DTT, pH 8,0) inkubiert. Anschließend wurden die Beads drei Mal mit 400 µL IP-Puffer gewaschen und für 1 Minute bei 1.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Zur Elution wurden die Beads mit 50 µL 2x SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot (siehe 4.5.13). Die Verdünnungen der Antikörper Anti-UBXD1, Anti-p97, Anti-Ufd1 und Anti-Npl4 sind Tab. 4.26 zu entnehmen.

#### 4.5.8 Isothermale Titrationskalorimetrie

Zusätzlich zur Fluoreszenzanisotropie wurde die Interaktion zwischen UBXD1 und Ubiquitin mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (MicroCal iTC 200, Malvern Instruments, Worcestershire) untersucht. Durch die Gibbs'sche Enthalpie ( $\Delta G$ ) und Entropie ( $\Delta S$ ) lassen sich die Bindungsaffinität ( $K_A$ ), die freie Enthalpie ( $\Delta H$ ) sowie die Bindungsstöchiometrie ( $n$ ) bestimmen (siehe Gleichung 10). Durch den ermittelten  $K_A$ -Wert lässt sich die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) bestimmen (siehe Gleichung 11).

$$\Delta G = -RT \times \ln(K_A) = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Gleichung (10)}$$

$$K_D = \frac{1}{K_A} \quad \text{Gleichung (11)}$$

Für die Dreifachbestimmung wurde 40  $\mu\text{M}$  UBXD1-wt (1x PBS, pH 7,4) vorgelegt und 1 mM Ubiquitin oder 0,97 mM Ubiquitin-I44A in 1x 0,4  $\mu\text{L}$  und 17x 2  $\mu\text{L}$  Schritten injiziert. Zur Kontrolle wurden noch Messungen ohne den jeweiligen Bindungspartner und eine Puffer/Ubiquitin-Messung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit MicroCal ITC Origin Analysis. Die Streuung für den Mittelwert wurde ebenfalls nach Gleichung 7 berechnet. Um die Fehler für die aus  $K_A$  berechneten  $K_D$ -Werte zu ermitteln wurde Gleichung 12 verwendet.

$$s_{K_D} = K_D \times \frac{s_{K_A}}{K_A} \quad \text{Gleichung (12)}$$

$K_A$	Assoziationskonstante
$K_D$	Dissoziationskonstante
$s_{K_A}$	Streuung der Assoziationskonstante
$s_{K_D}$	Streuung der Dissoziationskonstante

**Tab. 4.1 Messeinstellungen MicroITC200.**

Messeinstellungen	
Temperatur	25 °C
Vorlage UBXD1	0,04 mM
Zugabe Ubiquitin	1 mM
Zugabe Ubiquitin-I44A	0,97 mM
Puffer	1x PBS, pH 7,4
Spacing time	0,4 $\mu\text{L}$ – 150 sec 2 $\mu\text{L}$ – 180 sec
Filter	3 sec

#### 4.5.9 Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR)

Für die Probenvorbereitung wurden 180 µL des isopenmarkierten  $^{15}\text{N}$ -Proteins im entsprechenden Puffer mit 20 µL  $\text{D}_2\text{O}$  als internem Feldfrequenz-Lock (90 %  $\text{H}_2\text{O}$  + 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ ) und 0,5 µL DSS als internem Standard versetzt und in ein 3 mm NMR-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte an einem Bruker Ultrashield 700 MHz NMR-Spektrometer (Bruker BioSpin, Fällanden) bei einer Protonenfrequenz von 700,22 MHz und 25 °C. Das Spektrometer ist mit einem inversen Tripleresonanz-Cryo-Probenkopf sowie mit einer Temperatur-Kontrolleinheit ausgestattet. Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*)-Spektren wurden mit der Software Topspin 3.5-3.7 aufgenommen und prozessiert. Die Fourier-Transformation erfolgte mit dem Befehl *xfb* (F1- und F2-Dimension) und die Basislinien- und Wasserkorrektur wurde automatisiert über die Befehle *abs2.water*, *abs1* durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software CARA.

#### $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration

Für die Titrationsexperimente wurden die  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteine in 50 mM NaKPi Puffer /  $\text{D}_2\text{O}$  (90 % / 10 %, v/v) vorgelegt. Eingesetzt wurden die in Tab. 4.25 aufgeführten Stammlösungen der Liganden. Diese wurden schrittweise zum vorgelegten Protein hinzugeben und jeweils ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum aufgenommen. Findet eine Bindung zwischen den Proteinen / supramolekularen Liganden statt, kommt es zu einer Verschiebung der Signale oder einem Verlust der Signalintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Bindungspartners. Die relative Signalintensität wurde nach Gleichung 13, sowie die chemische Gesamtverschiebung nach Gleichung 14 berechnet:

$$\left(\frac{I}{I_0}\right) = \frac{I}{I_0} \times \left(\frac{V}{V_0}\right) \quad \text{Gleichung (13)}$$

$$\Delta\delta_{\text{gesamt}} = \sqrt{(\Delta\delta_{\text{N}} \times 0,154)^2 + (\Delta\delta_{\text{H}})^2} \quad \text{Gleichung (14)}$$

I	Signalintensität nach Zugabe
$I_0$	Signalintensität ohne Zugabe
V	Probenvolumen nach Zugabe
$V_0$	Probenvolumen ohne Zugabe
$\Delta\delta_{\text{gesamt}}$	Berechnete Gesamtverschiebung
$\Delta\delta_{\text{N}}$	Verschiebung der Stickstoffachse
$\Delta\delta_{\text{H}}$	Verschiebung der Wasserstoffachse

Die einzelnen Titrationspläne sind in Tab. 4.25 aufgelistet:

**Tab. 4.25 Titrationspläne  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC**

<b>Vorlage (c [<math>\mu\text{M}</math>])</b>	<b>Zugabe (c [<math>\mu\text{M}</math>])</b>	<b>c (Zugabe) [<math>\mu\text{M}</math>]</b>
$^{15}\text{N}$ -Ubiquitin (100 $\mu\text{M}$ )	UBXD1 (167 $\mu\text{M}$ )	0, 2,5, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -Ubiquitin (50 $\mu\text{M}$ )	UBXD1-Linker (330 $\mu\text{M}$ )	0, 5, 10, 20, 35, 50, 75, 100, 150, 190 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -UBXD1-Linker (495 $\mu\text{M}$ )	Ubiquitin (4,36 mM)	0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{M}$ , 1, 1,9 mM
$^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL (400 $\mu\text{M}$ )	CLR01 (7 mM)	0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL (200 $\mu\text{M}$ )	ABS209 (1 mM)	0, 50, 100, 150, 200, 250, 400 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL (200 $\mu\text{M}$ )	PUB (695 $\mu\text{M}$ )	0, 50, 100, 200, 250, 300, 400 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -UBXD1-PUB (400 $\mu\text{M}$ )	+UBL (14 mM) +CLR01 (7 mM)	UBL: 750 $\mu\text{M}$ ; CLR01: 75, 150, 250 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -UBXD1-PUB (400 $\mu\text{M}$ )	+UBL (14 mM) +ABS209 (1 mM)	UBL: 750 $\mu\text{M}$ ; ABS209: 75, 150, 250 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -UBXD1-PUB (400 $\mu\text{M}$ )	hHR23a-UBL (4,3 mM)	0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -UBXD1-PUB (400 $\mu\text{M}$ )	hHR23b-UBL (4 mM)	0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1300 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -UBXD1-PUB (400 $\mu\text{M}$ )	CLR01 (7 mM)	0, 50, 100, 200, 300, 400, 600 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -UBXD1-PUB (400 $\mu\text{M}$ )	ABS209 (1,25 mM)	0, 50, 100, 150, 200, 250, 400 $\mu\text{M}$
$^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL (400 $\mu\text{M}$ )	hHR23b-UBA1 (3,44 mM)	0, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800 $\mu\text{M}$ , 1, 1,5, 2 mM
$^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL (400 $\mu\text{M}$ )	hHR23b-UBA2 (3,50 mM)	0, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800 $\mu\text{M}$ , 1, 1,5 mM



#### 4.5.10 Peptid-Array

Zur Erstellung einer Peptidbibliothek der UBXD1 Aminosäuresequenz (1-441) wurden 12er Peptide mit einem Versatz von 2 Aminosäuren mittels automatisierter Spot-Synthese durch einen MultiPep RSi Spotter (Intavis Bioanalytical instruments) erstellt. Dazu wurden die Peptide auf Whatman 50 Cellulose Membranen mittels Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-Chemie synthetisiert. Die getrockneten Membranen wurden zum Aktivieren für 10 Minuten in 99,8 % analytisches Methanol getaucht und anschließend vorsichtig drei Mal mit TBS (pH 7,4) gewaschen, sodass die Membran mit Flüssigkeit bedeckt ist. Zum Blocken wurden die Membranen für 1 h bei 25 °C mit Blockingpuffer (5 % BSA [w/v], TBS, pH 7,4) inkubiert. Für 20 h wurde die Membran anschließend mit 10 µg/mL Atto594-Ubiquitin, als Kontrolle mit nicht-reaktivem Atto594-Tris oder nur 5 % BSA in Blockingpuffer inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit TBS (pH 7,4) bei 25 °C gewaschen und für 1 h bei 37 °C getrocknet. Das gebundene fluoreszierende Protein wurde anschließend mittels Fluoreszenzscan am Fluoreszenzscanner Typhoon detektiert. Insgesamt wurden drei UBXD1-wt Membranen mit Atto594-Ubiquitin und je eine Membran zur Kontrolle mit Atto594-Tris oder 5 % BSA inkubiert.

#### 4.5.11 Proteolytischer Nachweis einer intramolekularen Domäneninteraktion

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen der PUB- und UBX-Domäne von UBXD1 wurden zwischen beiden Domänen mittels SDM eine Erkennungssequenz für die PreScission-Protease (Aminosäuresequenz: LEVLFQGP) zwischen den Aminosäure-positionen 269/270 und 298/299 eingefügt (siehe Kapitel 4.2.1). Die Proteine UBXD1-269PreSc-His<sub>8</sub> und UBXD1-298PreSc-His<sub>8</sub> wurden in *E. coli* exprimiert, mittels IMAC gereinigt und mit PreScission-Protease (3 µL von 20 mg/mL PreSc / mg Fusionsprotein) in 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % Glycerin und 1 mM DTT bei 4 °C für 20 h geschnitten. Der Reaktionsansatz wurde anschließend durch eine analytischen Gelfiltration (Superdex 75 pg, 10/300, GE Healthcare) in 50 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % Glycerin und 1 mM DTT nach der Größe hin aufgetrennt. Zur Einordnung der Proteingröße wurde die Gelfiltrationssäule mit einem Gelfiltrationsstandard der Firma BioRad kalibriert (siehe 4.5.2). Zur Visualisierung der Größenauftrennung wurden die Fraktionen mittels SDS-Gel analysiert und die entsprechenden Fraktionen, welche beide UBXD1-Fragmente enthielten, konzentriert und das DTT durch einen Pufferaustausch entfernt.

Um eine Interaktion beider Proteinfragmente für UBXD1-298PreSc zu bestätigen, wurden 10 µM vom Gesamtprotein mit 250 µM DSSO (c = 50 mM in DSSO) bei 25 °C für 12 Minuten chemisch gecrosslinkt. Gestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 mM Tris (pH 7,4), um nicht reagiertes DSSO abzureagieren. Zur Kontrolle einer gelungenen Reaktion wurde der Ansatz mittels SDS-Gel visualisiert und anschließend mittels MS analysiert.

#### 4.5.12 Pulldown

##### GST-Pulldown

Für die Interaktion zwischen den UBXD1 Varianten und Ubiquitin-GST wurden die Glutathione High Capacity Magnetic Agarose Beads (Cat. G0924, Sigma-Aldrich) drei Mal mit 200  $\mu$ L PD-Puffer (PBS, 0,1 % Triton X-100, 0,25 % Lysozym, pH 7,4) gewaschen und anschließend für 1 h bei 4 °C mit PD-Puffer inkubiert. Um die Beads vollständig mit dem Bindungspartner Ubiquitin-GST zu sättigen, wurden die Beads mit 3 mg Ubiquitin-GST in 200  $\mu$ L PD-Puffer für 20 h rotierend bei 4 °C inkubiert. Nach dem Sättigen der Beads mit Ubiquitin-GST wurde der Waschschrift drei Mal wiederholt, bevor die Proben hinzugeben wurden.

Für die Interaktion mit den überexprimierten UBXD1-wt,  $\Delta$ C,  $\Delta$ UBX-C, -Linker-UBX-C Proteinen aus HEK293 Zelllysate wurden 100  $\mu$ L Glutathione High Capacity Magnetic Agarose Beads eingesetzt und nach der Sättigung und dem Waschen der Beads 3 mg Gesamtproteinmenge vom Zelllysate hinzugegeben.

Für die Interaktion mit den aus *E. coli* gereinigten UBXD1-wt,  $\Delta$ Linker-UBX-C, -Linker-UBX-C, -PUB Proteinen wurden 10  $\mu$ L Glutathione High Capacity Magnetic Agarose Beads eingesetzt und nach der Sättigung und dem Waschen der Beads 5  $\mu$ M je Protein in 200  $\mu$ L PD-Puffer hinzugegeben.

Alle Proben wurden für 4 h rotierend bei 4 °C inkubiert, anschließend drei Mal mit Waschpuffer (PBS, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4) gewaschen und die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von je 30  $\mu$ L 2x SDS-Probenpuffer und dem Erhitzen auf 95 °C für 5 Minuten. Der Nachweis der interagierenden Proteine erfolgte mittels Westernblot (siehe 4.5.13). Die Verdünnung der Antikörper Anti-UBXD1 und Anti-GST sind Tab. 4.26 zu entnehmen.

##### StrepTagII-Pulldown

Zum Nachweis von Ubiquitin, Polyubiquitin oder ubiquitinylierter Proteine wurden 50  $\mu$ L magnetische StrepTactin-Beads mit 200  $\mu$ L PD-Puffer gewaschen und anschließend mit 3 mg Gesamtprotein vom HEK293 Zelllysate (StrepTagII, StrepTagII-UBXD1) für 20 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Beads drei Mal mit 200  $\mu$ L Waschpuffer gewaschen und die gebundenen Proteine bei 95 °C für 5 Minuten mit 20  $\mu$ L 2x SDS-Probenpuffer eluiert. Der Nachweis der durch StrepTagII oder StrepTagII-UBXD1 gebundenen Proteine erfolgte mittels Anti-Ubiquitin Westernblot (siehe 4.5.13).

#### 4.5.13 Western Blot

Die Proteine wurden mittels SDS-Page (4-20 % Mini-PROTEAN TGX Gel, BioRad) nach ihrer Größe aufgetrennt und mittels Tank Blot für 200 mA über 20 h oder mit 400 mA für 4 h bei 4 °C auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit 5 % Milchpulver in PBST (1x PBS (pH 7,4), 0,05 % Tween20) für 1 h bei Raumtemperatur geblockt, anschließend drei Mal mit PBST für je 5 Minuten gewaschen. Die Membran wurde nach den Vorgaben in Tab. 4.26 mit dem entsprechenden Antikörper für 2 h bei RT oder 20 h bei 4 °C inkubiert. Vor der Zugabe des sekundären Antikörpers wurde die Membran drei Mal mit PBST gewaschen, anschließend wurde die Membran zum Nachweis mit dem sekundären Antikörper Anti-Maus-HRP Konjugat nach Tab. 4.26 in 3 % BSA für 1 h bei RT inkubiert und anschließend wiederholt mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde die SuperSignal West Pico PLUS oder Femto Chemilumineszent Western Blot Detektions Lösung verwendet.

**Tab. 4.26 Antikörper und Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot.**

Antigen (Organismus)	Verdünnung	Organismus	Kettentyp	Mono-/ Polyklonal	Klon	Hersteller
GST (Schistosoma japonicum)	1:1000 5 % MP	Maus	IgG <sub>1</sub>	monoklonal	3D4	sc-57753 Santa Cruz
UBXD1 (human)	1:1000 3 % BSA	Maus	IgG <sub>1</sub>	monoklonal	2F8- 24	ab81555 abcam
p97/VCP (792-806, human)	1:1000 3 % BSA	Maus	IgG <sub>2b</sub>	monoclonal	5	sc-57492 Santa Cruz
Poly-ubiquitinyliert- Proteine	1:2000 3 % BSA	Maus	IgG <sub>1</sub>	monoklonal	FK2	04-263 Merck
Ufd1 (human)	1:1000 3 % BSA	Maus	IgM	monoklonal	5e2	sc-81630 Santa Cruz
Npl4 (1-300, human)	1:1000 3 % BSA	Maus	IgG <sub>1</sub>	monoklonal	D1	sc-365796 Santa Cruz
Maus (HRP-Konjugat)	1:10.000 3 % BSA	Schaf	IgG	Vollantikörper		NA931 GE Healthcare

## 5 Ergebnisse

Die AAA-ATPase VCP/p97 führt innerhalb der Zelle unterschiedliche Funktionen wie dem ER-assoziierten, Ribosomal-assoziierten oder Mitochondrial-assoziierten Proteinabbau, sowie Autophagie, DNA-Reparatur und Membranfusion<sup>20-25</sup> aus. Diese Funktionen werden durch die zahlreichen Cofaktoren als Proteinkomplexe ermöglicht. UBXD1 ist der bisher einzige Cofaktor von p97, der zwei Bindestellen besitzt, einmal seinen N-Terminus und die PUB-Domäne. Dazu wurden bereits qualitative Untersuchungen der Bindungen durchgeführt<sup>38,48,49,51,101</sup>. Zum N-Terminus und der PUB-Domäne, besitzt UBXD1 als Mehrdomänenprotein noch eine UBX-Domäne am C-Terminus. Im Gegensatz zu anderen p97-Cofaktoren bindet die UBXD1-UBX-Domäne nicht an die N-Domäne von p97<sup>49</sup>.

Da es sich bei der UBXD1-UBX-Domäne um keinen p97-Bindungspartner handelt, kann die Funktion auf einer Interaktion mit anderen Proteinen / Proteinklassen der p97-Cofaktoren, wie der Entfaltung oder dem Abbau von Proteinen zutun haben. Abgesehen von einer Protein-Protein-Interaktion können auch Bindungen an Nucleosidphosphate, Zucker oder andere Moleküle möglich sein. Papadopoulos *et al.* konnten bereits zeigen, dass UBXD1 ein Proteinkomplex aus p97, PLAA, YOD1 bildet, welche am Abbau von ubiquitylierten Lysosomen beteiligt ist<sup>21</sup>. Um die Funktion der UBXD1-UBX Domäne zu untersuchen und einen Eindruck der physiologischen Relevanz von UBXD1 als p97-Cofaktor zu erhalten, wurden Bindungsstudien mit UBXD1, p97, Ubiquitin und HR23 durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Proteine in Expressionsvektoren für *E. coli* und Säugerzellen kloniert und Mutationen sowie Trunkationen der Domänen mittels Mutagenese eingeführt. Darauf folgte die Proteinexpression im entsprechenden Expressionssystem und die Proteinreinigung mittels Flüssigchromatographie. Die rekombinanten Proteine wurden anschließend für die biochemische Charakterisierung der Protein-Protein-Wechselwirkungen verwendet.

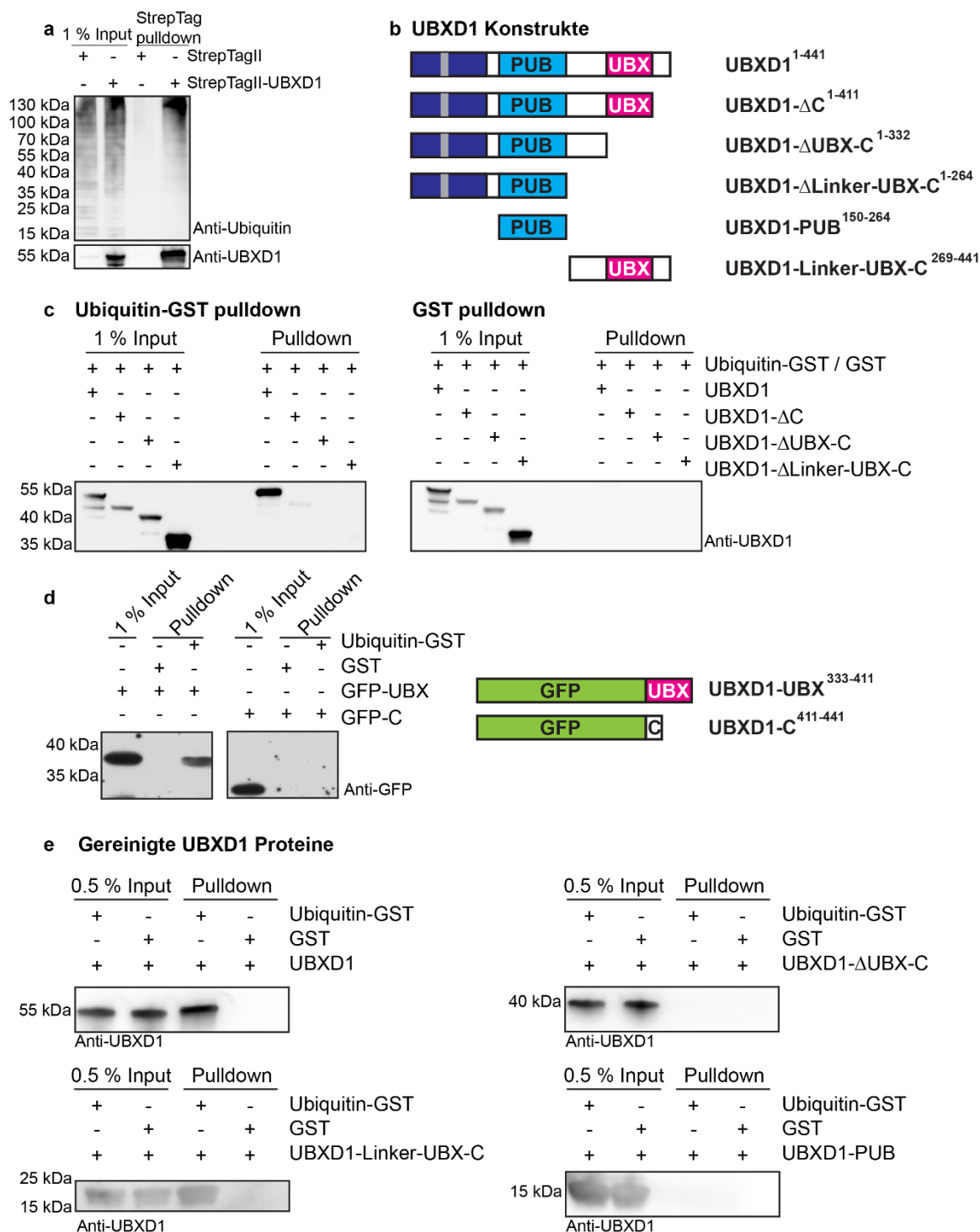
### 5.1 Die UBX-Domäne bindet an Ubiquitin

UBXD1 steht im Zusammenhang mit unterschiedlichen Prozessen, in denen ubiquitylierte Proteine durch einen p97-Komplex prozessiert werden (siehe 3.3.2). Um eine Bindung von UBXD1 an Ubiquitin und ubiquitylierte Proteine zu untersuchen, wurde StrepTagII-UBXD1 in HEK293-Zellen überexprimiert und das StrepTagII-UBXD1-Fusionsprotein mittels magnetischer Streptactin-Beads isoliert (siehe 4.5.12). Als Kontrolle wurde das StrepTagII-Peptid parallel in HEK293-Zellen überexprimiert. Um zu testen, ob überexprimiertes UBXD1 Ubiquitin oder ubiquitylierte Proteine binden kann, wurden die Co-eluierten Bindungspartner von UBXD1 mittels Westernblot auf Ubiquitin bzw. Ubiquitylierung getestet (siehe 4.5.13). Die 1 %-Input-Probe des Zelllysats zeigt in beiden Proben (StrepTagII-UBXD1, StrepTagII-

Peptid) ein gleichmäßiges Muster an ubiquitinylierten Proteinen von 15 kDa bis über 130 kDa verteilt (Abb. 5.1 a). Die Elutionsbande von StrepTagII-UBXD1 zeigt dabei deutlich eine Anreicherung von ubiquitinylierten Proteinen im Vergleich zum StrepTagII-Peptid.

Um die Bindestelle von Ubiquitin einzugrenzen, wurden anschließend mehrere vom C-Terminus her beschnittene Varianten von UBXD1 (UBXD1- $\Delta$ C, UBXD1- $\Delta$ UBX-C, UBXD1- $\Delta$ Linker-UBX-C, siehe Abb. 5.1 b) in HEK293-Zellen überexprimiert und mittels rekombinanten, aufgereinigtem Ubiquitin-GST auf ihre Bindung hin im Pulldown getestet. Dazu wurden die magnetischen GSH-Beads mit Ubiquitin-GST / GST als Negativkontrolle gesättigt und mit dem Zelllysat der überexprimierten Varianten inkubiert. Das vollständige UBXD1 (aa 1-441) und UBXD1- $\Delta$ C (aa 1-411) ohne C-Terminus wurden durch Ubiquitin-GST gebunden, auch wenn die Elution von UBXD1- $\Delta$ C nicht dieselbe Intensität an Chemolumineszenz zeigt, wie UBXD1-wt. Hingegen konnten die Varianten ohne UBX-Domäne, UBXD1- $\Delta$ UBX-C (aa 1-332) und UBXD1- $\Delta$ Linker-UBX-C (1-264) nicht gebunden werden (Abb. 5.1 c). Zur Bestätigung der Bindung der isolierten UBX-Domäne durch Ubiquitin-GST wurde von Dr. Matthias Kracht (Arbeitsgruppe Prof. Meyer, Universität Duisburg-Essen) ein Ubiquitin-GST-Pulldown mit in Säugetierzellen überexprimierten GFP-UBX und GFP-C-Terminus Protein durchgeführt und anschließend die Elution mittels Anti-GFP-Westernblot sichtbar gemacht (Abb. 5.1 d). Es zeigt sich, dass Ubiquitin-GST die einzelne UBXD1-UBX-Domäne binden kann.

Wie bereits zuvor gezeigt, ist der C-Terminus von UBXD1 nicht an der Bindung zu Ubiquitin-GST beteiligt. Da es sich bisher um in HEK293-Zellen überexprimierte Fusionsproteine handelt, wurde der GSH-Pulldown mit aus *E. coli* gereinigten UBXD1-Varianten wiederholt (Abb. 5.1 e, UBXD1-wt: BC 1281, UBXD1- $\Delta$ UBX-C: BC 1330, UBXD1-PUB: BC 1141, UBXD1-Linker-UBX-C: BC 1478). Die Ergebnisse mit den gereinigten Proteinen von UBXD1 sind dabei konsistent mit den vorherigen Experimenten und zeigen, dass die Region zwischen Aminosäure 269 und 441, welche das UBXD1-Linker-UBX-C-Protein ist, an Ubiquitin-GST bindet.








**Abb. 5.1 UBXD1 bindet Ubiquitin durch seine UBX-Domäne.**

**a:** SrepTagII-Pulldown von SrepTagII-UBXD1 und SrepTagII, überexprimiert in HEK293 Zellen. Detektion von Co-eluierten Ubiquitin / ubiquitinylierten Proteinen mittels Western Blot. Die Ubiquitinketten oder ubiquitinylierten Proteine werden durch UBXD1 mit eluiert. **b:** Verwendete UBXD1-Konstrukte für die Expression in HEK293-Zellen zur Bestimmung der ubiquitinbindenden Region in UBXD1. Die Domänen sind farblich codiert: N-Terminus (1-133, dunkelblau) mit VIM-Helix (50-65, grau), PUB Domäne (150-264, hellblau) und der UBX-Domäne (333-411, pink). **c:** Die Deletion der UBX-Domäne (333-411) verhindert die Bindung von Ubiquitin an UBXD1. UBXD1 und verschiedene Trunkationen des Proteins wurden in HEK293 Zellen exprimiert und das Zelllysat für den Pulldown mit Ubiquitin-GST (Ub-GST) verwendet. Das Co-eluierte UBXD1 wurde mittels UBXD1-Antikörper im Western Blot nachgewiesen. **d:** Die UBX-Domäne / der C-Terminus von UBXD1 wurden mit GFP-tag in HEK293-Zellen überexprimiert und das Zelllysat im Ub-GST-Pulldown verwendet (links). Verwendete GFP-UBXD1-Konstrukte der UBX-Domäne und des C-Terminus (rechts). **e:** Ub-GST-Pulldowns mit aufgereinigtem UBXD1, UBXD1-ΔUBX-C, UBXD1-Linker-UBX-C und der PUB-Domäne. Für alle Pulldowns wurden noch GST-Westernblots als Kontrolle gemacht (siehe Abb. 12.5).

## 5.2 UBXD1 besitzt eine erweiterte UBX-Domäne

Aufgrund der Funktion als Ubiquitinbindungspartner stellt sich die Frage, wie die UBX-Domäne in UBXD1 strukturell organisiert ist und wie sich die Domänen arrangieren. Dazu wurden unterschiedliche Experimente zur Gewinnung struktureller Informationen durchgeführt und dabei mit der Analytical Core Facility Essen (Prof. Markus Kaiser, Universität Duisburg-Essen) zusammengearbeitet, um massenspektrometrische Untersuchungen vornehmen zu lassen. Durch Crosslinking-Experimente (siehe Methode 4.5.4) und analytischer Gelfiltrationen (siehe Methode 4.5.11) sollen strukturelle Informationen darüber gewonnen werden, wie die einzelnen Domänen räumlich zueinander orientiert sind. Durch chemisches Crosslinking werden kovalente Bindung ausgebildet, sollten sich die reaktiven Aminosäuren in einem Abstand von 11 Å zueinander befinden. Durch die analytische Gelfiltration wird untersucht, ob bestimmte Domänen intramolekular miteinander interagieren.

Im folgenden Kapitel wurden folgende Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt:

Interne BC-Nummer	Protein (Aminosäuregrenzen)	
1141	UBXD1-PUB (150-264)	
1281	UBXD1-wt (1-441)	
1299	UBXD1-298PreSc (1-449)	
1367	UBXD1-269PreSc (1-449)	
1478	UBXD1-Linker-UBX-C (269-441)	

Genauere Details der Plasmide sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

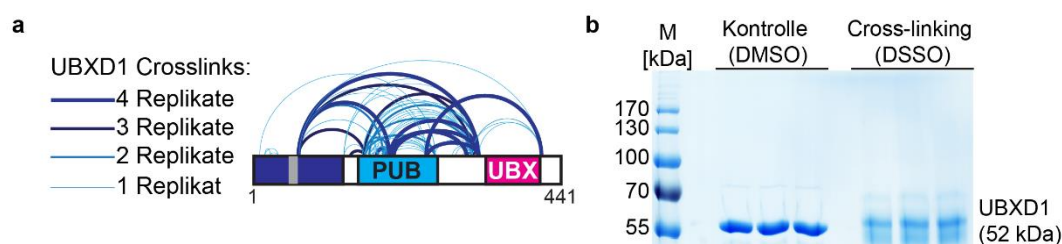
### 5.2.1 Proteinreinigung von UBXD1

Das UBXD1-wt-Protein sowie die Mutanten und Deletionsvarianten wurden in *E. coli* nach Tab. 4.13 exprimiert und nach Protokoll 4.4 mittels GSH-Affinitätschromatographie und anschließender Gelfiltration gereinigt (siehe Anhang 12.1.1). Die isolierte PUB-Domäne wurde nach Blueggel *et al.* gereinigt<sup>51,67</sup>. Um eine mögliche Interaktion der UBX-Domäne zu untersuchen, wurde das GST-UBXD1-Linker-UBX-C-His<sub>8</sub>-Protein (269-441, interne BC-Nummer 1417) mittels GSH-Affinitätschromatographie und anschließender IMAC gereinigt (siehe Anhang 12.1.1).



### 5.2.2 Die PUB- und UBX-Domäne bilden eine kompakte Konformation

Um strukturelle Informationen über die Anordnung zu erhalten, wurde UBXD1 mittels Disuccinimidylsulfoxid (DSSO,  $c = 50 \text{ mM}$  in DMSO) chemisch gecrosslinkt. Bei DSSO handelt es sich um einen bivalenten Crosslinker, der an jedem Ende des Spacers je eine funktionelle Gruppe enthält, welche mit Lysinen, Serinen, Threoninen und Tyrosinen eine kovalente Bindung eingehen kann. Zur massenspektrometrischen Analyse wurden  $10 \mu\text{M}$  UBXD1 mit einem 25-fachen Überschuss an DSSO für 15 Minuten bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert, sodass keine unspezifischen Multimere entstehen. Das Crosslinking zeigt in Abb. 5.2, dass zahlreiche Aminosäuren zwischen der PUB-Domäne (T163, K166, K172, T177, K193 und K257) entweder mit K333 in der UBX-Domäne oder mit K320 und K325 kovalent verbunden sind. Auch die C-terminale Aminosäure K430 bildet Crosslinks zu K269, welche sich direkt hinter der PUB-Domäne (150-264) befindet (Abb. 5.2 a). Die Ergebnisse des gecrosslinkten Monomers zeigen aus Abb. 5.2 b, dass die PUB- und UBX-Domäne sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, was auf eine intramolekulare Bindung beider Domänen hinweisen kann (siehe Abb. 5.2 a, Tab. 12.1).



**Abb. 5.2 Chemisches Crosslinking von UBXD1.**

**a:** Domänenarchitektur von UBXD1 mit identifizierten Crosslinks in vier biologischen Replika (blaue Halbkreise, links; gecrosslinkte Aminosäuren, siehe Tab. 12.1). **b:** SDS-Gel vom gecrosslinkten UBXD1. Gecrosslinktes UBXD1 zeigt keine unspezifischen Multimere durch DSSO (rechts).

Zur Bestätigung einer intramolekularen Interaktion beider Domänen wurde eine Protease-Erkennungssequenz für die GST-HRV3C Protease (PreSc) zwischen Aminosäure 298 und 299, UBXD1-298PreSc, kloniert. Die Aminosäureposition befindet sich in der Linker-Region (265-332) zwischen PUB- und UBX-Domäne genau mittig an Position 299. Das UBXD1-298PreSc Protein wurde für den Verdau mit PreSc-Protease bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Von dem gereinigten ungeschnittenen und dem geschnittenen UBXD1-298PreSc-Protein wurde eine analytische Gelfiltration gemacht. Falls beide Proteinfragmente UBXD1<sup>1-298</sup> ( $M = 34 \text{ kDa}$ ) und UBXD1<sup>299-441</sup> ( $M = 18 \text{ kDa}$ ) keine intramolekulare Bindung eingehen, sollten im Chromatogramm zwei getrennte Peaks zu sehen sein. Falls eine Bindung beider Fragmente vorliegt, sollte im Chromatogramm ein Peak zu sehen sein, der beim selben Retentionsvolumen detektiert wird wie das ungeschnittene UBXD1-298PreSc-Protein.

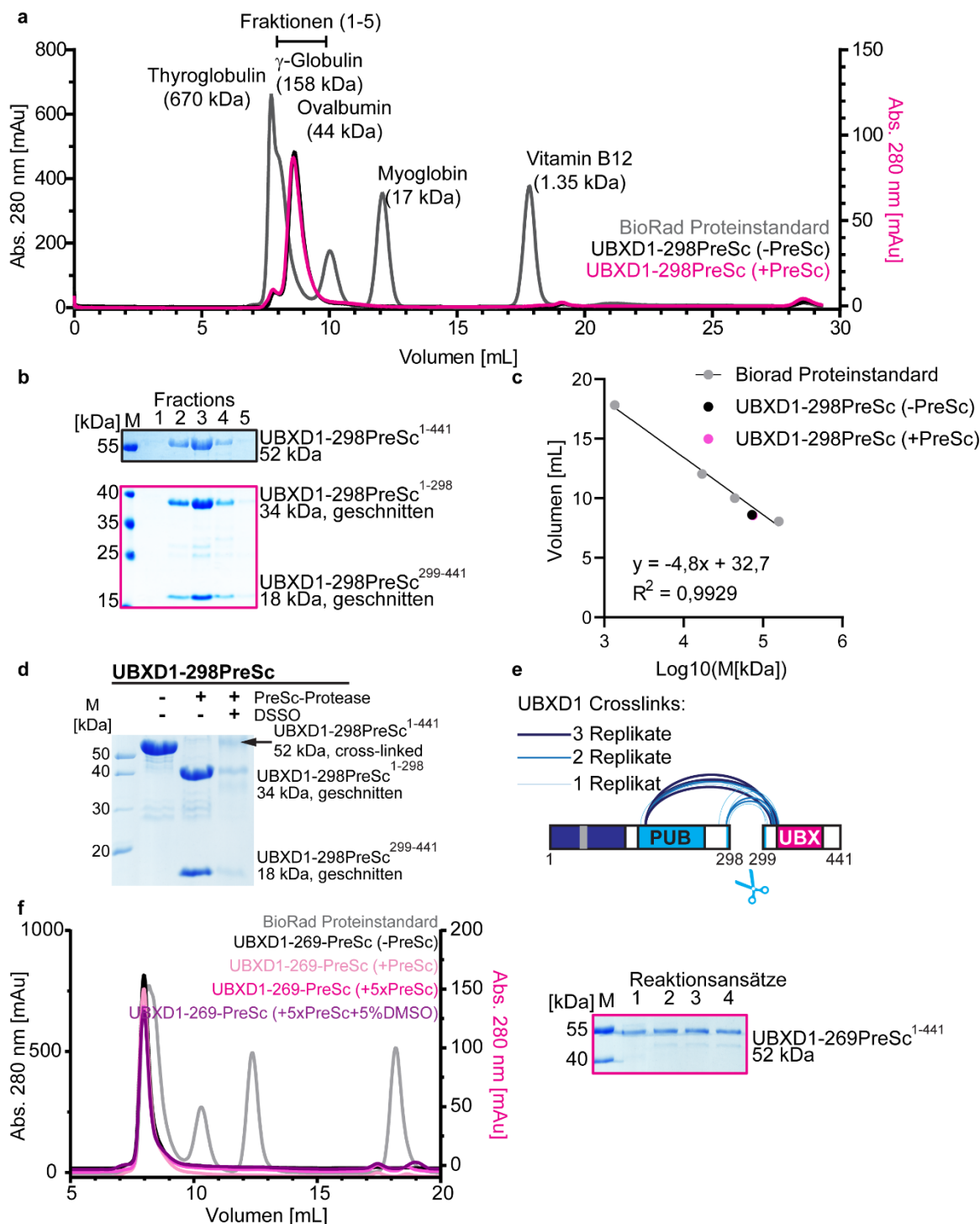
Im Chromatogramm vom ungeschnittenen UBXD1-298PreSc kann ein Peak bei einem Retentionsvolumen von 8,6 mL detektiert werden. Das Chromatogramm vom geschnittenen UBXD1-298PreSc hat einen Peak bei einem Retentionsvolumen von 8,55 mL (siehe Abb. 5.3 a). Im Coomassie-Gel der analytischen Gelfiltration sieht man deutlich in den Fraktionen 1-5 die beiden, durch den Protease-Verdau entstandenen, Proteinfragmente mit 34 kDa und 18 kDa (siehe Abb. 5.3 b). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Proteinfragmente miteinander interagieren, obwohl sie durch die PreSc-Protease geschnitten wurden.

Errechnet man aus der Kalibrierung des Proteinstandards das Molekulargewicht erhält man eine Größe von 73 kDa für das ungeschnittene UBXD1-298PreSc und für die geschnittenen UBXD1-298PreSc-Fragmente (UBXD1<sup>1-298</sup> und UBXD1<sup>299-441</sup>) ein Molekulargewicht von 75 kDa (Abb. 5.3 c).

Um Informationen zu erhalten, wie die Domänen in den Proteinfragmenten UBXD1<sup>1-298</sup> und UBXD1<sup>299-441</sup> aneinander binden, wurden die Fraktionen der analytischen Gelfiltration vom geschnittenen UBXD1-298PreSc gesammelt und mittels DSSO gecrosslinkt (siehe Tab. 12.2). Im Coomassie-Gel lässt sich nach abgelaufener Reaktion auf derselben Höhe wie das ungeschnittene UBXD1-298PreSc-Protein eine Bande des gecrosslinkten Komplexes bei >50 kDa erkennen (siehe Abb. 5.3 d).

Das entstandene Muster der identifizierten chemischen Crosslinks stimmt mit den Crosslinks des ungeschnittenen UBXD1-wt Proteins überein. Auffällig ist, dass in allen drei technischen Replika nur die PUB Domäne an die UBX-Domäne mit K333 und Y334 sowie die vorherige Linkerregion zwischen 319-325 crosslinkt und keine Crosslinks zwischen dem N-terminalen Bereich und der UBX-Domäne nachweisbar sind (siehe Abb. 5.3 e).

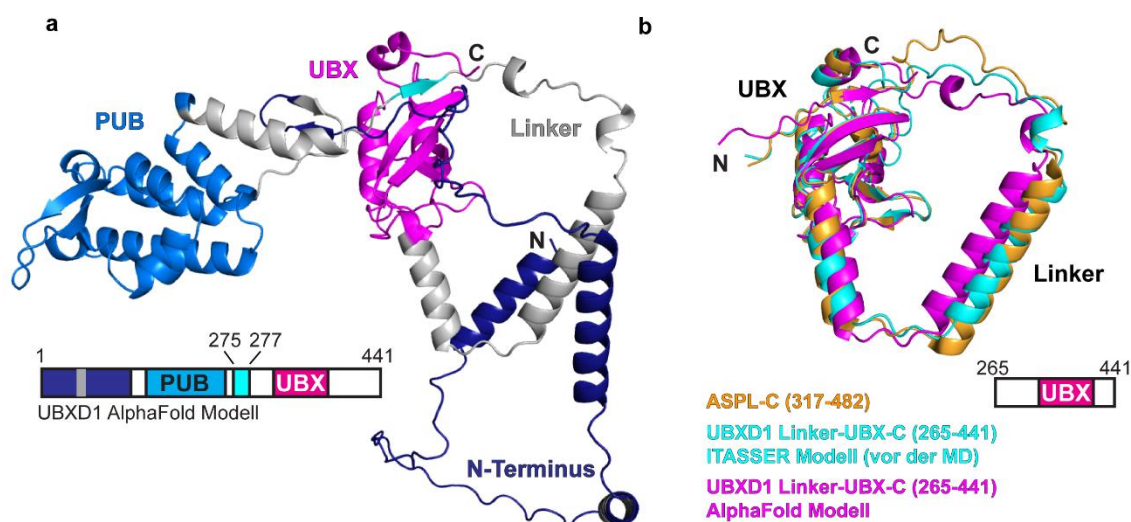
Ergänzend wurde eine Erkennungssequenz für die HRV3C-Protease hinter der PUB-Domäne, am Beginn der Linker-Region an der Position 269 eingefügt und das beschriebene Experiment wiederholt. Das UBXD1-269PreSc konnte allerdings mit 1-fachen Überschuss nicht geschnitten werden. Verwendet man die 5-fache Menge an Protease und versucht die Proteinstruktur durch Zugabe von 5 % DMSO zu lockern, um den Zugang zur Proteaseschnittstelle zu ermöglichen erfolgt kein Verdau durch PreSc (siehe Abb. 5.3 f). Auch die analytische Gelfiltration zeigt, dass jeder Reaktionsansatz (-PreSc, +PreSc, +5x PreSc, +5x PreSc+5% DMSO) von UBXD1-269PreSc im Totvolumen der Säule läuft, so wie das größte Protein des BioRad-Proteingrößenstandards Thyroglobulin mit 670 kDa. Dabei kann es sich um lösliche Aggregate handeln.



**Abb. 5.3 Intramolekulare Interaktion von UBXD1 in Abwesenheit von p97.**

**a:** Analytische Gelfiltration von UBXD1-298PreSc (+/- PreSc Verdau) und BioRad Proteinstandard. **b:** SDS-Gel der Fraktionen 1-5. Bei UBXD1-298PreSc (-PreSc) ist eine Bande auf der Höhe von 55 kDa zu erkennen. Bei den Fraktionen von UBXD1-298PreSc (+PreSc) sind zwei Banden der Größe von 34 kDa und 18 kDa. **c:** Bestimmung des Molekulargewichtes durch das Retentionsvolumen der Größenstandards für UBXD1-298PreSc (+/- PreSc). Für das ungeschnittene UBXD1-298PreSc-Protein wurde eine Größe von 73 kDa und das geschnittene UBXD1-298PreSc von 75 kDa berechnet. **d:** SDS-Gel der UBXD1-298PreSc Fragmenten zeigen, dass aus beiden Fragmenten ein kovalent verknüpfter Komplex wird, der der Größe des ungeschnittenen UBXD1-298PreSc-Proteins entspricht. **e:** Die Crosslinks der drei technischen Replika vom geschnittenen UBXD1-298PreSc zeigen, dass beide Fragmente 1-298 und 299-441 über Crosslinks zwischen PUB, Linker und UBX miteinander verbunden sind (Tab. 12.2). **f:** Analytische Gelfiltration von UBXD1-269PreSc Protein unter verschiedenen Bedingungen zeigen, dass es im Totvolumen läuft (links) und die Probe durch die Zugabe von PreSc nicht geschnitten werden konnte SDS-Gel, rechts).

Um zu untersuchen, ob eine intramolekulare Wechselwirkung einer homologen UBX-Domäne bekannt ist, wurde eine Homologiesuche des UBXD1-Fragments (Aminosäure 251-441) gegen die Proteindatenbank pdb mittels iTASSER durchgeführt<sup>102-104</sup>. Neun der zehn berechneten Modelle verwendeten die Kristallstruktur des C-terminalen Teils des Proteins ASPL (*Alveolar soft part sarcoma locus*), welches in der Struktur als Komplex mit der p97-N-Domäne gebunden vorliegt (pdb: 5ifs und 5ifw)<sup>105</sup>. Parallel zur Modellberechnung durch iTASSER wurde das mittels *deep learning* berechnete Strukturmodell von UBXD1 der AlphaFold Strukturdatenbank genutzt<sup>106,107</sup>. Das AlphaFold-Modell zeigt, dass sich die PUB-Domäne und die UBX-Domäne in räumlicher Nähe zueinander befinden. Dabei bildet der Linker an seinem Anfang einen  $\beta$ -Strang (275-277, siehe Abb. 5.4 a, cyan  $\beta$ -Strang), welcher sich an die  $\beta$ -Faltblattstruktur der UBX-Domäne anlagert (siehe Abb. 5.4 a,  $\beta$ -Strang 346-352, magenta UBX-Domäne). Darauf folgend berechnet AlphaFold  $\alpha$ -Helices für den Linker (siehe Abb. 5.4 a). Überlagert man die beiden Modelle der berechneten iTASSER- und AlphaFold-Struktur mit der UBX-Domäne von ASPL, zeigen alle Strukturen eine Ähnlichkeit der Tertiärstruktur (siehe Abb. 5.4 b). Beide berechneten Modelle zeigen dieselbe Anordnung des  $\beta$ -Stranges und beider  $\alpha$ -Helices des Linkers, sowie dieselbe Kernstruktur der  $\beta$ -Faltblätter der UBX-Domäne. Der Vergleich der Strukturmodelle zeigt, das iTASSER- und AlphaFold-Strukturmodell auf Basis der Aminosäuresequenz von ASPL berechnet wurden.



**Abb. 5.4 Berechnete Strukturmodelle von UBXD1 mittels iTASSER und AlphaFold.**

**a:** Mittels *deep learning* berechnete Struktur von UBXD1 (1-441) aus der AlphaFold Strukturdatenbank. N-Terminus: dunkelblau, PUB-Domäne: blau, Linker: grau, UBX-Domäne: pink. Im Linker befindlicher  $\beta$ -Strang (cyan) lagert sich an die  $\beta$ -Faltblattstruktur der UBX-Domäne an. **b:** Strukturalignment der Linker-UBX-C-Region vom iTASSER-UBXD1-Modell (cyan), der AlphaFold-Struktur (pink) mit der ASPL-C-Kristallstruktur (pdb 5ifw 5ifs, orange) zeigen eine hohe Ähnlichkeit der sekundären Strukturelemente. Überlagerung wurde durchgeführt von Dr. Christine Beuck (AG Prof. Bayer, Universität Duisburg-Essen).

Die Fragmente von ASPL (317-464)<sup>105</sup> und UBXD1 (265-410) zeigen eine Sequenzhomologie von 55 % (siehe Abb. 5.5 a). Die UBX-Domäne von ASPL setzt sich dabei aus einem Kern von vier anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammen, flankiert von zwei  $\alpha$ -Helices. Hinzu kommt, dass der Kern der Domäne durch einen weiteren  $\beta$ -Faltblattstrang komplementiert wird, welcher sich am Anfang der Linkerregion (AS 265-332,  $\beta$ 1: 274-278) befindet. Dieser vorrausgehende  $\beta$ 1-Faltblattstrang des Linkers (274-278), lagert sich an das erste  $\beta$ -Faltblatt der UBX-Domäne (335-344) an. Die bestehende konservierte UBX-Domäne wird ergänzt und mit dem  $\beta$ 1-Strang zur erweiterter UBX-Domäne (eUBX, siehe Abb. 5.5 b) zusammengefasst. In dieser Anordnung formt der Linker noch zwei weitere  $\alpha$ -Helices, ehe die UBX-Domäne beginnt. Dieses Strukturmodell stimmt mit den bisherigen Strukturinformationen aus der massenspektrometrischen Analyse der chemischen Crosslinks überein, welche kovalente Crosslinks zwischen dem Beginn des Linkers K269 und dem Beginn bzw.  $\beta$ 1-Faltblatt der UBX-Domäne K325 und K333 nachgewiesen hat. Aufgrund der Homologie des Strukturmodells wird die Kombination aus Linker und der UBX-Domäne als erweiterte UBX-Domäne bezeichnet.

Das Modell der erweiterten UBX-Domäne erklärt auch die Beobachtungen aus den folgenden experimentellen Ansätzen. So konnte in einer Fluoreszenzanisotropie-Titration, in dem das gelabelte Atto594-Linker-UBX-C-Protein mit unmarkierter PUB-Domäne titriert wurde keine direkte Interaktion beider Konstrukte nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.5 c). Im Falle des UBXD1-298PreSc-Proteins, bei dem die eingesetzte Schnittstelle für die HRV3C-Protease hinter dem interagierenden  $\beta$ 1-Faltblattstrang des Linkers liegt, lässt sich die Bindung der beiden Proteinfragmente UBXD1<sup>1-298</sup> und UBXD1<sup>299-441</sup> aneinander folglich über die Interaktion der beiden  $\beta$ -Faltblätter  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 erklären (siehe Abb. 5.5 b).

Um mehr Informationen über die räumliche Anordnung beider Domänen zu bekommen, wurden 22 Crosslinks zwischen der UBXD1-PUB-Domäne (150-264, pdb: 6SAP) und dem eUBX (265-441) iTASSER-Modell als Beschränkungen für eine *docking*-Rechnung verwendet. Die *docking*-Rechnung wurde von Dr. Johannes van den Boom (AG Prof. Meyer, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt und hat dabei 95,9 % der verwendeten Crosslinks erfüllt (siehe Abb. 5.5 d, grüne Linien). Anschließend wurden die PUB-Domäne und der Linker *in silico* miteinander an den Positionen E264 und P265 kovalent verknüpft und eine anschließende molekulardynamische Simulation mit Lösemitteloptimierung durchgeführt, in der sich die beiden  $\alpha$ -Helices des Linkers einander annähern (siehe Abb. 5.5 d).

Das berechnete Strukturmodell aus der Homologiesuche und den experimentellen Daten der Massenspektrometrie zeigen, dass die UBX-Domäne (333-411) und der vorherige Linker (265-332) die Struktur der eUBX-Domäne (317-389) von ASPL widerspiegeln. Die eUBX-Domäne von ASPL bindet an die N-Domäne von p97, nimmt durch die Bindung das Hexamer auseinander und bildet p97:ASPL Heterooligomere (siehe Abb. 5.5 e). Das UBXD1 hingegen bindet nicht mit seiner UBX-Domäne an die N-Domäne von p97, auch die Bindung der VIM-Helix oder der PUB-Domäne lösen die Hexamerstruktur von p97 nicht auf (Quellen). ASPL und UBXD1 haben demnach eine gemeinsame Strukturhomologie ihrer UBX-Domänen sowie der erweiterten UBX-Domäne über die Linkerregion (siehe Abb. 5.5 f).

**Bildunterschrift zu Abb. 5.5:**











**a:** Aminosäurealignment von UBXD1 (265-410) mit ASPL (317-646) zeigt eine Sequenzhomologie von 55 %. **b:** Grafische Darstellung der Anordnung der Sekundärstrukturelemente vom UBXD1-Linker und der UBX-Domäne. Die eingefügten Schnittstellen für Position 269 und 298 sind über Scheren eingezeichnet. **c:** Fluoreszenz-Anisotropie Messung von Atto594-UBXD1-Linker-UBX-C mit PUB-Domäne, zeigt keine Interaktion beider Domänen. **d:** UBXD1 C-terminales Fragment spiegelt die Anordnung der extended UBX Domäne von ASPL. Das Strukturmodell vom intramolekularen PUB:UBX Komplex basiert auf der NMR-Struktur der PUB-Domäne (150-264, blau, PDB: 6SAP) und dem berechneten UBX iTASSER Modell (265-441, grau mit der bekannten UBX Domäne, 333-411, pink). Beide Domänen wurden mittels HADDOCK unter Verwendung der experimentellen Crosslinks (grüne Linien) als Beschränkungen gedockt und anschließend eine MD-Simulation mit YASARA gemacht. **e:** Kristallstruktur von ASPL<sup>105</sup> gebunden an p97-ND1 (PDB: 5IFW), eUBX (317-499, grau), mit der bekannten UBX-Domäne (386-464, pink) und der N-Domäne von p97 (orange). **f:** Schematisches Modell von UBXD1 (1-441; links) und ASPL (313-553; rechts) gebunden an ein p97 Monomer. Während die ASPL-eUBX Domäne an die N-Domäne von p97 bindet, ist die eUBX-Domäne von UBXD1 mit der PUB-Domäne assoziiert, welche an den C-Terminus von p97 bindet.





### 5.3 UBX bindet über ein $\beta$ -Faltblattmotiv an Ubiquitin

Die bereits beschriebene Bindung der UBX-Domäne von UBXD1 an Ubiquitin und ubiquitinylierte Proteine (siehe Kapitel 5.1) soll als nächstes im Detail über gereinigte Proteine nachgewiesen werden. Dazu wurden für die Kapitel 5.3 getätigten Experimente folgende Proteine in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt:

Interne BC-Nummer	Protein (Aminosäuregrenzen)	
1141	UBXD1-PUB (150-264)	
1281	UBXD1-wt (1-441)	
1329	Ubiquitin-wt (1-75)	
1353	UBXD1-Linker (263-330)	
1409	SUMO1 (1-101)	
1410	Ubiquitin-I44A (1-75)	
1412	Ubiquitin-F4BpA (1-75)	
1422	StrepTagII (1-8)	
1423	StrepTagII-UBXD1-wt (1-441)	
1445-1463, 1483-1496	StrepTagII-UBXD1-Alaninmutanten (1-441)	

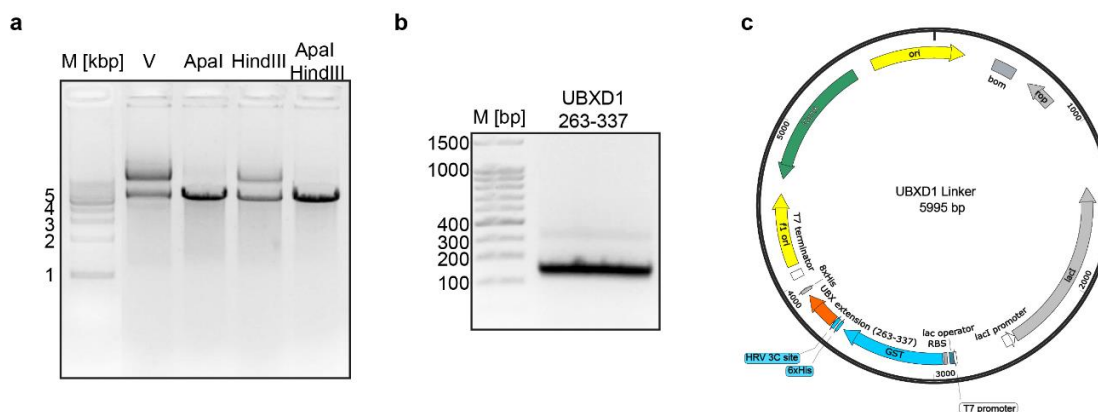
Genauere Details der Plasmide sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

Exemplarisch wird eine Restriktionsklonierung für das in diesem Kapitel verwendete UBXD1-Linker-Protein (5.3.1) und eine Proteinaufreinigung für Ubiquitin mit Perchlorsäurefällung (0) gezeigt. Mit den rekombinanten Proteinen soll die Dissoziationskonstante zwischen UBXD1 und Ubiquitin mittels Fluoreszenzanisotropie und die Stöchiometrie der Bindung durch isothermale Titrationskalorimetrie bestimmt werden. Für die Fluoreszenzanisotropie sollen unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Ubiquitine (Atto594-NHS, Atto594-Maleimid, Rhodamin), sowie als Kontrolle das Ubiquitin-ähnliche Protein Atto594-SUMO1 verwendet werden. Um zusätzlich zum  $K_D$ -Wert noch strukturelle Informationen zu erhalten, werden beide Proteine miteinander chemisch mit DSSO sowie photo-reaktiv durch BpA gecrosslinkt und mittels Massenspektrometrie analysiert. Ergänzend zur LC-MS-Analyse wird eine  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration beider Komponenten durchgeführt, um die einzelnen interagierenden Aminosäuren auf der Oberfläche von Ubiquitin zu identifizieren. Das entstehende Datenset aus Dissoziationskonstanten und Strukturinformationen soll genutzt werden, um im interagierenden Bereich ein Mutantenscreening durchzuführen, indem die oberflächenexponierten Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht und anschließend ihre Bindung an Ubiquitin mittels Pulldown getestet werden.



### 5.3.1 Klonierung von UBXD1-Linker-Konstrukten

Zur Bestimmung einer möglichen Interaktion wurde die Linkerregion (263-337) als isolierte Domäne mittels Restriktionsklonierung in den Expressionsvektor pET41b-PreSc kloniert. Für die Klonierung wurde der Vektor pET41b mit den Enzymen Apal und HindIII nach Protokoll geschnitten und mittels NucleoSpin PCR clean up Kit aufgereinigt ( $\beta_{\text{vektor}} = 30 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , siehe Abb. 5.6 a). Als Ausgangsvektor für die PCR wurde UBXD1-wt (interne BC-Nummer 1281) verwendet, das PCR-Produkt aus dem Agarosegel aufgereinigt (siehe Abb. 5.6 b) und mit Apal und HindIII verdaut. Nach 10 Minuten Hitzeinaktivierung wurde der Reaktionsansatz ohne Agarosegel direkt aufgereinigt ( $\beta_{\text{PCR}} = 44 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) und für die Ligation verwendet. Die Ligation erfolgte im Verhältnis Vektor:PCR-Fragment mit 1:3, 1:5 und 1:10, bei 16 °C für 1 Stunde. Vom Ligationsansatz wurden anschließend 5  $\mu\text{L}$  in chemisch kompetente NEB5a-Zellen transformiert und auf einer Agarplatte ausplattiert. Die transformierten Zellen wurden für 20 h bei 37 °C inkubiert und anschließend von einzelnen Klonen das Plasmid isoliert und die Klonierung mittels Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) kontrolliert (siehe Abb. 5.6 c). Da das UBXD1-Linker-Protein mit den Aminosäuregrenzen 263-337 nicht exprimierbar war, wurden mittels QuikChange Mutagenese weitere Varianten (263-319, 263-330) mutiert, woraus das exprimierbare Konstrukt mit den Aminosäuregrenzen 263-330 entstanden ist. Die QuickChange-Mutagenese wurde nach 4.2.1 durchgeführt, die Primer sind Tab. 4.11 zu entnehmen. Das fertige Plasmid (UBXD1-Linker, 263-330) stand nun für die Expression der Linker-Region in *E. coli* zur Verfügung.

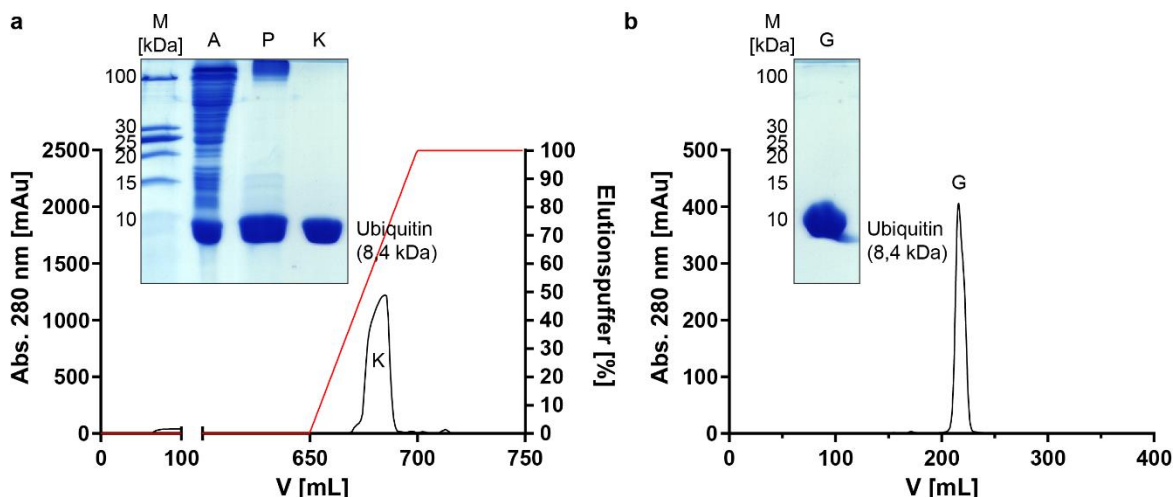


**Abb. 5.6 Restriktionsklonierung von UBXD1-Linker.**

**a:** Geschnittener pET41b-PreSc Vektor (1,4  $\mu\text{g}$ ) mit den Restriktionsenzymen Apal und HindIII nach 5 Minuten bei 37 °C. Zur Kontrolle wurde der ungeschnittene Vektor (V) geladen. **b:** PCR Produkt (243 bp) von UBXD1 Aminosäure 263-337 mit dem Primerpaar 2528F/2529R. **c:** Plasmidkarte von UBXD1-Linker in pET41b-PreSc-Vektor.

### 5.3.2 Proteinreinigung von Ubiquitin

Für die Interaktionsexperimente mit Mono-Ubiquitin oder die folgende Ubiquitinkettensynthese wurde Ubiquitin in *E. coli* rekombinanten exprimiert und aufgereinigt. Ubiquitin wurde je nach Anforderung in TB-Medium +/- BpA oder in Minimal Medium M9 mit  $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$  zur Isotopenmarkierung exprimiert. Die Reinigung erfolgte für jede Variante gleich, die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und anschließend bei 30.000 rpm abzentrifugiert. Der klare Zellüberstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen und bei 4 °C mit 2,5 mL 15 %iger Perchlorsäure versetzt, damit es zur Fällung der *E. coli* eigenen Proteine kommt. Das Gemisch wurde anschließend rührend für 10 Minuten inkubiert und zur Trennung der gefällten Proteine erneut bei 30.000 rpm zentrifugiert (siehe Abb. 5.7 a, SDS-Gel P). Der klare, mit Perchlorsäure versetzte Überstand wurde anschließend auf das Volumen von 5 mL mittels Zentrifugalkonzentratoren verringert. Der einkonzentrierte Überstand wurde anschließend mit 25 mM Ammoniumacetat (pH 4,5) auf 500 mL verdünnt, steril filtriert und mittels starker Kationenaustauschchromatographie (HiTrap SP HP, 5 mL, GE Healthcare) gereinigt (Abb. 5.7 a). Die Elution mit 25 mM Ammoniumacetat (pH 7,6) mit 200 mM Natriumchlorid erfolgte mittels einen linearen Gradienten von 0-100 % Elutionspuffer über ein Volumen von 100 mL. Die Fraktionen, die das Ubiquitin enthielten, wurden anschließend vereinigt, auf ein Volumen von 2 mL einkonzentriert und für eine folgende Gelfiltration verwendet. Für die Gelfiltration wurde 50 mM NaKPi-Puffer (pH 6,5) mit 150 mM NaCl und eine Superdex 75 pg 26/60 verwendet (Abb. 5.7 b). Während der Reinigung wurden nach den jeweiligen Schritten Proben für ein SDS-Gel genommen. Durch die Perchlorsäurefällung konnten die meisten *E. coli*-eigenen Proteine gefällt und durch die Kationenaustauschchromatographie bereits die Verunreinigungen vom Ubiquitin getrennt werden. Wo die Verunreinigung mit einer Größe von >250 kDa nicht durch die Kationenaustauschchromatographie getrennt werden konnte, gelang dies durch die Gelfiltration.



**Abb. 5.7 Proteinreinigung von Ubiquitin.**

**a:** Kationenaustauschchromatographie vom Überstand der Perchlorsäurefällung zeigt, dass das Ubiquitin bei 50 % Elutionspuffer von der Säule eluiert wird (K). Im SDS-Gel kann man erkennen, dass die meisten *E. coli* eigenen Proteine vom Aufschluss der Zellen (A) nach der Perchlorsäurefällung vom Ubiquitin getrennt werden konnten (P). Durch die Kationenaustauschchromatographie konnte die Verunreinigung bei >100 kDa entfernt werden (K). **b:** Die Gelfiltration zeigt im Chromatogramm einen einzelnen Peak bei 220 mL Retentionsvolumen (G) und enthält das gereinigte Ubiquitin.

### 5.3.3 UBXD1 bindet an Mono-Ubiquitin

Zur genauen Quantifizierung der Bindung zwischen UBXD1 und Ubiquitin wurde die Dissoziationskonstante mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) sowie Fluoreszenzanisotropie ermittelt. Mittels ITC (Vorlage UBXD1-wt, Zugabe Ubiquitin-wt) wurde ein  $K_D$ -Wert von  $18 \pm 2 \mu\text{M}$ ,  $\Delta H = 1664 \pm 78 \text{ cal/mol}$  und  $\Delta S = 27,7 \text{ cal/mol/deg}$  mit einer 1:1 Stöchiometrie ( $N = 0,99 \pm 0,03$ ), siehe Abb. 5.8 a und Tab. 5.1 bestimmt. Die Fluoreszenzanisotropie-Titrationsen von Rhodamin-Ubiquitin mit UBXD1 ( $K_D = 23,0 \pm 2,7 \mu\text{M}$ , siehe Abb. 5.8 b) und Atto594-Ubiquitin mit UBXD1 ( $K_D = 16,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) bestätigen den vorherigen  $K_D$ -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich. Eine Ubiquitin-I44A Mutante, welche das klassische Ubiquitin-Interface unterbricht<sup>108–110</sup> und jegliche Interaktion zu Ubiquitin-bindenden Proteinen unterbindet, wurde auch von UBXD1 nicht mehr gebunden (Abb. 12.6 g). Das Ubiquitin-ähnliche SUMO1-Protein wird ebenfalls nicht gebunden (Abb. 12.6 d), was darauf hinweist, dass UBXD1 Ubiquitin spezifisch erkennt und über das klassische Interface von Ubiquitin bindet.

In dieser Arbeit konnte bisher die Bindung der UBX-Domäne von UBXD1 an Ubiquitin mittels Pulldownexperimente gezeigt (siehe Abb. 5.1) und die Dissoziationskonstante durch ITC und Anisotropie (siehe Tab. 5.1) bestimmt werden. Um die Regionen beider Proteine einzugrenzen, die an der Wechselwirkung beteiligt sind, wurde UBXD1 mit Ubiquitin chemisch mit DSSO sowie photo-reaktiv mit der Ubiquitinvariante Ub-F4BpA gecrosslinkt. Nach Verdau mit Lys-C und Trypsin wurden die gecrosslinkten Peptide mittels LC-MS identifiziert. Die Bedingungen der DSSO-Reaktion ( $c(\text{DSSO})$ , Reaktionszeit,  $c(\text{UBXD1})$ ,  $c(\text{Ubiquitin})$ ) wurden

so gewählt, dass keine unspezifischen Multimere entstehen (Abb. 5.8 c, oben links). Die DSSO-gecrosslinkten Aminosäuren von Ubiquitin (K48, S57, Y59, K63 und T66) befinden sich in räumlicher Nähe zum Kern der UBX-Domäne von UBXD1 mit K333 und der PUB-Domäne mit K166, Y194, K202 und K257. Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 5.2.2) bilden die PUB- und UBX-Domänen einen intramolekularen Komplex (PUB-Linker-UBX) und befinden sich somit in enger räumlicher Nähe zueinander. DSSO besitzt eine Linkerlänge von 12 Å. Aufgrund des sterischen Anspruchs kann DSSO nur Aminosäuren am Rande eines Bindungsinterfaces / einer Bindungsregion crosslinken, nicht aber die direkt an der Bindung beteiligten Aminosäurenreste. Zudem reagiert DSSO nur mit nukleophilen Aminosäuren (Lys, Ser, Tyr, Thr). Crosslinks werden als nur dann beobachtet, wenn diese Aminosäuren im passenden Abstand zur Bindungsregion vorhanden sind.

Um diese Einschränkungen für den chemischen Crosslinker zu umgehen, wurde zusätzlich ein photo-reaktives Crosslinking mit einer Ubiquitinvariante Ub-F4BpA durchgeführt. Dabei wurde anstelle der Aminosäure F4, welche sich am Rande der klassischen Bindungsregion befindet, die Aminosäure p-Benzoyl-L-phenylalanin verwendet, welche durch UV-Strahlung eine Radikalreaktion auslöst und somit Crosslinks mit allen Resten bildet, die sich in unmittelbarer Nähe befinden (siehe Abb. 5.8 c, unten). Der Ub-F4BpA:UBXD1 Komplex zeigt multiple Crosslinks zu UBXD1 mit P48, T49, A52, Q53 und M54 im N-Terminus, F223 in der PUB-Domäne, sowie A321, E326, G330 im Linker und Y334 innerhalb der UBX-Domäne. Diese BpA-Crosslinks von Ubiquitin zur UBX- und PUB-Domäne sind konsistent mit den DSSO-Crosslinks. Crosslinks zwischen Ubiquitin und dem intrinsisch ungeordneten und somit flexiblen N-Terminus von UBXD1 könnten möglicherweise durch eine temporäre Wechselwirkung zustande kommen.

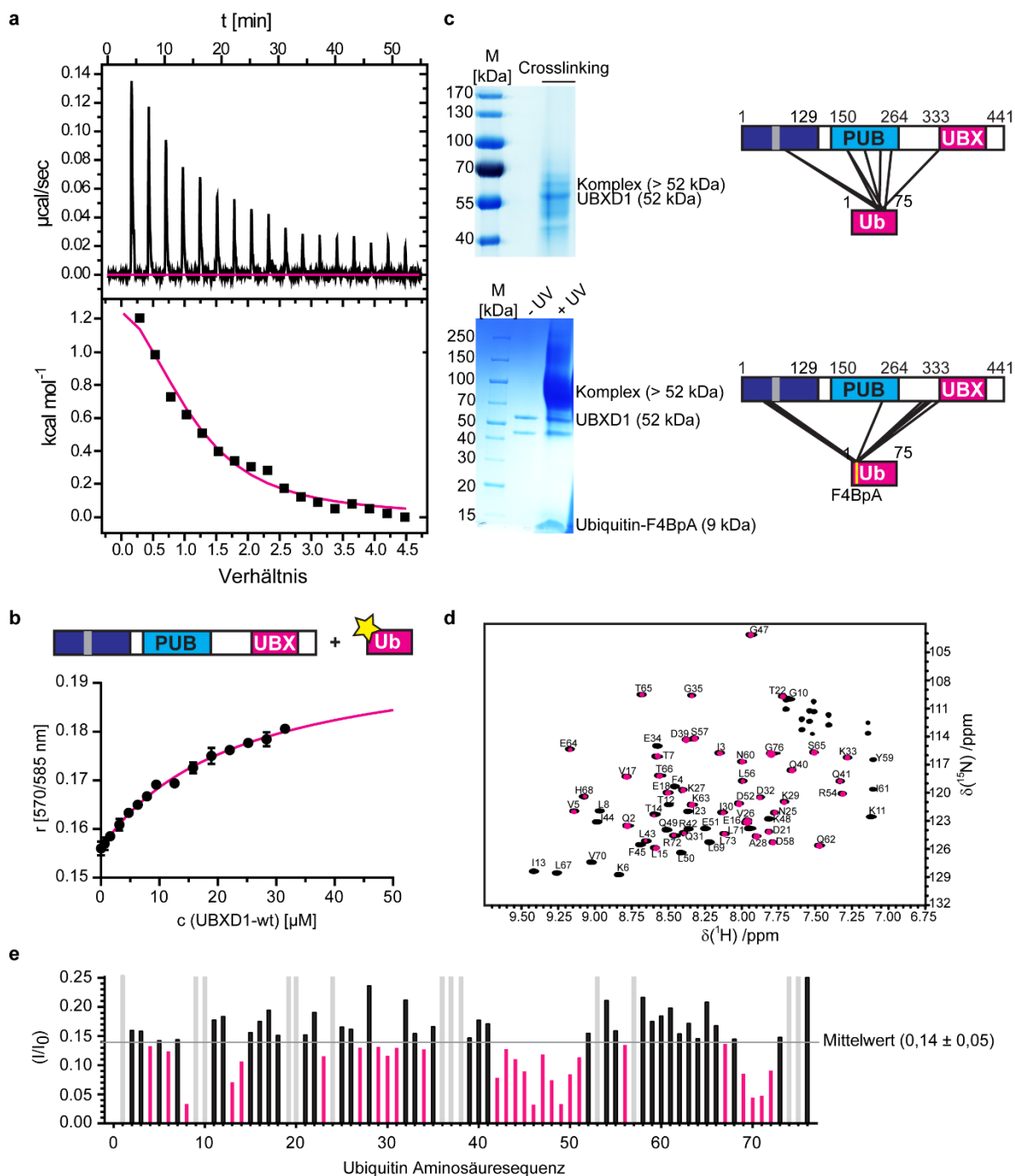
**Tab. 5.1 Dissoziationskonstante von Ubiquitin mit UBXD1.**

(\* = Einfachbestimmung,  $\blacktriangle$  = Dreifach-bestimmung,  $\bullet$  = ITC,  $\square$  = Fluoreszenzanisotropie,  $^\circ$  =  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ -HSQC Titration, k.B. = keine Bindung nachweisbar)

<b>Ubiquitinvarianten</b>	<b>Dissoziationskonstante <math>K_D</math> [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	
Ubiquitin	$18 \pm 2 \mu\text{M}^{*\bullet}$	Abb. 5.8 a
Ubiquitin-I44A	k.B. $^{*\bullet}$	Abb. 12.6 g
Rhodamine-Ubiquitin	$23,0 \pm 2,7 \mu\text{M}^{\blacktriangle\square}$	Abb. 5.8 b
Atto594-Ubiquitin	$16,9 \pm 0,7 \mu\text{M}^{\blacktriangle\square}$	Abb. 12.6 f
Atto594-SUMO1	k.B. $^{\blacktriangle\square}$	Abb. 12.6 d
<b>Ubiquitin mit UBXD1-Fragmenten</b>		
UBXD1-PUB (150-264)	k.B. $^{*\circ}$	Abb. 12.9 c
UBXD1-Linker (263-330)	k.B. $^{*\circ}$	Abb. 12.9 a,b
UBXD1- $\Delta$ UBX-C (1-332)	$30,2 \pm 2,1 \mu\text{M}^{\blacktriangle\square}$	Abb. 12.7

Durch die Crosslinks konnten die interagierenden Regionen von UBXD1 zu Ubiquitin weiter eingrenzt werden. Um die genauen an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren von Ubiquitin zu identifizieren, wurde ein NMR-Experiment eine  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $^{15}\text{N}$ -Ubiquitin mit UBXD1 (1-441) durchgeführt (Abb. 5.8 d). Die direkte Bindung des UBXD1 sollte durch die Änderung der chemischen Nachbarschaft Einfluss auf die Aminosäuren des Ubiquitin nehmen. Dadurch sollten die entsprechenden  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{N}_\text{H}$ -Signale für die repräsentierten Aminosäuren in dem  $^1\text{N}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des Ubiquitins beeinflusst werden. Diese könnten entweder in ihrer Signalstärke oder in ihrer Position im Spektrum (Shift) verändert werden. Durch die Zugabe von UBXD1 wurde eine starke Verringerung der Signalintensität von  $I/I_0 < 0,9$  bei L8, L13, P37, P38, R42, F45, A46, K48, Q49, L50, L69, V70, L71 und R72 beobachtet (Abb. 5.8 e). Die große Zunahme des Molekulargewichtes bei der Bindung von UBXD1 an  $^{15}\text{N}$ -Ubiquitin verursacht eine generelle Abnahme aller Signalintensitäten im HSQC-Spektrum. Eine weitere spezifische Intensitätsabnahme einzelner Signale hingegen zeigt, dass die entsprechenden Aminosäuren direkt an der Bindung beteiligt sind<sup>11</sup>. Die interagierenden Aminosäuren auf der Oberfläche von Ubiquitin stimmen dabei mit dem hydrophoben Patch (K6, I8, R42, I44, A46, K48, Q49, E51 und V70) überein, mit dem Ubiquitin generell seine Partner bindet<sup>1,5</sup>.

Zur Kontrolle, ob die PUB-Domäne (150-264) oder die Linkerregion (264-332) von UBXD1 direkt an Ubiquitin binden können, wurden ebenfalls  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrations durchgeführt, wobei weder bei  $^{15}\text{N}$ -PUB + Ubiquitin,  $^{15}\text{N}$ -Ubiquitin + Linker, noch  $^{15}\text{N}$ -Linker + Ubiquitin eine Veränderung der Signale beobachtet werden konnte (siehe Abb. 12.9). Eine Fluoreszenzanisotropie-Titration von UBXD1- $\Delta$ UBX-C zeigt allerdings mit einem  $K_D$ -Wert von  $30,2 \pm 2,1 \mu\text{M}$ , dass der UBXD1-Linker an Ubiquitin binden kann (siehe Abb. 12.7). Dadurch kann ebenfalls bestätigt werden, dass die PUB von Aminosäure 150-264 nicht an Ubiquitin bindet, aber die Bindung des Linkers zusätzlich zur UBX-Domäne wahrscheinlich ist. Was die Hypothese unterstützt, dass die erweiterte UBX-Domäne (eUBX, 269-410) der Bindungspartner für Ubiquitin ist.



**Abb. 5.8 Charakterisierung der Interaktion von UBXD1 mit Ubiquitin.**

**a:** ITC-Messung von UBXD1-wt mit Ubiquitin-wt ergibt einen  $K_D$  von  $18 \pm 2 \mu\text{M}$  und eine Bindungsstöchiometrie von  $N = 0,99 \pm 0,03$ . **b:** Fluoreszenzanisotropie-Titration von UBXD1 mit Rhodamin-Ubiquitin hat einen  $K_D$  von  $23,0 \pm 2,7 \mu\text{M}$  (Dreifachbestimmung). **c:** Chemisches Crosslinking des UBXD1:Ubiquitin-Komplexes mit DSSO (oben). Das SDS-Gel zeigt einen gecrosslinkten Komplex bei  $>52 \text{ kDa}$  ohne unspezifische Multimere (links). Photoreaktives Crosslinking von UBXD1 mit Ubiquitin-F4BpA (unten) zeigt im SDS-Gel ebenfalls einen gecrosslinkten Komplex von  $>52 \text{ kDa}$  (links). Das reactive BpA ist mit einer gelben Linie gekennzeichnet. **d:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $^{15}\text{N}$ -Ubiquitin mit UBXD1-wt ( $0 \mu\text{M}$  UBXD1 schwarz,  $20 \mu\text{M}$  UBXD1 pink). **e:** Histogramm der Signalintensität der einzelnen Aminosäuren von Ubiquitin durch die Zugabe von UBXD1. Die nicht zugeordneten Aminosäuren aus dem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum sind in hellgrau dargestellt. Der berechnete Mittelwert der Signalintensität berechnet sich aus allen zugeordneten Aminosäuren im Spektrum. Aminosäuren unterhalb des  $(I/I_0)$ -Mittelwertes sind in pink eingefärbt.

Im Folgenden sollen die interagierenden Aminosäuren von UXBD1 im Bereich Linker-UBX bestimmt werden. Da das isolierte Linker-UBX-C-Konstrukt nicht in ausreichender Menge rekombinant exprimiert werden konnte, konnte keine Mutationsanalyse mittels ITC, Fluoreszenzanisotropie oder NMR-Titration durchgeführt werden. Daher wurde ein Alanin-Mutantenscreening oberflächenexponierter Aminosäuren im Bereich zwischen Aminosäure R272 und D373 mittels Ubiquitin-GST-Pulldown aus HEK293-Zellysate durchgeführt. Um eine stabile Expression und Proteinfaltung des humanen UBXD1 Proteins und deren Mutanten zu gewährleisten, wurden die UBX-Alaninmutanten in humane HEK293 Zellen transfiziert und überexprimiert. Wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, wurde der Pulldown aus Zellysate mit gereinigtem GST-Ubiquitin wiederholt.

Die Mutanten R305A, R307A, V316A und K320A zeigen eine stabile Expression wie der Wildtyp von UBXD1, jedoch eine geringere Pulldowneffizienz, was auf eine schwächere Ubiquitinbindung der Mutanten hinweist (Abb. 5.9 a). Zusätzlich zeigen die Mutanten R272A, R274A, F277A, F286A, L288A, P289A, P344A, D345A, L348A, Q350A, Y363A und R367A ebenfalls eine geminderte Pulldowneffizienz und demnach eine schwächere Bindung zu Ubiquitin, allerdings ist auch ihr Expressionsniveau verringert. Die verringerte Expression kann ein Hinweis darauf sein, dass diese Mutationen die strukturelle Integrität von UBXD1 schwächen und dadurch einen Einfluss auf die Ubiquitinbindung haben. Dies wird bei oberflächenexponierten Aminosäuren jedoch selten beobachtet.

Die Mutanten liegen im zusätzlichen  $\beta$ -Strang (R272-F277) und der ersten  $\alpha$ -Helix (L288-P289) in der Linker-Region, gefolgt vom ersten und zweiten  $\beta$ -Strang (R340-T352) der UBX-Domäne und passen zu den Crosslinkdaten des UBXD1:Ub-Komplexes. Die Mutationsanalyse deutet demnach darauf hin, dass das  $\beta$ -Faltblatt der UBX-Domäne die zentrale Bindestelle für Ubiquitin ist.

Zur weiteren Bestätigung einer Interaktion der  $\beta$ -Faltblätter von UBXD1 mit Ubiquitin wurde ein Peptid-Array mit Peptidsequenzen (*peptide spotted array*, *SPOT array*) durchgeführt. Dafür wurde die gesamte Aminosäuresequenz von UBXD1 (441 Aminosäuren) in Peptide der Länge von 12 Aminosäuren mit einem Versatz von je 2 Aminosäuren aufgeteilt, die dann auf eine Membran synthetisiert wurden. Die Membran wurde mit BSA geblockt, anschließend mit 10  $\mu\text{g/mL}$  Atto594-Ubiquitin ( $n = 5 \text{ nmol}$ ) inkubiert und mit PBST gewaschen. Gebundenes Atto594-Ubiquitin wurde mittels Fluoreszenzscan nachgewiesen (siehe Abb. 5.9 b, links). Zur Kontrolle wurde eine Membran mit 10  $\mu\text{g/mL}$  nicht-reaktionsfähigem Atto594-Tris ( $n = 36 \text{ nmol}$ , Abb. 5.9, b, rechts) oder BSA inkubiert.

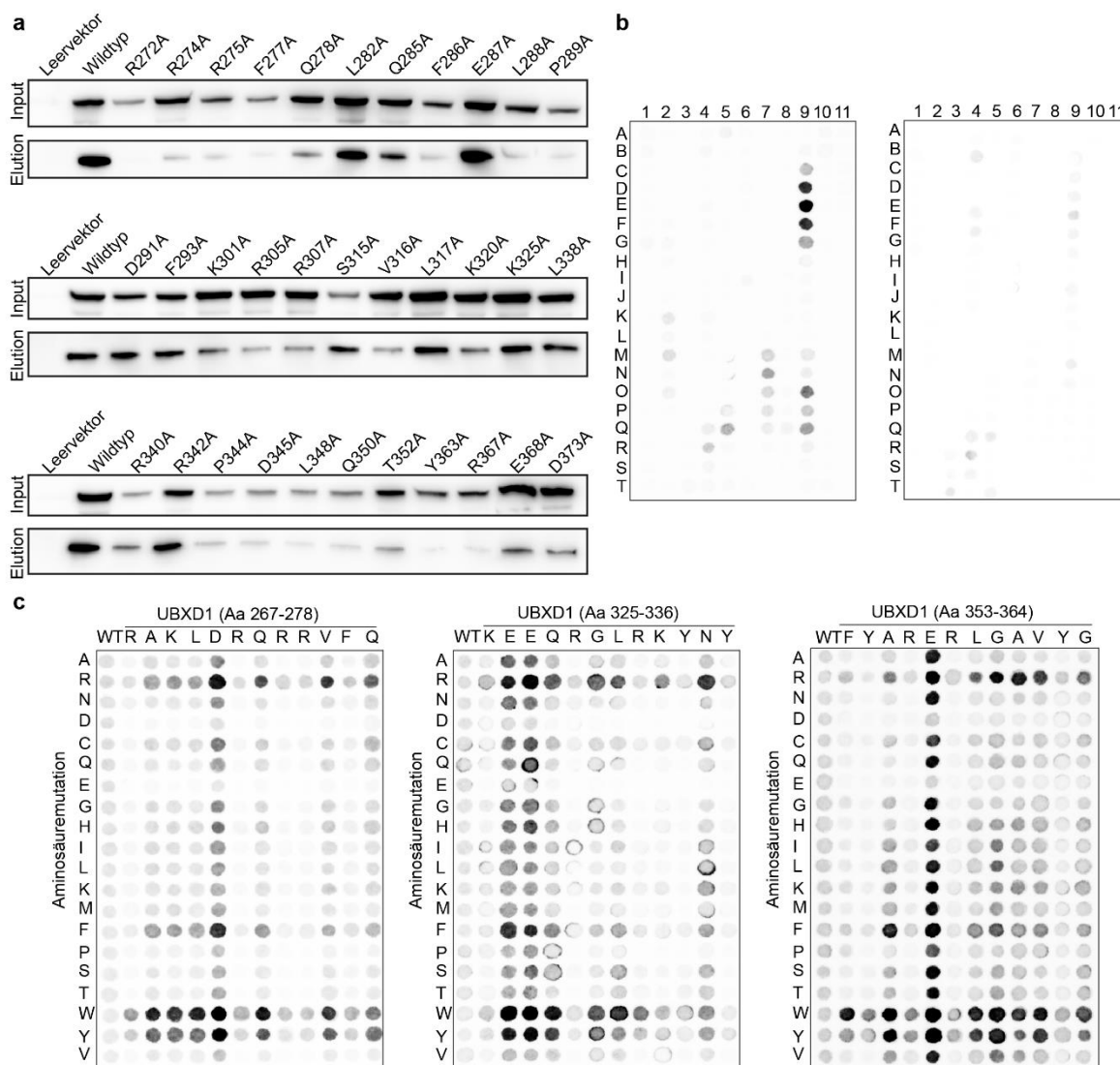
Da für den Versuch eine konstante Massenkonzentration an Bindungspartnern eingesetzt wurde, resultiert aufgrund der Massendifferenz zwischen dem fluoreszenzmarkierten Protein und dem freien Fluorophor ein 7x-facher Überschuss an Fluorophor in der Kontrolle. Der Fluoreszenzscan zeigt starke Fluoreszenz für die Spots M7-Q7, C9-G9 und M9-Q9, die den Sequenzbereichen 267-278, 325-336 und 353-363 entsprechen, welche den  $\beta$ -Faltblattbereich des Linkers sowie der UBX Domäne abdecken. Bei der Membran der Atto594-Tris Kontrolle zeigen sich dagegen nur extrem schwache Signale im vorderen Aminosäurenbereich in den Spots B4, F4-G4 und Q4-S4, sowie C9-M9.

Aus den interagierenden Peptidsequenzen wurden die Peptide R267-Q278, K325-Y336 und F353-G364 für ein Mutantenscreening verwendet, wobei jede Position im Peptid gegen jede natürliche Aminosäure ausgetauscht wurde. Im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz des Peptides (erste Reihe, Abb. 5.9 c) fällt auf, dass bei den Mutationen der Peptide ein Austausch der Aminosäuren Arginin und Tyrosin den größten Effekt zeigt und deren Mutation kein Fluoreszenzsignal mehr nachweisbar ist: R267, R272, R274, R275, F277, R329, R332, K333, Y334, Y336, Y354, R356, R358 und Y365. Diese Aminosäuren stimmen mit den Bereichen der gecrosslinkten Aminosäuren (DSSO: K269-K333, BpA: E326, G330, Y334), sowie den aus den Alanin-Mutanten des UBXD1 Proteins fokussierten Aminosäuren (R272, R274, R275, F277, Q278, K320, T352, Y363, R367) überein.

Die Bindung von UBXD1 an Mono-Ubiquitin konnte auf unterschiedliche Weise nachgewiesen und quantifiziert werden. Durch biophysikalische Messungen wurde eine mikromolare Dissoziationskonstante mit einer Stöchiometrie von 1:1 bestimmt. Durch NMR-Messungen wurden die interagierenden Aminosäuren auf der Oberfläche von Ubiquitin identifiziert, welche dem bekannten hydrophoben Bereich entsprechen, mit dem Ubiquitin die meisten seiner Partner bindet. Da rekombinantes UBXD1-eUBX (269-441) nicht in ausreichender Menge exprimiert werden konnte, wurde durch Alternativen (Alaninscan in HEK293 Zellen und Peptid-Array), sowie Ausschlussverfahren ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titrations von gereinigter PUB-Domäne sowie UBXD1-Linker mit Ubiquitin) die Bindestelle, sowie die beteiligten Aminosäuren von UBXD1 weiter eingegrenzt.

Alle Ergebnisse aus den Pulldown-Experimenten (Kapitel 5.1), sowie der biochemischen und biophysikalischen Charakterisierung der Bindung zeigen, dass die UBXD1-UBX Domäne an Ubiquitin bindet und UBXD1 somit neben seiner Rolle als p97 Cofaktor die Rolle als Ubiquitinbinder einnimmt.










**Abb. 5.9 Mutationsanalyse von UBXD1.**

**a:** Westernblot mit Anti-UBXD1 Antikörper vom Ub-GST Pull-down von UBXD1-wt und Alaninmutanten zeigen, dass UBXD1-wt mit Ub-GST co-eluiert wird. Die Mutanten R272A, R274A, R275A, F277A, F286A, L288A, P289A, P344A, D345A, L348A, Y363A und R367A zeigen eine geringere Intensität der Elutionsbande als UBXD1-wt. **b:** Peptid-Array Membran von UBXD1 (1-441, 12er Peptide, 2er Aminosäure-Versatz) inkubiert mit 10 µg/mL Atto594-Ubiquitin (links) und als Farbstoffkontrolle 10 µg/mL Atto594-Tris (rechts). Die Peptide der Spots M7-Q7 (AS 267-278), C9-G9 (AS 325-336) und M9-Q9 (AS 353-363) zeigen eine Interaktion mit Ubiquitin. **c:** Mutationscreening der interagierenden Peptidsequenzen 267-278, 325-336 und 353-364.

## 5.4 UBXD1 bindet vorwiegend kurze Ubiquitinketten

Die Tatsache, dass UBXD1 eine Bindestelle für Ubiquitin aufweist, stellt die Frage, in welchem Zusammenhang dies mit den Entfaltungskomplexen von p97 steht. UBXD1 wurde durch den ELDR-Entfaltungskomplex, bestehend aus p97 mit PLAA, YOD1 und UBXD1, bereits mit der Entfaltung K48-polyubiquitylierter Substrate in Verbindung gebracht<sup>21</sup>. Andere bereits bekannte p97 Entfaltungskomplexe (Ufd1:Npl4:p97; SDS22:I3:PP1:p97,<sup>62,98,112</sup>) prozessieren ebenfalls polyubiquitylierte Substrate zur Entfaltung. Daher soll die Interaktion von UBXD1 mit K48-verknüpften Ubiquitinketten definierter Länge untersucht werden. Dazu soll unter Einsatz einer E1- und E2-Ligase Ubiquitinketten spezifischer Länge mit fluoreszenzmarkiertem Ubiquitin synthetisiert und aufgereinigt werden. Die Dissoziationskonstante der Ubiquitinketten (K48-Ub<sub>2</sub>, -Ub<sub>3</sub>, -Ub<sub>4</sub>) werden anschließend mit UBXD1-wt mittels Fluoreszenzanisotropie-Titrations bestimmt. Im folgenden Kapitel werden die folgenden Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert und für die Ubiquitinkettensynthese gereinigt:

Interne BC-Nummer	Protein (Aminosäuregrenzen)	
1281	UBXD1-wt (1-441)	
1329	Ubiquitin-wt (1-75)	
1386	Ubiquitin-M1C (1-75)	
1387	mUbe1 (1-924)	
1388	Ubc7 (1-165)	

Genauere Details der Plasmide sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

### 5.4.1 Reinigung der Ubiquitin-Ligase Fusionsproteine zur Poly-Ubiquitin Synthese

Die E1- und E2-Ligasen GST-Ubc7 und His<sub>6</sub>-mUbe1 wurden in *E. coli* überexprimiert (Tab. 4.13) und anschließend mittels Affinitätschromatographie gereinigt (Kapitel 4.4). Die Affinitäts-tags wurden nicht mittels Proteasen entfernt, um die in der Synthese eingesetzten Proteine ggf. über die entsprechende Affinitätssäule zu entfernen. Anschließend wurde GST-Ubc7 über eine Gelfiltrations- und His<sub>6</sub>-mUbe1 über eine Anionenaustauscher-Säule weiter gereinigt und anschließend in 50 mM HEPES (pH 8,0) und 10 mM MgCl<sub>2</sub> umgepuffert (siehe Anhang 12.1.2).

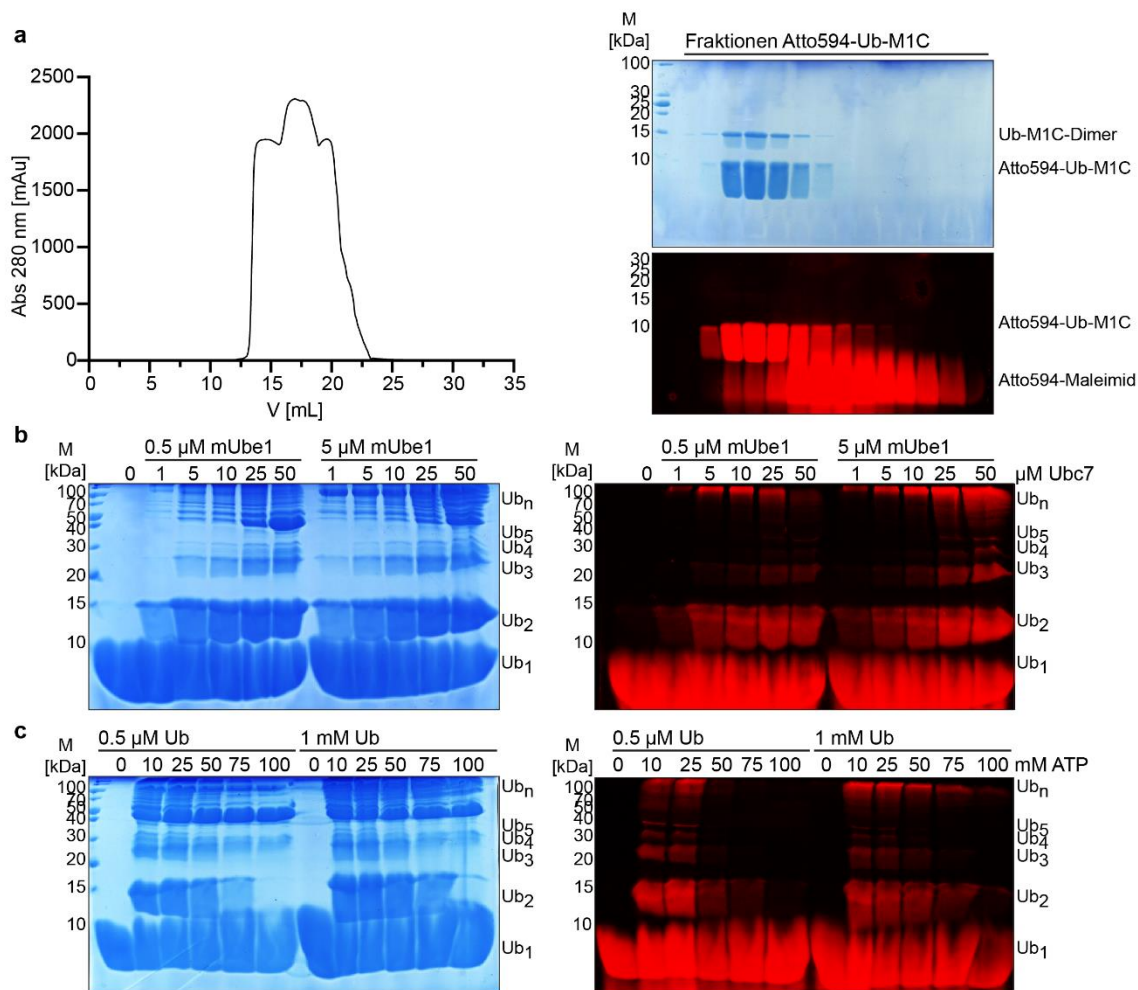
#### 5.4.2 Synthese von K48-verknüpften Ubiquitinketten

Zur Synthese fluoreszenzmarkierter Ubiquitinketten wurde zuerst eine M1C-Ubiquitin Mutante mittels QuikChange-Mutagenese generiert, um eine spezifische Kopplung des Atto594-Farbstoffes über eine Maleimid-Gruppe an das mutierte Cystein zu ermöglichen. Die Expression und Aufreinigung des Proteins ist equivalent zur Reinigung des Wildtyp-Ubiquitins, unter dem Zusatz von DTT in der Kationenaustauschchromatographie sowie der Gelfiltration, um eine Verbrückung über Disulfide zu verhindern.

Zur Fluoreszenzmarkierung wurde Ub-M1C Atto594-Maleimid inkubiert und der Reaktionsansatz anschließend mittels Gelfiltration gereinigt. Die Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-Gel und Fluoreszenzscan analysiert und die entsprechenden Fraktionen, welche das fluoreszenzmarkierte Atto594-Ub-M1C und den wenigsten freien Farbstoff enthielten einkonzentriert (siehe Abb. 5.10 a).

Zur gezielten Synthese von Ubiquitinketten bestimmter Länge von Di- bis Tetra-Ubiquitin wurde zu Beginn die Konzentration der E1- und E2-Ligasen optimiert. Dabei wurden 0,5  $\mu\text{M}$  oder 5  $\mu\text{M}$  mUbe1 mit 1, 5, 10, 25 oder 50  $\mu\text{M}$  Ubc7 kombiniert und im Reaktionsansatz mit 10 mM ATP, 1 mM unmarkierten Ubiquitin, sowie 0,1  $\mu\text{g}$  Atto594-M1C-Ubiquitin bei 37 °C für 30 h inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz ohne E1- und E2-Enzym angesetzt. Die Reaktionen wurde mittels SDS-Gel kontrolliert (siehe Abb. 5.10 b). Mit steigender Ubc7-Konzentration sieht man die Zunahme von Di- und Tri-Ubiquitin, zusätzlich wurde bei den Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$  mUbe1 mit 25 oder 50  $\mu\text{M}$  Ubc7 ein geringer Anteil an Tetra-Ubiquitin gebildet.

Für die präparative Synthese der Ubiquitinketten wurde anschließend mit einer konstanten Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  mUbe1 und 50  $\mu\text{M}$  Ubc7 gearbeitet. Um zu kontrollieren, ob die Konzentration an Ubiquitin oder ATP die Bildung höherer Ketten oder die Gesamtausbeute an Ubiquitin beeinflussen kann, wurde noch die Ubiquitin- und ATP-Konzentration variiert und Testreaktionen mit 0,5 und 1 mM unmarkiertem Ubiquitin mit jeweils 10, 25, 50, 75 und 100 mM ATP angesetzt. Das SDS-Gel dieser Reaktion (Abb. 5.10 c) zeigt, dass eine Konzentration von über 25 mM ATP die Synthese der Ketten inhibiert. Die Konzentration an unmarkiertem Ubiquitin hat allerdings keinen Einfluss auf die Gesamtausbeute oder die gebildete Kettenlänge. Für die endgültige Synthese der Ubiquitinketten wurden 1 mM unmarkiertes Ubiquitin, 10  $\mu\text{M}$  Atto594-M1C-Ubiquitin, 5  $\mu\text{M}$  mUbe1, 50  $\mu\text{M}$  Ubc7 mit 10 mM ATP eingesetzt.



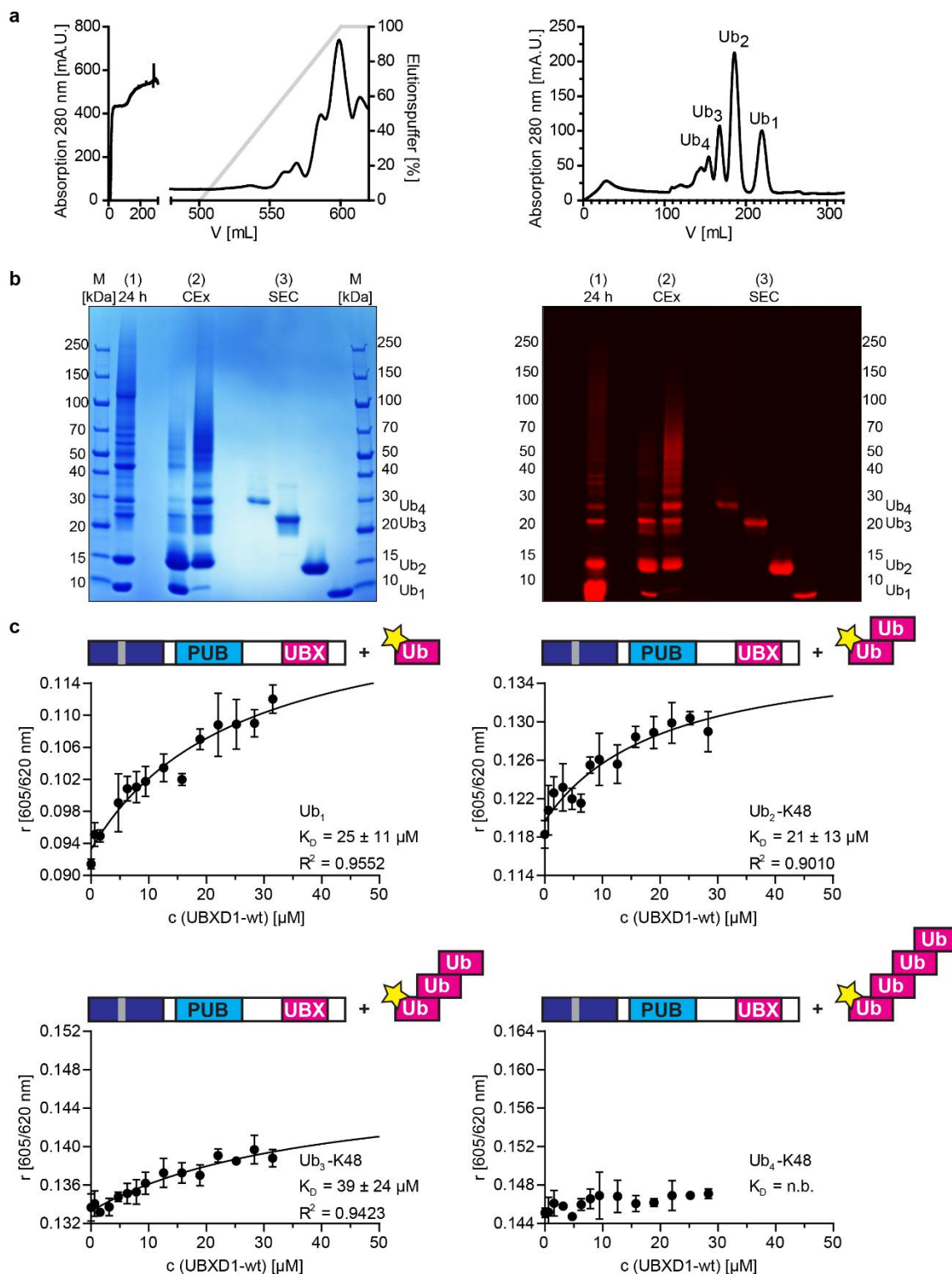
**Abb. 5.10 Optimierung der Synthese von K48-verknüpften Ubiquitinketten.**

**a:** Gelfiltration zur Reinigung von Atto594-Ubiquitin-M1C (links) und SDS-Gel mit Fluoreszenzscan der gesammelten Fraktionen (rechts). **b:** Optimierung der Stoffmengenkonzentration an E1-Enzym mUbe1 und E2-Enzym Ubc7. Das SDS-Gel zeigt die gebildeten Polyubiquitinketten von Ub<sub>2-5</sub> (links), welche durch den Fluoreszenzscan bestätigt werden (rechts). Durch höhere Konzentration beider Enzyme können mehr Polyubiquitinketten gebildet werden. **c:** Optimierung der eingesetzten Stoffmengenkonzentration an Ubiquitin und ATP zur Synthese. Durch eine steigende ATP-Konzentration wird die Bildung der Ketten inhibiert, wohingegen die Konzentration an Ubiquitin keinen deutlichen Einfluss auf die Ausbeute hat.

Die gebildeten K48-Ubiquitinketten wurden mittels Kationenaustauschchromatographie gereinigt, um die Ketten von den mUbe1 und Ubc7 Proteinen zu trennen (siehe Abb. 5.11 a, links). Anschließend wurden die Fraktionen, welche die Ubiquitinketten enthielten gesammelt und mittels Gelfiltration nach ihrer Größe aufgetrennt. Das SDS-Gel der Fraktionen zeigt, dass die Ubiquitinketten (Ub<sub>2</sub>, Ub<sub>3</sub> und Ub<sub>4</sub>) sowie das nicht reagierte Mono-Ubiquitin mittels Gelfiltration voneinander getrennt werden konnten (siehe Abb. 5.11 a, rechts; b).

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der einzelnen fluoreszenzmarkierten Ubiquitinketten wurden die Fluoreszenzanisotropie-Titrations mit UBXD1-wt durchgeführt. Die Dissoziationskonstante von Atto594-Mono-Ubiquitin-M1C ist konsistent mit den bisherigen Messungen. Mit steigender Kettenlänge steigt der K<sub>D</sub>-Wert der Bindung von 21-25 µM für Mono- und Di-Ubiquitin bis auf 39 µM bei Tri-Ubiquitin (siehe Abb. 5.11 c), wohingegen Tetra-Ubiquitin gar nicht mehr gebunden wird. Die Messungen zeigen, dass UBXD1 kurze Ubiquitinketten (Ub<sub>1-3</sub>) bevorzugt. Die zuvor mittels ITC bestimmte Stöchiometrie von 1:1 mit Mono-Ubiquitin und die bevorzugte Bindung kurzer Ubiquitinketten unterstützt die Hypothese, dass UBXD1 nur eine Bindestelle für Ubiquitin besitzt und somit auch bei Ubiquitinketten nur ein Ubiquitin binden kann.

Die Bindung kurzer Ubiquitinketten durch UBXD1 als p97 Cofaktor steht mit der biologischen Funktion des Proteins im Einklang, da lange Ubiquitinketten zur Prozessierung durch einen p97-beteiligten Entfaltungskomplex durch deubiquitylierende Enzyme auf kürzere Ketten zurückgeschnitten werden<sup>113</sup>.



**Abb. 5.11 Interaktion von UBXD1 mit K48-Polyubiquitinketten.**

**a:** Die Kationenaustauschchromatographie zeigt einen großen Peak bei 80-100 % Elutionspuffer, welche das gebildete Polyubiquitin sowie das nicht umgesetzte Mono-Ubiquitin enthalten (links). Durch die Gelfiltration konnten die gebildeten Ketten ihrer Größe nach getrennt werden (rechts.) **b:** Die Aufreinigung wurde mittels SDS-Gel kontrolliert. Das SDS-Gel der Polyubiquitinsynthese und Aufreinigung der Ubiquitinketten zeigen, Ubiquitinketten gebildet wurden und durch die Kationenaustauschchromatographie von den E1- und E2-Enzymen getrennt wurden. Durch die anschließende Gelfiltration konnten die Ketten ohne Verunreinigungen nach ihrer Größe hin getrennt werden (SDS-Gel links, Fluoreszenzscan rechts). **c:** Anisotropiemessungen von Atto594-Ubiquitinketten und -Mono-Ubiquitin mit UBXD1-wt (Dreifachbestimmung). UBXD1 unterscheidet dabei zwischen verschiedenen Kettentypen und die Dissoziationskonstante steigt mit der Länge der Ubiquitinkette.

## 5.5 Anordnung der C-terminalen Region von UBXD1 an p97

UBXD1 ist als p97-Cofaktor einzigartig, da es an zwei Bindestellen von p97 bindet<sup>49</sup>. UBXD1 bindet mit seinem N-Terminus (1-133) an die N-Domäne (1-199,<sup>48</sup>) von p97, wohingegen die PUB-Domäne (150-264) den C-Terminus von p97 (796-806,<sup>51</sup>) bindet und somit die C-terminale UBX-Domäne wahrscheinlich in räumliche Nähe zur D2-Domäne und den Ausgang der Pore des p97 Hexamers bringt.

Diese Hypothese wurde durch zwei verschiedene Ansätze untersucht: Erstens durch die Untersuchung des Arrangements der Domänen von UBXD1 an p97 mittels Crosslinking / LC-MS. Zweitens, durch eine detaillierte biochemische Charakterisierung durch Messungen der Dissoziationskonstanten mit unterschiedlich trunkierten Konstrukten und Mutanten beider Proteine. Im folgenden Kapitel wurden die folgenden Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt:

Interne BC-Nummer	Protein (Aminosäuregrenzen)	
1133	p97-wt (1-806)	
1249	p97-ΔD2-C (1-480)	
1280	p97-ΔC (1-766)	
1281	UBXD1-wt (1-441)	
1309	UBXD1-VIMx (1-441)	
1330	UBXD1-ΔUBX-C (1-332)	
1353	UBXD1-Linker (263-330)	
1417	UBXD1-Linker-UBX-C (269-441)	
1470	p97-N (1-199)	

Genauere Details der Plasmide sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

### 5.5.1 Proteinreinigung von p97-Konstrukten

Die verwendeten p97-Plasmide codieren für Fusionsproteine mit einem Hexahistidine-tag und wurden in *E. coli* überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt (siehe Methode 4.4.1 und Beispielreinigung Anhang 12.1.3).

### 5.5.2 Crosslinking zeigt eine räumliche Nähe zur p97-D2-ATPase-Domäne

Um die Anordnung von UBXD1 auf p97 und insbesondere die Platzierung der UBX-Domäne zu untersuchen, wurden die Interaktionen zwischen UBXD1 und p97 durch chemisches Crosslinking mit DSSO fixiert und die kovalenten Verknüpfungen nach Verdau mit Lys-C- und Trypsin-Protease mittels LC-MS analysiert. Es wurden Crosslinks zwischen dem N-Terminus von UBXD1 (K66) und der N-/D1-Domäne von p97 (K211, K386) nachgewiesen, was zur bereits publizierten UBXD1-N:p97-N-Interaktion dieser Regionen passt (siehe Abb. 5.12 a und Tab. 12.5). Da p97-C keine DSSO-reaktiven Aminosäuren (K, S, T, Y) enthält, konnten in diesem Bereich keine Crosslinks zur UBXD1-PUB Domäne nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesen bekannten Wechselwirkungen crosslinkt der Linker mit Aminosäuren der D2-Domäne von p97 (481-766). Intramolekulare Crosslinks zwischen den Aminosäuren der UBXD1-PUB-Domäne mit der Linker Region und der UBX-Domäne (T263 zu K269; K166 zu K269, K320, K325, K333 und Y334; K172 zu K325; siehe Tab. 12.5) zeigen, dass diese intramolekulare Wechselwirkung bei Bindung an p97 bestehen bleibt.

Da einige Interaktionen / interagierende Bereiche im p97:UBXD1-Komplex durch DSSO aufgrund fehlender reaktiver Aminosäuren und nicht optimaler räumlicher Abstände (12 Å, siehe Erklärung 5.3.3), nicht erfasst werden können, wurde zusätzlich ein photo-reaktives Crosslinking mit den Photo-Aminosäuren photo-Leucin (pL) und photo-Methion (pM) angereichertes p97 durchgeführt. Durch die Zugabe der reaktiven Aminosäuren ins Kulturmedium werden pL und pM anstelle von Leucin und Methion in p97 eingebaut. Die LC-MS Analyse der verdauten Peptide zeigt, dass es unterschiedliche Crosslinks von pM740, welches sich am Boden der zylindrischen D2-Domäne im p97 Hexamer befindet, zu den Aminosäuren von UBXD1-PUB (V175), dem UBXD1-Linker (L306, R332) und der UBX-Domäne (Y336, L359) (Abb. 5.12 a).

Zusammengenommen bestätigen die Daten vom Crosslinking des UBXD1:p97 Komplexes, dass das PUB-Linker-Modul auch dann seine kompakte Anordnung beibehält, wenn es an p97 bindet. Mit der Bindung von UBXD1-PUB an p97-C und den zusätzlichen Kontakten zwischen dem Linker von UBXD1 und der D2-ATPase Domäne von p97 unterstützt dies ein Strukturmodell, in dem sich die UBX-Domäne in der Nähe des C-terminalen Ausgangs der Pore vom p97 Hexamer befindet.

### 5.5.3 Biochemische Charakterisierung der Bindung von UBXD1 an die D2-Domäne

Da das Arrangement dieser Multidomänenproteine UBXD1 und p97 sehr komplex ist, sollten nun die durch XL-MS gefundenen Kontakte durch umfassende Bindungsstudien mit trunkierten und mutierten Konstrukten beider Proteine bestätigt werden. Eine mögliche Interaktion zwischen UBXD1-Linker-UBX-C (265-441) mit der D2-Domäne von p97 kann

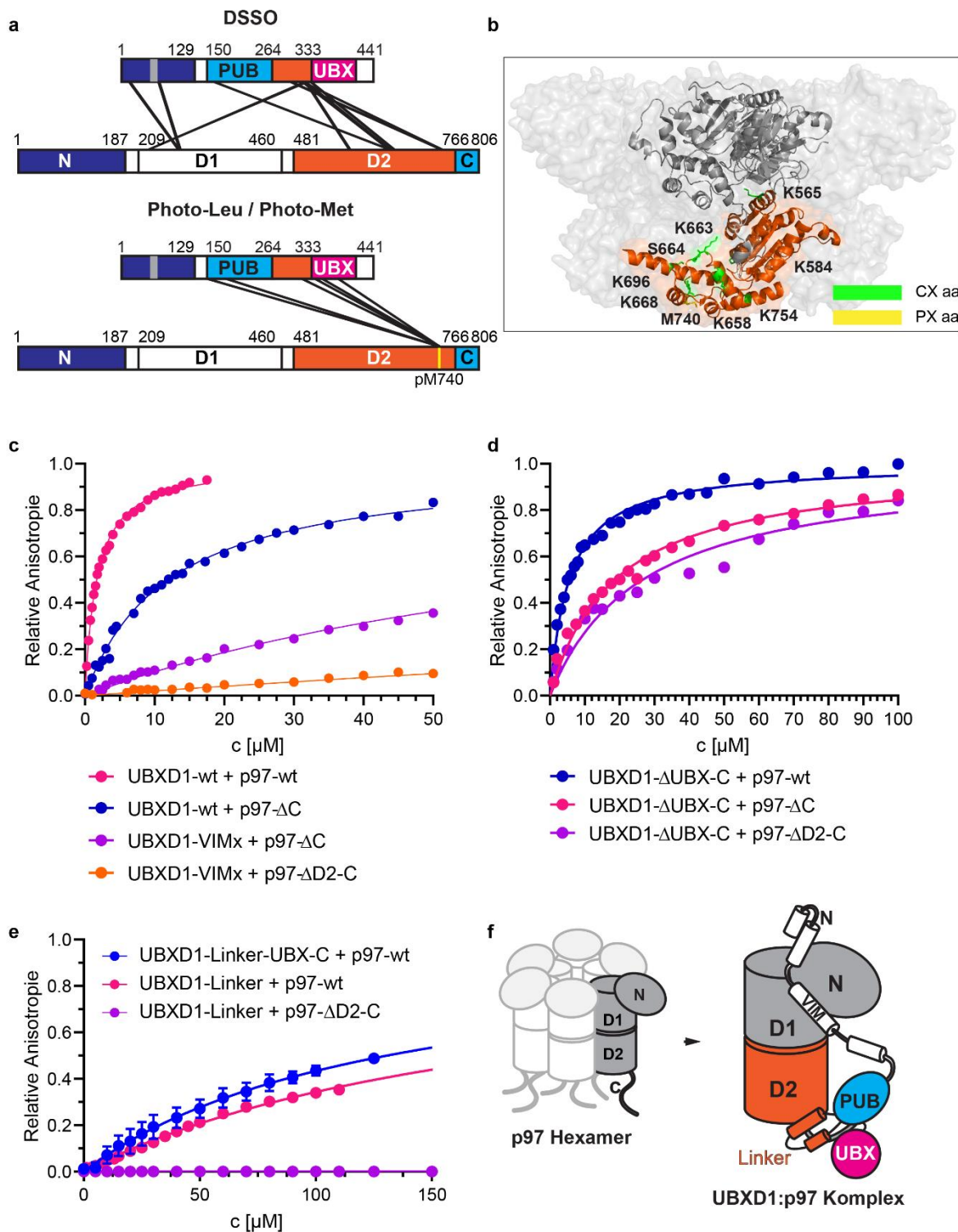


durch die aufeinanderfolgende Eliminierung der bekannten Interaktionen zwischen UBXD1 und p97 untersucht werden. Die Dissoziationskonstanten wurden dabei mittels Fluoreszenzanisotropie bestimmt. Um eine Bindung zwischen UBXD1 und dem C-Terminus und/oder der D2-Domäne von p97 zu eliminieren, wurden p97-Deletionsmutanten (p97- $\Delta$ C, 1-766 und p97- $\Delta$ D2-C, 1-480) verwendet. Zur Unterbindung der Interaktion zwischen UBXD1-N und p97-N wurde eine bereits publizierte Mutation verwendet, bezeichnet als VIMx (DI11/12AA, RL62/63AA, siehe Tab. 5.2 UBXD1-VIMx + p97-N, <sup>48</sup>).

Durch die Eliminierung der p97-C:UBXD1-PUB Interaktion ( $K_D = 11,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ; Tab. 5.2) ergibt sich ein niedrigerer  $K_D$  als die p97-N:UBXD1-N Bindung mit isolierten Domänen ( $K_D = 22 \pm 1 \mu\text{M}$ ; Abb. 5.12 c;  $K_D = 21 \mu\text{M}$  in Trush *et al.* <sup>48</sup>). Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche Wechselwirkungen bestehen. In der Tat konnte mit der zusätzlichen VIMx Mutation, welche die p97-N:UBXD1-N Interaktion unterbindet, dennoch eine Interaktion zwischen UBXD1-VIMx und p97- $\Delta$ C mit einem  $K_D$  von  $87 \pm 1 \mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Durch die Eliminierung beider bekannten Interaktionen muss die bestehende Affinität durch eine zusätzliche, unbekannte Bindung zustande kommen. Durch eine Deletion der p97 D2-Domäne kommt es zu einem hohem Anstieg der Dissoziationskonstante (UBXD1-VIMx + p97- $\Delta$ D2-C,  $K_D = 466 \pm 9 \mu\text{M}$ , Tab. 5.2), was zeigt, dass die unbekannte Bindestelle innerhalb der D2-Domäne liegen muss. Zur weiteren Definition der neuen Interaktion wurde die Bindung einer UBX Deletionsmutante von UBXD1 (UBXD1- $\Delta$ UBX-C, 1-332) mit unterschiedlichen Trunkationen von p97 untersucht (Tab. 5.2, Abb. 5.12 d). Während die Bindung zu p97- $\Delta$ D2-C (1-480) mit der Dissoziationskonstante der isolierten N-Domäne korreliert ( $K_D = 26 \pm 2 \mu\text{M}$ ), verbessert sich die Bindung zu p97- $\Delta$ C ( $K_D = 18,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ) mit der D2-Domäne, was bestätigt, dass UBXD1 noch einen zusätzlichen Kontakt zur D2-Domäne hat.

Die Analyse der Bindung von p97-wt zu weiteren UBXD1 Deletionsmutanten legt nahe, dass der Linker von UBXD1 an die D2-Domäne von p97 bindet. In der Tat lässt sich zeigen, dass sowohl die Linker-UBX-C Domäne (269-441,  $K_D = 131 \pm 14 \mu\text{M}$ ; Tab. 5.2) und der Linker (263-330,  $K_D = 191 \pm 2 \mu\text{M}$ ; Tab. 5.2) an p97 binden. Im Vergleich dazu ist nach der Deletion der D2-Domäne keine Bindung zwischen Linker-UBX-C und p97 mehr nachweisbar. Diese Daten bestätigen, dass der Linker von UBXD1 eine zusätzliche Bindung zur D2-Domäne von p97 eingeht.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse des Crosslinkings und die biochemische Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen UBXD1 und p97, dass die UBXD1-UBX-Domäne als Teil des PUB-Linker-UBX Moduls am Boden der p97-D2 Domäne und somit nahe des Ausgangs der p97 Pore lokalisiert ist.



**Abb. 5.12 Biochemische Charakterisierung der UBXD1:p97 Interaktionen.**

**a:** Chemisches Crosslinking (CX) mit DSSO (oben) und photo-reaktives Crosslinking (PX) mit photo-Leu/photo-Met-p97 (unten) vom UBXD1:p97 Komplex. Identifizierte Crosslinks sind gerade Linien dargestellt (siehe Tab. 12.5 und Tab. 12.6). Das reaktive photo-Met 740 (pM740) ist durch eine gelbe Linie dargestellt. **b:** Gecrosslinkte Aminosäuren vom CX (grün) und PX (gelb) sind in der D2-Domäne eines p97 Protomers hervorgehoben (PDB: 3CF3). **c:** Fluoreszenzanisotropie Titrations von UBXD1-wt (1-441) und -VIMx (1-441, D111/12AA, RL62/63AA) mit p97-wt (1-806), - $\Delta$ C (1-766) und - $\Delta$ D2-C (1-480) in Dreifachbestimmung. **d:** Fluoreszenzanisotropie-Titration der UBX Deletionsmutanten UBXD1- $\Delta$ UBX-C (1-332) mit p97-wt (1-806), - $\Delta$ C (1-766) und - $\Delta$ D2-C (1-480) in Dreifachbestimmung. **e:** Anisotropie von Linker-UBX-C und Linker mit p97. **f:** Vorgeschlagene Anordnung der C-terminalen Domänen von UBXD1 (PUB, Linker und UBX-Domäne) an p97.




**Tab. 5.2 Dissoziationskonstanten zwischen UBXD1 und p97.**

Alle Dissoziationskonstanten wurden zu besserer Vergleichbarkeit mit einer Stöchiometrie von 1:1 berechnet (Replikate \*n = 1, <sup>▲</sup>n = 3; <sup>■</sup>Verdrängungstitration). Interagierende Bereiche sind in beiden Proteinen farblich markiert (VIM Helix: grau; N-Terminus / N-Domäne: dunkelblau; PUB-Domäne / C-Terminus: blau; *UBX extension* / D2-Domäne: orange; UBX-Domäne / Ubiquitin: pink). VIMx Mutationen (DI11/12AA, RL62/63AA) sind mit einem roten X markiert. n.b. = keine Bindung nachweisbar.

UBXD1	p97	Dissoziationskonstante $K_D$ [ $\mu$ M]	Interagierende Domänen (Oben: UBXD1, unten: p97)
Wildtyp (1-441)	Wildtyp (1-806)	$1,64 \pm 0,03 \mu\text{M}^{\Delta}$ ( $R^2 = 0,9973$ )	
Wildtyp (1-441)	$\Delta$ C (1-766)	$1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}^{\Delta\blacksquare}$ ( $R^2 = 0,9870$ )	
Wildtyp (1-441)	N (1-199)	$22 \pm 1 \mu\text{M}^{\Delta}$ ( $R^2 = 0,9972$ )	
VIMx (1-441)	N (1-199)	n.b.*	
VIMx (1-441)	$\Delta$ C (1-766)	$87 \pm 1 \mu\text{M}^*$ ( $R^2 = 0,9945$ )	
VIMx (1-441)	$\Delta$ D2-C (1-480)	$466 \pm 9 \mu\text{M}^*$ ( $R^2 = 0,9697$ )	
$\Delta$ UBX-C (1-332)	Wildtyp (1-806)	$5,5 \pm 0,2 \mu\text{M}^{\Delta}$ ( $R^2 = 0,9887$ )	
$\Delta$ UBX-C (1-332)	$\Delta$ C (1-766)	$18,6 \pm 0,7 \mu\text{M}^{\Delta}$ ( $R^2 = 0,9887$ )	
$\Delta$ UBX-C (1-332)	$\Delta$ D2-C (1-480)	$26 \pm 2 \mu\text{M}^{\Delta}$ ( $R^2 = 0,9597$ )	
eUBX-C (269-441)	Wildtyp (1-806)	$131 \pm 14 \mu\text{M}^{\Delta}$ ( $R^2 = 0,9976$ )	
Linker (263-330)	Wildtyp (1-806)	$191 \pm 2 \mu\text{M}^*$ ( $R^2 = 0,9960$ )	
Linker (263-330)	$\Delta$ D2-C (1-480)	n.b.*	

## 5.6 Einfluss auf die ATPase Aktivität von p97

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der isolierte UBXD1 N-Terminus einen inhibierenden Effekt auf die ATPase-Aktivität von p97 hat<sup>48</sup>, dabei fixiert der N-Terminus durch seine Bindung die p97-N-Domäne in einer *down*-Konformation, was die Umsetzung von ATP verhindert. Dies wirft die Frage auf, ob die Inhibition durch UBXD1-N in einem funktionellen Entfaltungskomplex bestehen bleibt oder ob UBXD1 ganz oder teilweise von p97 dissoziiert, um effiziente Substratentfaltung zu gewährleisten. Wie bereits beschrieben, gewinnt p97 seine Energie zur Entfaltung polyubiquitinylierter Substrate durch ATP-Hydrolyse<sup>60</sup>. Dabei ist die D2-Domäne verantwortlich für die Hauptenzymaktivität unter physiologischen Temperaturen, während die D1-Domäne an der Regulation der hitzeinduzierten ATPase-Aktivität beteiligt ist<sup>57</sup>. Seine diversen Rollen erfüllt p97 in Kombination mit unterschiedlichen Cofaktoren. UBXD1 spielt unter anderem in Zusammenhang mit YOD1 und PLAA im ELDR-Komplex (*Endo-Lysosomal Damage Response*) eine Rolle, welcher für die Prozessierung K48-ubiquitinylierter Substrate einer Subpopulation von beschädigten Lysosomen verantwortlich ist, um die Bildung von Autophagosomen zu unterstützen<sup>21,114</sup>. Da die bisherigen Untersuchungen zur Inhibition der ATPase-Aktivität durch den isolierten UBXD1 N-Terminus in Abwesenheit von Substrat durchgeführt wurden, wurde der Effekt von UBXD1 auf die Enzymaktivität von p97 in einem Entfaltungskomplex mit dem Substratadapterkomplex Ufd1:Npl4 als Modell untersucht. Im folgenden Kapitel wurden die folgenden Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt:

Interne BC-Nummer	Protein (Aminosäuregrenzen)	
1133	p97-wt (1-806)	
1281	UBXD1-wt (1-441)	
1309	UBXD1-VIMx (1-441)	

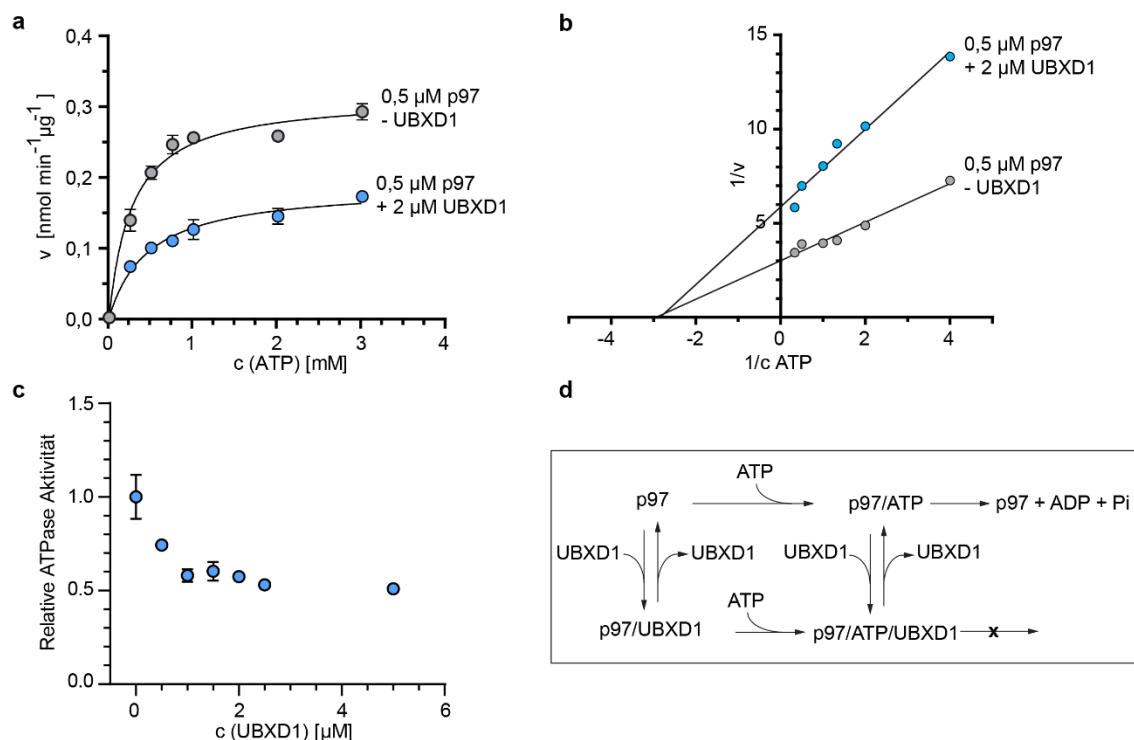
Ufd1:Npl4  
Proteine wurden bereitgestellt von Dr. Matthias Kracht,  
AG Prof. Meyer, Universität Duisburg-Essen

Genauere Details der Plasmide sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

### 5.6.1 UBXD1 ist ein nicht-kompetitiver ATPase-Inhibitor für p97

Die genaue Untersuchung der Inhibition der Enzymaktivität durch UBXD1 kann Einblicke in den funktionellen Mechanismus der UBXD1-p97-Interaktion geben, dafür wurde zu Beginn durch Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt, welcher Inhibitionsmechanismus für das UBXD1-Protein zutrifft. Für die Messungen wurde der ATPase-Aktivitätsassay von Song *et al.* und deren optimalen Messbedingungen übernommen<sup>57</sup>. Die Messungen der Michaelis-Menten-Kinetik für den ATP-Umsatz zeigen, dass das Aktivitätsmaximum bei 3 mM Substrat erreicht wird, was mit den veröffentlichten Daten von Song *et al.* (Aktivitätsmaximum bei 3 mM ATP) übereinstimmt. Durch die Zugabe von 2  $\mu$ M UBXD1 verringert sich die Maximal-Geschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) von  $0,31 \pm 0,01$  nmol/min/ $\mu$ g auf  $0,19 \pm 0,01$  nmol/min/ $\mu$ g, die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) steigt leicht von  $0,27 \pm 0,05$  mM (Bereich: 0,22 - 0,32 mM) auf  $0,47 \pm 0,08$  mM (Bereich: 0,39 – 0,56 mM) mit der Zugabe von UBXD1 (siehe Abb. 5.13 a). Ohne die Zugabe von UBXD1 stimmt der  $K_M$  von 0,27 mM mit der bereits publizierten Michaelis-Menten-Konstante von Song *et al.* mit  $\sim 0,33$  mM überein. Die Maximalgeschwindigkeit weicht mit  $0,31$  nmol Pi/min/ $\mu$ g etwas von dem veröffentlichten Wert  $\sim 0,52$  nmol Pi/min/ $\mu$ g ab, da die ATPase-Aktivität von der jeweiligen Proteincharge und dem Expressionssystem abhängt. In einer doppeltreziproken Darstellung lassen sich die jeweiligen der Michaelis-Menten-Kurven in An- und Abwesenheit von UBXD1 als Gerade abbilden, wobei der x-Achsenabschnitt ( $-1/K_M$ ) beider Enzymkinetiken identisch ist. Lediglich der y-Achsenabschnitt ( $1/v_{\max}$ ) verändert (siehe Abb. 5.13 b) sich. Der unveränderte x-Achsenabschnitt weist darauf hin, dass der  $K_M$  unverändert bleibt. Der höhere y-Achsenabschnitt unter UBXD1 Zugabe zeigt, dass sich der  $v_{\max}$ -Wert erniedrigt. Demnach handelt es sich bei UBXD1 um einen nicht-kompetitiven Inhibitor, was dazu führt, dass durch die Anwesenheit von UBXD1 die Konzentration des funktionsfähigen p97 verringert wird (siehe Abb. 5.13 d)<sup>6</sup>.

Aus  $K_M$  und  $v_{\max}$  lässt sich die Inhibitorkonstante ( $K_i$ ) für UBXD1 zu  $1,84 \mu$ M berechnen (siehe Anhang Tab. 12.9). Diese stimmt mit der Dissoziationskonstante für den UBXD1:p97 Komplex von  $1,64 \pm 0,03 \mu$ M (Fluoreszenzanisotropie) und  $1,1 \pm 0,1 \mu$ M (Verdrängungstitration) überein (siehe Tab. 5.2). Zur Bestimmung der maximalen Inhibition, die durch UBXD1 erreicht werden kann, wurde die p97-Enzymaktivität der Konzentrationsreihe von UBXD1 von 0 bis 5  $\mu$ M bestimmt. UBXD1 inhibiert die ATPase-Aktivität von p97 bis zu einer Restaktivität von 51 %. In Trusch *et al.*<sup>48</sup> wurde bereits beschrieben, dass der N-Terminus von UBXD1 (1-199) durch die Bindung an p97 die Enzymaktivität auf 41 % inhibiert, wobei nur der isolierte N-Terminus verwendet wurde.



**Abb. 5.13 Michealis-Menten-Kinetik des ATP-Umsatzes von p97 mit UBXD1.**

**a:** Michaelis-Menten-Kinetik der ATPase-Aktivität von 0,5 µM p97 +/- 2 µM UBXD1. Durch die Zugabe von UBXD1 wird  $v_{\max}$  herabgesetzt. Dreifachbestimmung. **b:** Die Doppeltreziproke Darstellung zeigt, dass sich der x-Achsenabschnitt durch die Zugabe nicht ändert, dafür aber der y-Achsenabschnitt durch die Zugabe von UBXD1 höher ist. Das bedeutet, dass UBXD1 ein nichtkompetitiver Inhibitor für p97 ist. **c:** Relative ATPase Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration an UBXD1. Dreifachbestimmung. **d:** Mechanismus eines nichtkompetitiven Inhibitors. Der Reaktionsverlauf zeigt, dass das UBXD1 sowohl an das freie p97, als auch an den p97:ATP Enzym-Substratkomplex bindet.

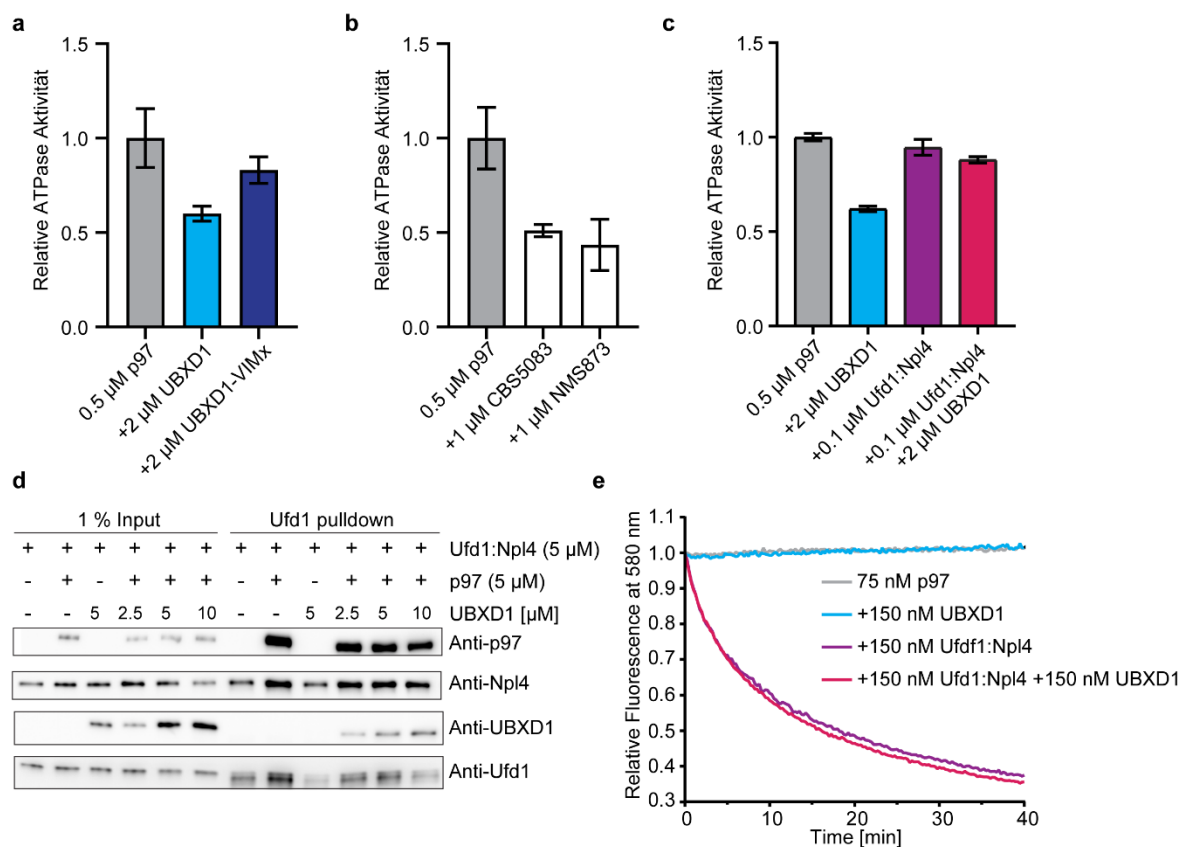
### 5.6.2 UBXD1 beeinflusst die ATPase-Aktivität während des Entfaltungprozesses ubiquitylierter Substrate nicht

Um weitere Details von UBXD1 als Cofaktor von p97 und die Rolle als Ubiquitinbindungspartner und nicht-kompetitiver Inhibitor im Zusammenspiel mit Substratanliefernden Cofaktoren zu untersuchen, wurde ein Entfaltungskomplex aus p97 mit dem Substratadapterkomplex Ufd1:Npl4 als Modellkomplex verwendet und die Inhibition von UBXD1 mittels ATPase-Aktivitätsassay und die Bindung der drei Cofaktoren an p97 mittels Immunoprecipitation gemessen.

Als Vergleichsmessungen wurden zu Beginn UBXD1 und UBXD1-VIMx auf ihre Funktion als Inhibitor untersucht, dabei zeigt UBXD1, dass der Wildtyp wie bereits zuvor beschrieben die ATPase Aktivität auf  $0,60 \pm 0,03$  inhibiert, wohingegen die UBXD1-VIMX Mutante, welche nicht mehr an die N-Domäne von p97 bindet, eine reduzierte Inhibition mit einer p97-Enzymaktivität von nur  $0,83 \pm 0,06$  zeigt (siehe Abb. 5.14 a). Die Messung bestätigt ebenfalls, dass der N-Terminus die Hauptaufgabe der Inhibition übernimmt. Als Positivkontrollen wurden die beiden chemischen Inhibitoren CB-5083 und NMS873 mit 2-fachem Überschuss relativ zu p97 eingesetzt (CB-5083:  $0,51 \pm 0,03$  und NMS873:  $0,43 \pm 0,12$ ; siehe Abb. 5.14 b). Um zu untersuchen, ob UBXD1 in Anwesenheit eines Substratadapterkomplexes wie

Ufd1:Npl4 die ATPase-Aktivität von p97 inhibiert, wurde diese mit unterschiedlichen Kombinationen mit UBXD1 und Ufd1:Npl4 gemessen. Die Messung mit UBXD1 alleine stimmt erneut mit den vorherigen Messungen überein (Relative ATPase-Aktivität:  $0,62 \pm 0,02$ ). Im Vergleich dazu zeigt UBXD1 eine viel niedrigere Inhibition der Enzymaktivität in Anwesenheit von Ufd1:Npl4 (Relative ATPase Aktivität:  $0,88 \pm 0,02$ ) (siehe Tab. 12.10). Dieser Effekt entspricht der schwächeren Inhibierung der UBXD1-VIMx Mutante, was impliziert, dass die Bindung zwischen dem UBXD1-N-Terminus und der N-Domäne von p97 durch die Anwesenheit von Ufd1:Npl4 gelöst wird. Um zu untersuchen, ob nur der N-Terminus von UBXD1 oder das gesamte UBXD1-Protein durch die Anwesenheit von Ufd1:Npl4 von p97 verdrängt wird, wurde eine Immunopräzipitation von gereinigtem UBXD1-, p97- und Ufd1:Npl4-Protein mit einem Anti-Ufd1 Antikörper durchgeführt. Bemerkenswerterweise wurde UBXD1 zusammen mit Ufd1:Npl4 isoliert, wenn p97 anwesend ist und in zunehmenden Mengen, wenn sich die UBXD1-Konzentrationen verdoppelten. Dies zeigt, dass UBXD1 nicht mit Ufd1:Npl4 konkurriert, sondern dass UBXD1 und Ufd1:Npl4 gleichzeitig an p97 binden können. Zur weiteren Kontrolle der Annahme, dass UBXD1 weiterhin in Anwesenheit von Ufd1:Npl4 über die PUB-Domäne und den Linker an p97 gebunden ist, sollte die Immunopräzipitation mit p97- und UBXD1-Mutanten und Deletionen (UBXD1-VIMx, p97- $\Delta$ C) wiederholt werden.

Um zu bestätigen, dass UBXD1 den p97-vermittelten Proteinentfaltungsprozess nicht stört, wurde ein zuvor etablierter Entfaltungsassay von Dr. Matthias Kracht (AG Prof. Meyer, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt, der auf dem Verlust der EOS-Fluoreszenz von einem polyubiquitylierten Modells substrat basiert. Dabei wird das fluoreszierende Protein EOS über Fusionsreaktionen mit Polyubiquitin markiert und dient somit als Substrat. Durch die Polyubiquitylierung wird das EOS als Substrat erkannt und durch die Zugabe an ATP startet der Ufd1:Npl4:p97-Komplex die Entfaltung. Bei der Entfaltung des fluoreszierenden Substrates sinkt die Fluoreszenzintensität. Zur Vergleichbarkeit wurden dieselben Proteine verwendet, wie für den ATPase Aktivitätsassay in Abb. 5.14 c. Tatsächlich zeigte der Ufd1:Npl4:p97-Komplex unabhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit von UBXD1 die gleiche Entfaltungsgeschwindigkeit, was zeigt, dass UBXD1 die Proteinentfaltung nicht negativ beeinflusst.



**Abb. 5.14 UBXD1 bildet mit p97 und dem Substratadapter Ufd:Npl4 einen ternären Komplex.**












**a:** Effekt von UBXD1-VIMx auf die Inhibierung durch UBXD1. Die VIMx Mutation unterstützt die Ergebnisse, dass der N-Terminus die Enzymaktivität inhibiert. **b:** Kontrollmessungen mit chemischen Inhibitoren von p97: CBS5083 und NMS873. **c:** In Anwesenheit von Ufd1:Npl4 inhibiert UBXD1 nicht die ATPase Aktivität von p97. **d:** Immuniprecipitation mit Anti-Ufd1-Antikörper zeigt, dass UBXD1 und Ufd1:Npl4 simultan an p97 binden können. Dabei zeigt sich das UBXD1 mit steigenden Konzentrationen (2,5, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) nicht mit Ufd1:Npl4 konkurriert. **e:** UBXD1 inhibiert nicht den Entfaltungskomplex p97:Ufd1:Npl4 während der Substratentfaltung. p97 wurde mit den entsprechenden Proteinen und fluoreszierenden Poly-Ub-Eos Substrat inkubiert. Der Verlust an Fluoreszenzsignal spiegelt dabei die Entfaltung des Substrates wieder. Die Entfaltung ist dabei von Ufd1:Npl4 abhängig und wird nicht durch UBXD1 beeinflusst.



## 5.7 UBXD1 interagiert mit dem Proteasomtransportfaktor hHR23

Aufgrund der experimentellen Daten zur räumlichen Orientierung der UBXD1-UBX-Domäne innerhalb des p97:UBXD1-Komplexes an der zweiten ATPase-Domäne D2 und somit am C-terminalen Bereich des p97-Hexamers besteht die Möglichkeit, dass UBXD1 ubiquitylierte Substrate nach erfolgter Entfaltung durch p97 für einen nachfolgenden Prozess bindet.

Als p97-Cofaktor kann die PNGase (*Peptide:N-glycanase*) über ihre PUB-Domäne an die UBL (*Ubiquitin-like*)-Domäne des Proteasomtransportfaktors humanes HR23 (hHR23) binden<sup>89,115</sup>. Aufgrund der Strukturhomologie zwischen den PUB-Domänen von UBXD1 und der PNGase, soll eine mögliche Bindung zwischen UBXD1-PUB- und der hHR23-UBL-Domäne untersucht werden. Da von beiden Domänen PUB und UBL eine NMR-Struktur und somit die Zuordnung der Signale des Peptidrückgrates vorhanden sind, sollte zu Beginn eine <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC Titration durchgeführt werden, um interagierende Aminosäuren in beiden Domänen zu identifizieren. Sollte eine Bindung zwischen UBXD1-PUB und hHR23-UBL möglich sein, sollen die chemischen Verschiebungen für eine folgende *docking*-Rechnung verwendet werden. Die Bindung soll ebenfalls mit der massenspektrometrischen Analyse von Crosslinks untersucht werden. Im folgenden Kapitel wurden die folgenden Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt:

Interne BC-Nummer	Protein (Aminosäuregrenzen)	
1141	UBXD1-PUB (150-264)	
1499	hHR23a-UBL (1-78)	
1500	hHR23b-UBL (1-78)	
1509	UBXD1-PUB-V226A (150-264)	
1510	UBXD1-PUB-L228Q (150-264)	
1511	UBXD1-PUB-E237K (150-264)	
1512	UBXD1-PUB-L242Q (150-264)	
1540	hHR23b-UBL-F69BpA (1-78)	
1543	hHR23b-UBL-Linker-UBA1 (1-228)	
1544	hHR23b-UBA1 (188-228)	
1545	hHR23b-UBA2 (364-404)	

Genauere Details der Plasmide sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

### 5.7.1 Proteinreinigung von hHR23 Fusionsproteinen

Die hHR23b-Konstrukte der Isoform B (UBL, UBA1, UBA2 und UBL-UBA1), sowie die HR23a-UBL-Domäne der Isoform A wurden als GST-*tag* Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert und mittels GSH-Affinitätschromatographie gereinigt. Das GST-*tag* wurde anschließend durch die Zugabe von PreSc entfernt und der freie GST-*tag* vom rekombinanten Protein mittels Gelfiltration getrennt. Das Protokoll der Reinigung ist Kapitel 4.4 und die Ergebnisse sind Abb. 12.4 zu entnehmen.

### 5.7.2 Die PUB-Domäne bindet an die N-terminale UBL-Domäne von hHR23a/b

Für einen detaillierten Blick auf die Proteinbindung zwischen PUB und UBL wurde zu Beginn eine  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $^{15}\text{N}$ -markierter PUB-Domäne mit der HR23a- / HR23b-UBL Domäne, sowie eine Titration mit  $^{15}\text{N}$ -HR23b-UBL mit unmarkierter PUB-Domäne durchgeführt, um die interagierenden Aminosäuren auf beiden Proteinoberflächen zu bestimmen (siehe Abb. 5.15 a-c).

Durch die schrittweise Zugabe an unmarkierter HR23a- oder HR23b-UBL verändert sich die chemische Umgebung der interagierenden Aminosäuren der  $^{15}\text{N}$ -markierten PUB-Domäne, wodurch sich wiederum die Position der zugehörigen Signale im Spektrum proportional zur zugegebenen Menge an Titrand verändern (siehe Abb. 5.15 a, beschriftete Aminosäuren). Bei einer Überlagerung der einzelnen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren mit unterschiedlicher Mengenzugabe an HR23/HR23-UBL scheinen sich daher Signale, die an der direkten Bindung beteiligt sind, von einer Position schrittweise zu einer anderen Position zu bewegen, was man als Verschiebung oder „*Shift*“ bezeichnet.

Im Vergleich kann man erkennen, dass die Isoform b des Proteasomtransportfaktors HR23 eine deutlichere Signaländerung der PUB-Domäne hervorruft, als die UBL-Domäne der Isoform a (siehe Abb. 12.10). Bei beiden Isoformen der UBL-Domäne zeigen übereinstimmend die gleichen Aminosäuren eine Reaktion auf die Zugabe der UBL-Domäne. Diese liegen im Bereich der  $\beta$ -Faltblätter zwischen Aminosäure 190-200 ( $\beta$ 1) und 223-243 ( $\beta$ 2,  $\beta$ 3) von UBXD1-PUB. Über die Gesamtverschiebung  $\delta\Delta$  [ppm] lassen sich die Dissoziationskonstanten einzelner NH-Gruppen von Aminosäuren zur hHR23b-UBL-Domäne berechnen:  $K_D$  T163 = 0,9 mM, K193 = 0,34 mM, V226 = 2,9 mM, L228 = 3,1 mM, E237 = 1,3 mM, L242 = 0,79 mM und S243 = 1,6 mM (siehe Abb. 5.15 d). Da nicht nur eine einzelne Aminosäure für die gesamte Bindung zwischen PUB und UBL verantwortlich ist, wurde ein gemittelter  $K_D$  mit der Standardabweichung des Mittelwertes für die Repräsentation der Bindung von  $K_D = 1,5 \pm 0,9$  mM berechnet. Die ermittelte Dissoziationskonstante zwischen der UBXD1-PUB- und der hHR23b-UBL-Domäne von  $K_D = 1,5$  mM liegt dabei im selben

niedrigen mM-Konzentrationsbereich wie bei der homologen PNGase-PUB-Domäne ( $K_D = 1 \text{ mM}$ )<sup>89</sup>.

In der umgekehrten Titration von <sup>15</sup>N-UBL mit PUB shiften die Signale über eine geringere Distanz, dabei zeigen die Aminosäuren L8, S32, V41, G43, Y48, A49, K51, L59, K60, I64, N68, T75, K76 und K78 eine Interaktion mit der PUB-Domäne (siehe Abb. 12.11).

Um die interagierenden Aminosäuren auf der Oberfläche der PUB-Domäne zu bestätigen, wurden Punktmutationen eingefügt und die <sup>15</sup>N-PUB-V226A, -L228Q, -E237K und -L242Q Mutanten für eine <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Titration mit hHR23b-UBL verwendet. Die Mutanten PUB-V226A und -L228Q zeigten keine Interaktion mehr mit der UBL-Domäne. Bei der Proteinaufreinigung der Mutanten PUB-E237K und -L242Q konnte nicht genügend Material für eine NMR-Probe gereinigt werden.

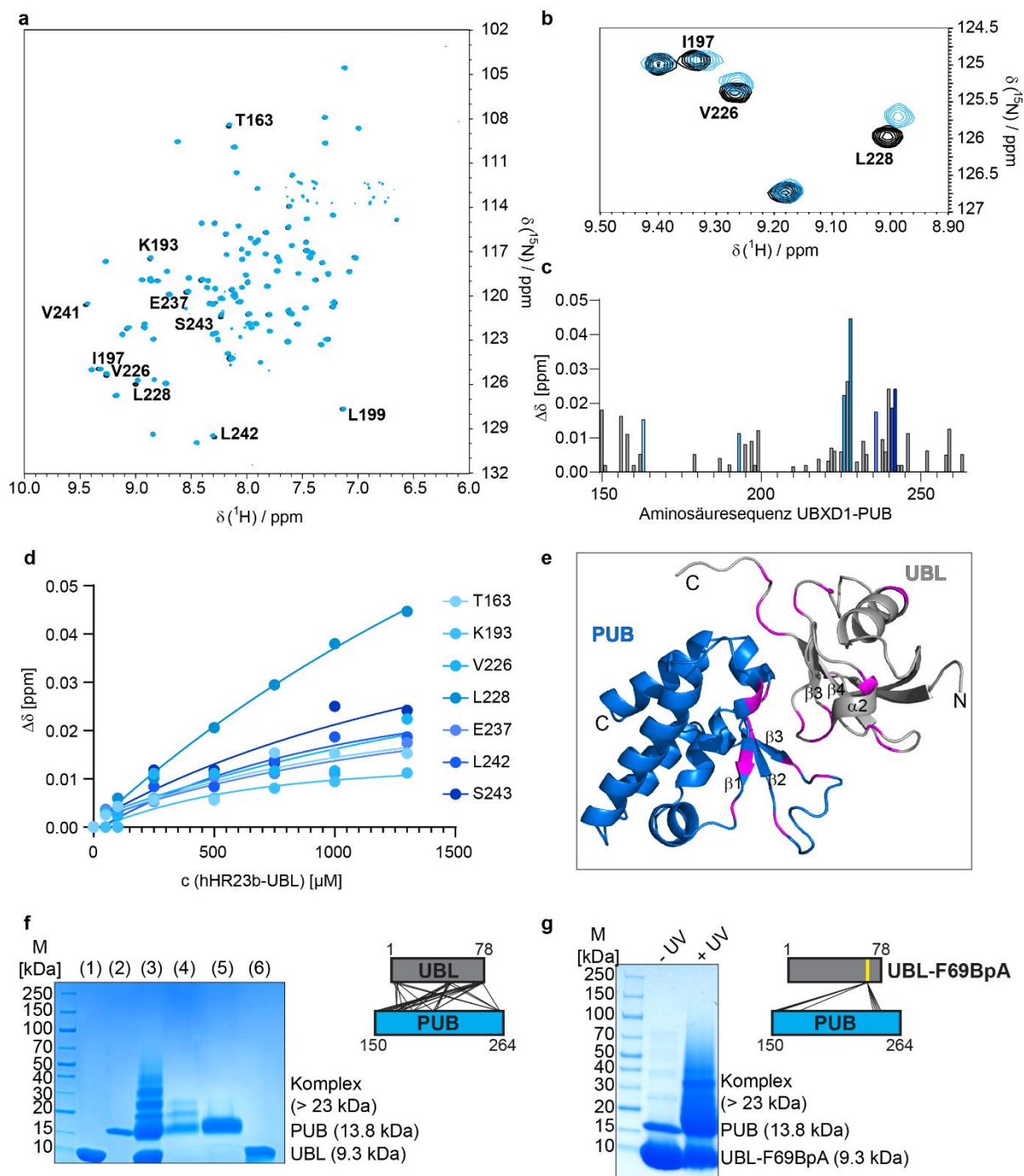
Durch die Bestimmung der interagierenden Aminosäuren auf beiden Proteinoberflächen mittels <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Titrations, wurde ein Strukturmodell aus beiden Proteinstrukturen (UBXD1-PUB pdb 6SAP, hHR23b-UBL pdb 1P1A) mittels HADDOCK berechnet (siehe Abb. 5.15 e,<sup>96,97</sup>), dafür wurden die folgenden Aminosäuren aus den <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Titrations der Domänen verwendet: T163<sub>PUB</sub>, K193<sub>PUB</sub>, I197<sub>PUB</sub>, L199<sub>PUB</sub>, V226<sub>PUB</sub>, L228<sub>PUB</sub>, E237<sub>PUB</sub>, V241<sub>PUB</sub>, L242<sub>PUB</sub>, S243<sub>PUB</sub>, L8<sub>UBL</sub>, S32<sub>UBL</sub>, V41<sub>UBL</sub>, G43<sub>UBL</sub>, Y48<sub>UBL</sub>, A49<sub>UBL</sub>, K51<sub>UBL</sub>, L59<sub>UBL</sub>, K60<sub>UBL</sub>, I64<sub>UBL</sub>, N68<sub>UBL</sub>, T75<sub>UBL</sub>, K76<sub>UBL</sub> und K78<sub>UBL</sub> (siehe Abb. 5.15 e, magenta). Das berechnete Modell der Komplexstruktur zeigt, dass die  $\beta$ -Faltblätter beider Domänen sich im Komplex aufeinanderlegen, was bei der PUB-Domäne den Bereich zwischen K196-L241 ( $\beta$ 1: K196-K198,  $\beta$ 2: F223-L228 und  $\beta$ 3: E237-L241), sowie bei der UBL-Domäne den Bereich zwischen Q44-V74 ( $\beta$ 1: Q4-Y48,  $\beta$ 2: K51-I52 und  $\beta$ 3: F69-V74) abdeckt. Der interagierende Bereich der  $\beta$ -Faltblätter der UBL-Domäne von hHR23 entspricht dabei dem der Bindung zur homologen PNGase-PUB Domäne.

Zur Bestätigung der räumlichen Anordnung beider Domänen zueinander wurden beide Proteine zunächst chemisch mittels DSSO gecrosslinkt und mittels Gelfiltration der gecrosslinkte Komplex aufgereinigt (siehe Anhang 12.6.5, Abb. 12.12). Um erneut die Einschränkungen des chemischen Crosslinkers und deren Reaktivität zu umgehen (Erklärung siehe Kapitel 5.3.3), wurde die hHR23b-UBL-F69BpA-Mutante zum photo-reaktiven Crosslinking in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Crosslinks vom DSSO zeigen die meisten kovalenten Verbindungen vom N-terminalen Bereich der PUB-Domäne zum C-terminalen Bereich der UBL-Domäne entstehen (K166 zu K45, K51, K76, K78; K172 zu K51 und K180 zu K45, K51, K76).

Beim Crosslinking mit UBL-F69BpA lassen sich zwei fokussierte Bereiche erkennen: zum einem crosslinkt F69BpA mit S150, P153, V154, A155, M159 und V175 im N-terminalen, zum anderen mit P236, E238, F239, Y240 und V241 im C-terminalen Bereich der PUB-Domäne, welche den Bereich des zweiten ( $\beta$ 2: F223-L228) und dritten ( $\beta$ 3: E237-V241) der drei interagierenden  $\beta$ -Faltblätter der PUB-Domäne abdeckt. Die gecrosslinkten Aminosäuren (K166, K172, V175, K180) aus dem N-terminalen Bereich liegen dabei in der Nähe zum ersten  $\beta$ -Faltblatt. Zudem fokussieren sich die durch DSSO gecrosslinkten Aminosäuren (K45, K51, K76, K78) bei der UBL ebenfalls auf die  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta$ 1: Q4-Y48,  $\beta$ 2: K51-I52 und  $\beta$ 3: F69-V74).

Die gecrosslinkten Aminosäuren stimmen mit den aus den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrations beider Domänen überein. Bei der UBXD1-PUB-Domäne zeigten die Signale T163, K193, I197, L199, V226, L228, E237, V241, L424 und S243 einer Veränderung ihrer chemischen Umgebung. Dieser Bereich findet sich auch in den Crosslinks der hHR23b-UBL-Domäne wieder: M159, K166, K172, V175, K180 für den Bereich T163-L199 (siehe Abb. 5.15 e,  $\beta$ 1) und die Aminosäuren P236, E338, F239, Y240 und V241 für den Bereich V226-S243 (siehe Abb. 5.15 e,  $\beta$ 2-3). Bei der hHR23b-UBL-Domäne konnten in der HSQC-Titration die Aminosäuren L8, S32, V41, G43, Y48, A49, K51, L59, K60, I64, N68, T75, K76 und K78 identifiziert werden, gecrosslinkt wurden dabei K45, K51 (siehe Abb. 5.15 e,  $\beta$ 3), K76 und K78 (siehe Abb. 5.15 e, C-Terminus).

Sowohl die vorherigen Ergebnisse der NMR-Untersuchungen als auch die LC-MS-Analyse ergeben, dass die Interaktion des Ubiquitinbindungspartners UBXD1 und des Proteasomtransportfaktors hHR23 zwischen den  $\beta$ -Faltblättern der PUB- und der UBL-Domäne stattfindet und somit hHR23 ein weiterer Interaktionspartner von UBXD1 ist.

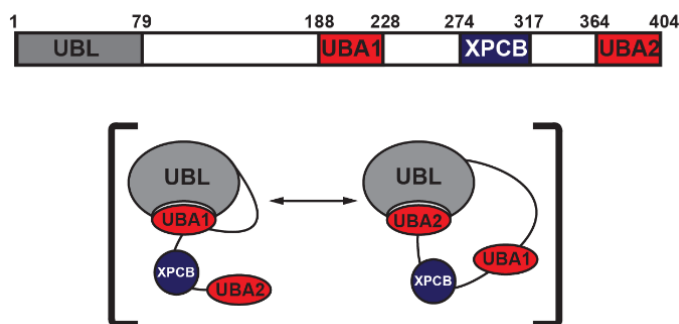


**Abb. 5.15 UBXD1-PUB bindet an die UBL-Domäne des Proteasomtransportfaktors HR23.**

**a:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $^{15}\text{N}$ -PUB mit HR23b-UBL. Die Signale der interagierenden Aminosäuren verschieben sich durch die Zugabe von UBL (beschriftete Aminosäuren) (400  $\mu\text{M}$  UBXD1-PUB: +0  $\mu\text{M}$  UBL, Schwarz; +1,3 mM UBL, blau) **b:** Ausschnitt aus der Titration von PUB mit UBL. **c:** Histogramm vom Gesamtschift ( $\Delta\delta$  [ppm]) gegen die Aminosäuresequenz von UBXD1-PUB aufgetragen. Von den farblich markierten Aminosäuren wird der  $K_D$ -Wert berechnet. **d:** Berechnung der Dissoziationskonstante  $K_D$  einzelner interagierender Aminosäuren von UBXD1 aus dem Gesamtschift.  $K_D$  T163 = 0,9 mM, K193 = 0,34 mM, V226 = 2,9 mM, L228 = 3,1 mM, E237 = 1,3 mM, L242 = 0,79 mM, S243 = 1,6 mM, Mittelwert = 1,5 mM. **e:** Strukturmodell der Komplexstruktur von UBXD1-PUB:hHR23b-UBL. Die *docking*-Rechnung wurde auf Basis der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration (Aminosäuren in magenta) mit HADDOCK durchgeführt. **f:** Chemisches Crosslinking von PUB:UBL mit DSSO. Der gecrosslinkte PUB:UBL-Komplex wurde mittels Gelfiltration von nicht gebundenen Proteinen getrennt: (1) UBXD1-PUB, (2) hHR23b-UBL, (3) mit DSSO gecrosslinkter PUB:UBL-Komplex, Gelfiltration Fraktionen (4) PUB:UBL-Komplex, (5) ungebundene PUB, (6) ungebundene UBL. Chromatogramm der Gelfiltration ist dem Anhang 12.6.5 zu entnehmen. **g:** Gecrosslinkter PUB:UBL-F69BpA-Komplex.

### 5.7.3 Intermolekulare Interaktion von UBL mit UBA1 und UBA2

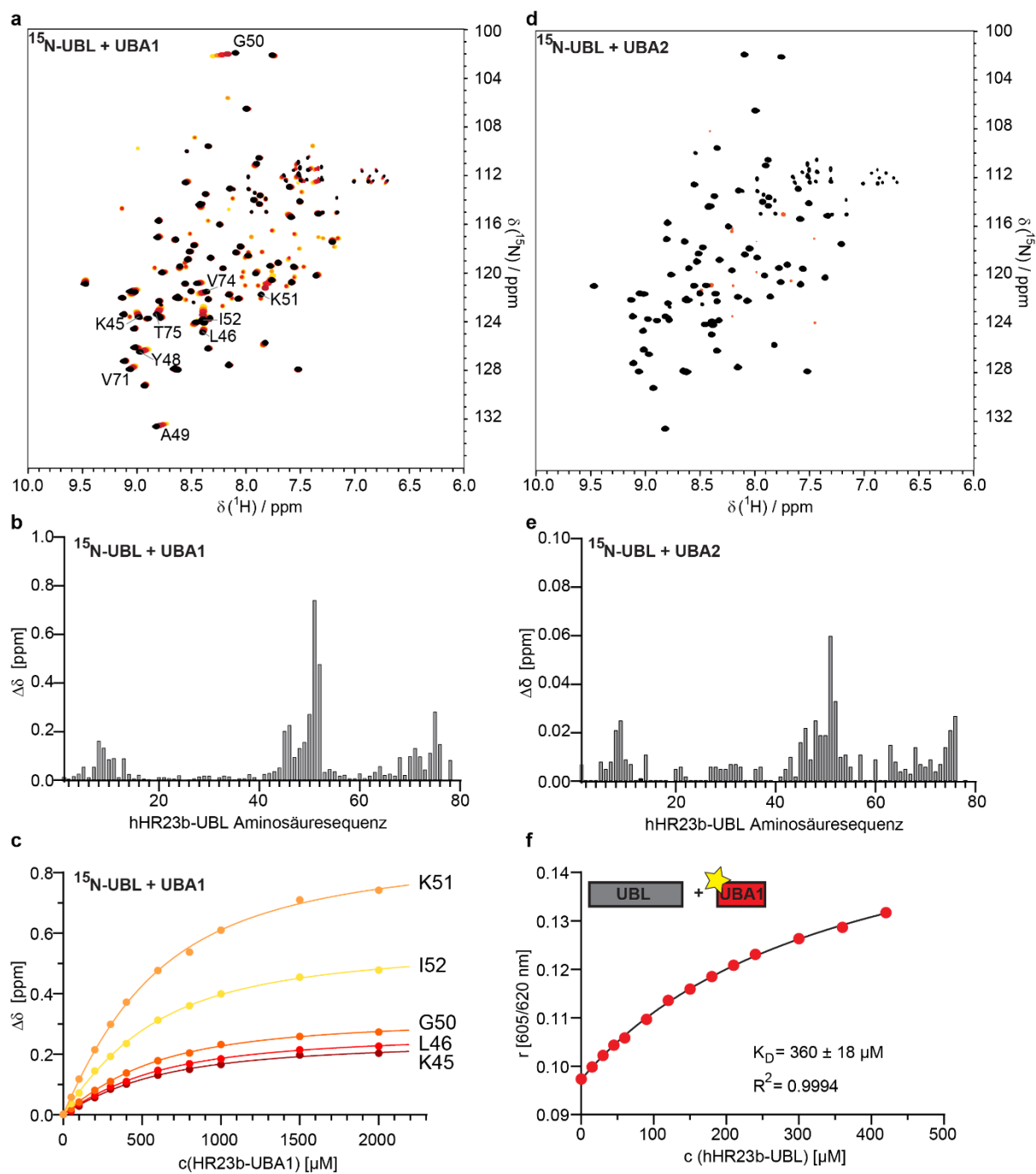
Der Proteasomtransportfaktor hHR23 ist modular aufgebaut und besteht aus einer UBL-Domäne, einer XPCB-Domäne und zwei UBA-Domänen (siehe Abb. 5.16 oben). Er transportiert mit Ubiquitin markierte Proteine zum Abbau zum Proteasome. Die Interaktion von hHR23 mit Ubiquitin erfolgt über die UBA1- und oder UBA2-Domänen<sup>89,116</sup>. Diese UBA-Domänen wechselwirken im Ubiquitin-freiem Zustand intramolekular mit der UBL-Domäne, wodurch das hHR23 in einer geschlossener Konformation vorliegt (siehe Abb. 5.16)<sup>80</sup>.



**Abb. 5.16 Intramolekulare Interaktion von hHR23.**

Domänenarchitektur von hHR23 (oben): UBL: *Ub-like* Domäne, UBA: *Ub-associated* Domäne, XPCB: *xeroderma pigmentosum group binding* Domäne. Durch die intramolekulare Interaktion von UBL mit UBA1/2 liegt hHR23 in einer geschlossenen Konformation vor (unten).

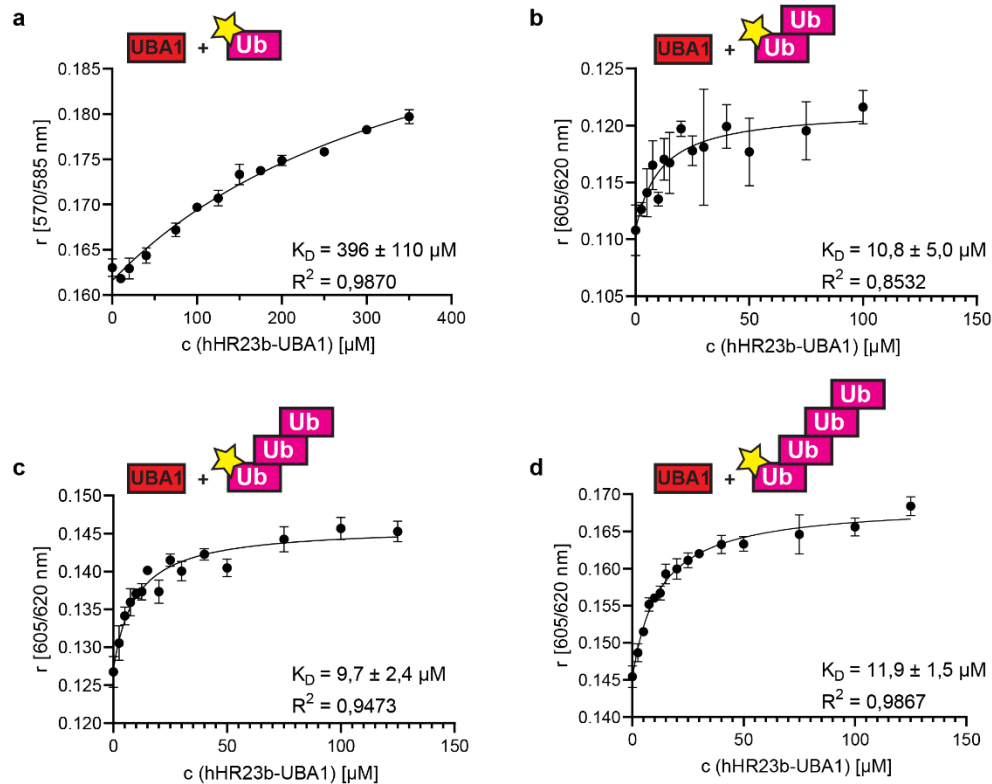
Um zu untersuchen, wie im atomaren Detail die UBA1/UBA2-Domänen mit der UBL-Domäne interagieren, wurden zwei  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrations von  $^{15}\text{N}$ -markierter UBL mit UBA1- und UBA2-Domäne durchgeführt (siehe Abb. 5.17 a, d). Die Zugabe der UBA1-Domäne führte zu stärkeren Signalveränderungen ( $> 0,2$  ppm) als die Zugabe der UBA2-Domäne ( $< 0,06$  ppm) (siehe Abb. 5.17 b, e). Die Aminosäuren K45, L46, A49, G50, K51, I52, V71, V74 und T75 der UBL-Domäne zeigen dabei die stärksten Signalveränderungen und generell fokussiert sich der interagierende Bereich der UBL- zur UBA1-Domäne zwischen Aminosäure 40 und 60, vergleichbar mit der Interaktion zur PUB-Domäne. Aus den chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren lassen sich ebenfalls die Dissoziationskonstanten berechnen, woraus sich wieder ein Mittelwert mit Standardabweichung des Mittelwertes von  $342 \pm 14 \mu\text{M}$  berechnen lässt (siehe Abb. 5.17 c). Zur Bestätigung des gemittelten  $K_D$ s der einzelnen Aminosäure wurde die Dissoziationskonstante mittels Fluoreszenzanisotropie-Titration bestimmt, wobei Atto594-UBA1 verwendet und UBL schrittweise hinzugegeben wurde. Aus der Titration lässt sich ein  $K_D$  von  $360 \pm 18 \mu\text{M}$  berechnen, welcher mit dem zuvor berechneten  $K_D$  der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration übereinstimmt. Da sowohl die hHR23b interne UBA1-Domäne an UBL (siehe Abb. 5.17), sowie die PUB-Domäne von UBXD1 an hHR23b-UBL bindet (siehe Abb. 5.15), kann durch die PUB-Domäne theoretisch ein Wechsel von der geschlossenen zur offenen hHR23b-Konformation erfolgen.



**Abb. 5.17 Intramolekulare Interaktion zwischen der UBL- und der UBA1/UBA2-Domäne.**

**a:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von  $^{15}\text{N}$ -UBL (400  $\mu\text{M}$ ) mit UBA1 (dunkelrot: 100  $\mu\text{M}$ , rot: 300  $\mu\text{M}$ , orange: 600  $\mu\text{M}$ , hellorange: 1 mM, gelb: 2 mM). **b:** Histogramm der chemischen Gesamtverschiebung ( $\Delta\delta$ ) von UBL:UBA1. **c:** Bestimmung der Dissoziationskonstanten einzelner Aminosäuren von UBL nach schrittweiser Zugabe von UBA1. **d:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $^{15}\text{N}$ -UBL (400  $\mu\text{M}$ ) mit UBA2 (400  $\mu\text{M}$ ). **e:** Histogramm der chemischen Gesamtverschiebung ( $\Delta\delta$ ) von UBL:UBA2. **f:** Fluoreszenzanisotropiemessung von Atto594-hHR23b-UBA1 mit UBL zur Bestimmung der Dissoziationskonstante. Die Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Da die Standardabweichung unter 1 % liegt, sind die Fehlerbalken nicht zu erkennen.

Zur Konformationsänderung zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand kann ebenfalls die Bindung der UBA-Domänen an ihren weiteren Bindungspartner, Ubiquitin, beitragen. Um die Dissoziationskonstante zwischen UBA und Ubiquitin, sowie kurzer K48-verknüpfter-Ubiquitinketten (K48-Ub<sub>2</sub>, -Ub<sub>3</sub>, -Ub<sub>4</sub>) im Kontext der Proteinfaltung zu messen, wurden die  $K_D$ s der UBA1-Domäne und Ubiquitin mit Fluoreszenzanisotropie bestimmt.



**Abb. 5.18 Fluoreszenzanisotropie von hHR23b-UBA1 mit Ubiquitin und kurzen K48-Ubiquitinketten.**

**a:** Fluoreszenzanisotropie von Rhodamin-Ubiquitin mit hHR23b-UBA1. Die UBA1-Domäne bindet mit einem  $K_D$  von  $396 \pm 110 \mu\text{M}$  an Mono-Ubiquitin. **b:** Der  $K_D$ -Wert von K48-Di-Ubiquitin mit UBA1 beträgt  $10,8 \pm 5,0 \mu\text{M}$ . **c:** UBA1 bindet mit einer Dissoziationskonstante von  $9,7 \pm 2,4 \mu\text{M}$  an K48-Tri-Ubiquitin. **d:** Das K48-Tetra-Ubiquitin wird mit einem  $K_D$ -Wert von  $11,9 \pm 1,5 \mu\text{M}$  gebunden.

UBA1 bindet mit einem  $K_D$  von  $369 \pm 110 \mu\text{M}$  an Mono-Ubiquitin und damit einen ähnlichen  $K_D$ -Wert, mit dem es an die UBL-Domäne bindet (siehe Tab. 5.3 und Abb. 5.18). Im Gegensatz dazu bindet UBA1 mit einer 34-fach höheren Affinität an kurze K48-verknüpfte Ubiquitinketten (K48-Ub<sub>2</sub>:  $10,8 \pm 5,0 \mu\text{M}$ , K48-Ub<sub>3</sub>:  $9,7 \pm 2,4 \mu\text{M}$  und K48-Ub<sub>4</sub>:  $11,9 \pm 1,5 \mu\text{M}$ ). Die höhere Affinität zu Ubiquitinketten kann auch bei dem hHR23-Homolog Rhp23 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Mono-Ub:  $138 \pm 17 \mu\text{M}$ , K48-Ub<sub>2</sub>:  $7,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ <sup>88</sup>) beobachtet werden. Wie bereits beschrieben binden die UBA-Domänen intramolekular an die UBL-Domäne (siehe Abb. 5.17), die UBA1-Domäne bindet mit einem  $K_D$ -Wert von  $360 \mu\text{M}$  an die UBL-Domäne. Die Bindung von UBA1 an Mono-Ubiquitin liegt dabei im selben mikromolaren Bereich von  $K_D = 396 \mu\text{M}$ . Durch die Verlängerung der Ubiquitinkette auf mindestens Di-Ubiquitin, steigt die Affinität auf einen  $K_D$ -Wert von 9,7-11,9  $\mu\text{M}$ .



**Tab. 5.3 Dissoziationskonste von hHR23b-UBA1 mit Ubiquitin. (^ = Dreifachbestimmung)**  
**Dissoziationskonstante  $K_D$  von hHR23b-UBA1 mit Ubiquitin**

Mono-Ubiquitin	$K_D = 396 \pm 110 \mu\text{M}^\wedge$	$R^2 = 0,9870$
Ub <sub>2</sub> -K48	$K_D = 10,8 \pm 5,0 \mu\text{M}^\wedge$	$R^2 = 0,8532$
Ub <sub>3</sub> -K48	$K_D = 9,7 \pm 2,4 \mu\text{M}^\wedge$	$R^2 = 0,9473$
Ub <sub>4</sub> -K48	$K_D = 11,9 \pm 1,5 \mu\text{M}^\wedge$	$R^2 = 0,9867$

Da hHR23 im Ubiquitin-freien Zustand in einer geschlossenen Konformation vorliegt, könnte die Bindung durch den niedrigen  $K_D$ -Wert der Ubiquitinketten die Konformation öffnen. Ob die Bindung von Ubiquitinketten mit einem niedrigen  $K_D$ -Wert oder auch Mono-Ubiquitin mit einem ähnlichen  $K_D$ -Wert zur UBL:UBA1-Bindung eine Konformationsänderung hervorruft, müsste über weitere Experimente untersucht werden.

#### 5.7.4 Sequentielle Zuordnung von UBA1 mittels 3D-NMR-Spektroskopie

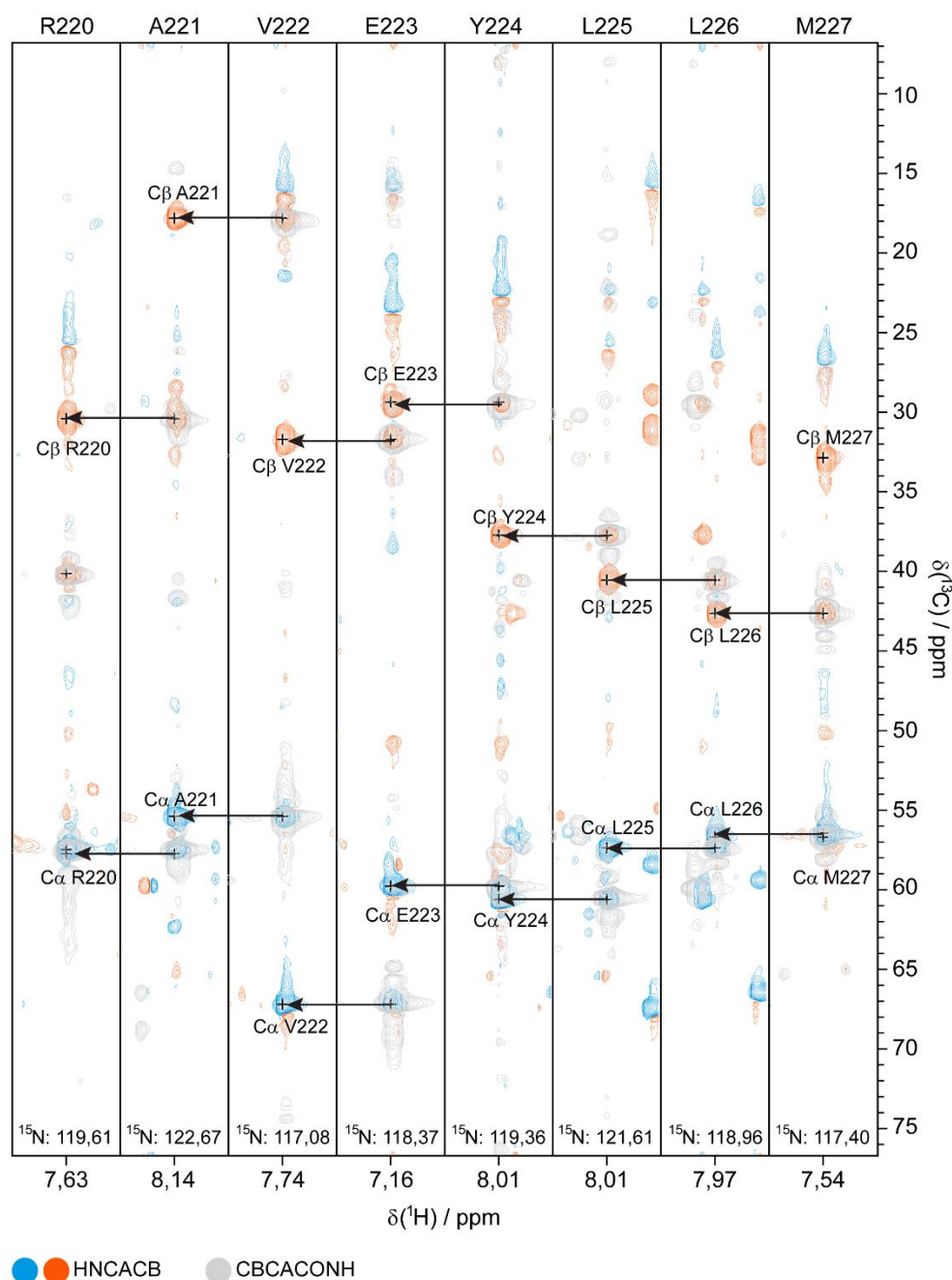
Die Verdrängungen von Bindungspartnern über  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrationsen, sowie die Größe/Konformation des gebildeten Komplexes können über Relaxationsexperimente ( $t_1/t_2$ , hetNOE) gemessen werden. Bei der Aufnahme von zweidimensionalen HSQC-Spektren gibt es eine Größenlimitierung der zu messenden Proteine, daher soll für weiterführende Experimente eine gekürzte Version des Proteasomtransportfaktors hHR23b, bestehend aus der N-terminalen UBL-Domäne und der ersten UBA-Domäne verwendet werden (hHR23b-UBL-Linker-UBA1, Aminosäure 1-228). Die Zuordnung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Signale der UBL-Domäne wurde auf Anfrage freundlicherweise von Kamiya *et al.* bereitgestellt<sup>89</sup>.

Die Zuordnung des Peptidrückgrates der UBA1-Domäne erfolgte durch Aufnahme von 3D-NMR-Spektren und anschließender Zuordnung mit Hilfe der Auswertungssoftware CARA.

Die sequentielle Zuordnung der Atome des Peptidrückgrates eines Proteins ist der erste Schritt der Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie. Sie erfolgt mittels dreidimensionaler Spektren (HNCACB, HN(CA)CO, HNCO, CBCA(CO)NH), bei denen einer entsprechenden  $^1\text{H}_\text{N}$ - $^{15}\text{N}_\text{H}$ -Koordinate in der dritten Dimension die zugehörigen  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffatome der entsprechenden Seitenketten einer Aminosäure zugeordnet werden können. Im gezeigten Beispiel der Aminosäuren R220-M227 von  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBA1, lassen sich im HNCACB-Spektrum pro  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Koordinate, welche als Streifen dargestellt werden, vier Signale erkennen (siehe Abb. 5.19). Die stärkeren Signale gehören zur eigenen Aminosäure (i) und die schwächeren Signale zur N-terminal vorangehenden Aminosäuren (i-1). Durch die den Aufnahmeprozess und die Datenprozessierung lassen sich die Signale der  $\text{C}\alpha$ - und  $\text{C}\beta$ -Atome im Spektrum auch farblich unterscheiden.

Zusätzlich zum HNCACB-Spektrum kann das CBCA(CO)NH-Spektrum zur Unterscheidung der Signale beider Aminosäuren  $i$  und  $i-1$  genutzt werden, da es nur die Signale der vorangehenden Aminosäure ( $i-1$ ) zeigt. Die sequentielle Zuordnung kann in Richtung des N- oder des C-Terminus erfolgen, in Abb. 5.19 ist die Zuordnung in Richtung des N-Terminus dargestellt. Man beginnt von dem schwächeren Signal der vorangehenden Aminosäure ( $i-1$ ) im HNCACB-Spektrum und sucht in der  $^{13}\text{C}$ -Ebene nach einem Signal der gleichen  $^{13}\text{C}$ -Frequenz. Anschließend wird ein Signal in der  $^1\text{H}$ -Ebene gesucht, welche dieselbe  $^1\text{H}$ -Frequenz hat, was dem  $^{13}\text{C}$ -Signal der folgenden Aminosäure entspricht. Dadurch können Aminosäuren sequentiell miteinander verbunden werden und die Signale im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum den entsprechenden Aminosäuren zugeordnet werden. Lassen sich Aminosäuren aufgrund zu schwacher Signale oder Überlagerung mehrerer Signale nicht eindeutig zuordnen, können zusätzliche Spektren (HNCO, HN(CA)CO) zur Hilfe genommen werden. Beide Spektren beruhen auf demselben Prinzip wie das Spektrenpaar aus HNCACB/CBCA(CO)NH, zeigen jedoch nur die CO-Atome der Aminosäuren  $i$  und  $i-1$ .

Im gezeigten Beispiel der Aminosäuren R220-M227 sind die Signale der  $\text{C}\alpha$ -Atome des HNCACB-Spektrum in blau sowie die  $\text{C}\beta$ -Atome in orange dargestellt. Zur Darstellung der Signale der vorangehenden Aminosäuren ( $i-1$ ) wurde das gezeigte Spektrum mit dem CBCA(CO)NH-Spektrum in hellgrau überlagert (siehe Abb. 5.19). Auf der  $^1\text{H}_\text{N}$ - $^{15}\text{N}_\text{H}$ -Koordinate von M227 ( $^1\text{H}$ : 7,54  $^{15}\text{N}$ : 117,40) ist das eigene  $\text{C}\beta$ -Signal deutlich zu erkennen, wohingegen das  $\text{C}\alpha$ -Signal durch das Signal der vorhergehenden Aminosäure überlagert ist. Über die  $^{13}\text{C}$ -Frequenz des  $\text{C}\beta$ -Atoms von L226 konnten beide Aminosäure M227 und L226 verknüpft werden. Trotz der gleichen Aminosäure an Position 225 und 226, waren beide Signale der  $\text{C}\alpha$ - und  $\text{C}\beta$ -Atome gut voneinander getrennt und konnten zugeordnet werden. Die Zuordnung erfolgte weiter in Richtung des N-Terminus und die Aminosäuren wurden durch ihre charakteristischen Verschiebungen, wie das hohe  $\text{C}\beta$ -Atom von Alanin, identifiziert.



**Abb. 5.19** Sequentielle Zuordnung von hHR23b-UBA1 (Aminosäure 188-228).

Zur sequentiellen Zuordnung der Aminosäuren wurden HNCACB- und CBCA(CO)NH-Spektren verwendet. Im HNCACB-Spektrum sind die Signale der Aminosäure  $i$  und der vorangehenden Aminosäure  $i-1$  zu sehen. Die  $\text{C}\alpha$ -Atome sind in blau und die  $\text{C}\beta$ -Atome in orange dargestellt. Im CBCA(CO)NH-Spektrum sind die Signale der vorangehenden Aminosäure  $i-1$  in grau dargestellt.

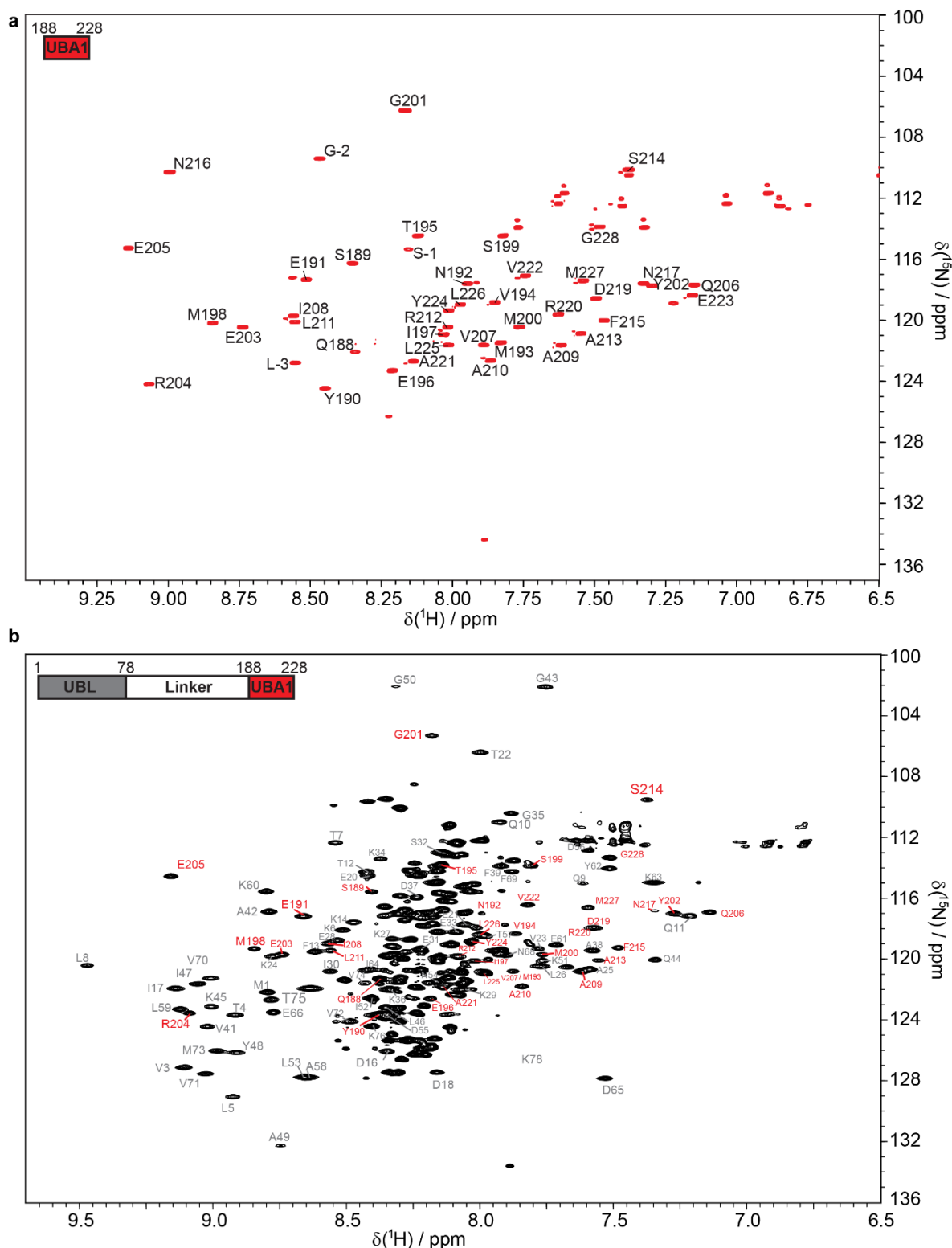
Im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von hHR23b-UBA1<sub>188-228</sub> lassen sich auf der  $^1\text{H}$ -Achse zwischen 6,75 - 9,25 ppm und auf  $^{15}\text{N}$  bei 104 - 134 ppm insgesamt 46 Signale erkennen, dem die 41 Aminosäuren der Domäne, sowie die durch das Klonierungsverfahren zusätzlichen 5 Aminosäuren (GPLGS) vollständig zugeordnet werden konnten (siehe Tab. 5.4). Durch die Zuordnung der Aminosäuren mittels dreidimensionaler NMR-Spektroskopie konnten 97,8 % der  $\text{C}\alpha$ -Atome, 95,6 % der  $\text{C}\beta$ -Atome, sowie 97,8 % der CO-Atome zugeordnet werden. Die genaue Zuordnung jeder Aminosäure ist dem Anhang 12.5, Tab. 12.11 zu entnehmen.

**Tab. 5.4 Anteil zugeordneter Atome von hHR23b-UBA1.**

HN	NH	C $\alpha$	C $\beta$	CO
100 %	100 %	97,8 %	95,6 %	97,8 %

Für die Zuordnung der Signale des hHR23b-UBL-Linker-UBA1 Proteins (Aminosäure 1-228) wurde das Protein  $^{15}\text{N}$ -markiert exprimiert und aufgereinigt. Die Aufnahme des Spektrums (1,1 mM  $^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL-Linker-UBA1, 3 mm Röhrchen, 50 mM NaKPi, pH 6,5, 10 %  $\text{D}_2\text{O}$ ) zeigt eine breite Verteilung der  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{N}_\text{H}$ -Signale zwischen 6,5 - 9,5 ppm auf der  $^1\text{H}$ -Achse, sowie zwischen 96 - 132 ppm auf der  $^{15}\text{N}$ -Achse. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch die Überlagerung der einzelnen Domänen. Die Zuordnung der UBL-Domäne wurde von Kamiya *et al.* übernommen sowie eine Korrektur der  $^{15}\text{N}$ -Ebene vorgenommen und die zuvor zugeordneten Signale der UBA1-Domäne vom vorherigen HSQC-Spektrum übertragen (Abb. 5.20 a). Die gute Dispersion der Signale weist darauf hin, dass das Protein strukturiert vorliegt. Die Signale, welche dem Linker zugeordnet werden können, befinden sich in der Mitte, was darauf hindeutet, dass der Linker unstrukturiert ist.

Die übertragenen Signale der UBL-Domäne haben dabei dieselben Koordinaten wie bei der Titration von UBL mit UBA1 (siehe Abb. 5.17 a) was zeigt, dass die UBL-Domäne im UBL-Linker-UBA1 Protein gebunden an die UBA1-Domäne vorliegt. Nach erfolgter Zuordnung der Signale kann das Protein hHR23b-UBL-Linker-UBA1 für Bindungsstudien zum Verdrängungsmechanismus durch die UBXD1-PUB-Domäne mittels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration und  $^{15}\text{N}$ -Relaxationsexperimente verwendet werden. Dabei soll der intramolekular gebunden vorliegende UBL-UBA1-Komplex im Vergleich zum intermolekularen Komplex aus UBL-UBA1:PUB verglichen werden.



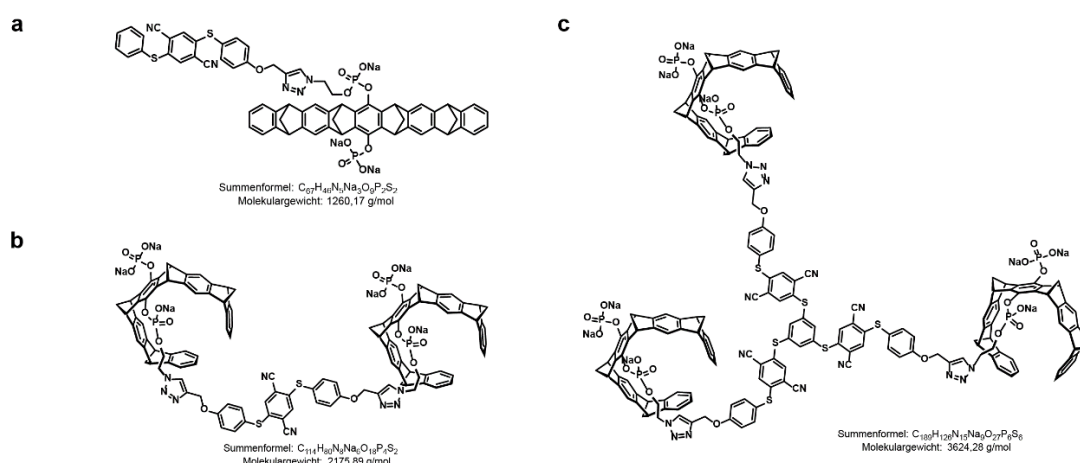
**Abb. 5.20 Zuordnung des Peptidrückgrats von UBL-Linker-UBA1 Protein.**

**a:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBA1 (Aminosäure 188-228). Durch die sequentielle Zuordnung der Aminosäuren konnten vollständig der  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{N}_\text{H}$ -Signale zugeordnet werden. **b:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL-Linker-UBA1 (Aminosäure 1-228, 24,42 kDa). Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Überlagerung der bereits zugeordneten Signale der  $\text{H}_\text{N}$ - $\text{N}_\text{H}$ -Signale der einzelnen UBL-Domäne (grau, zur Verfügung gestellt von Kamiya *et al.*<sup>99</sup>), sowie der einzelnen UBA1-Domäne aus Abb. 5.20 a. Die nicht zugeordneten Signale sind der Linker-Region zwischen den beiden Domänen zuzuordnen.

## 5.8 Supramolekulare Liganden können die PUB:UBL Bindung aufheben

Die Untersuchung der Interaktion zwischen der UBXD1-PUB-Domäne und der UBL-Domäne des humanen Proteasomtransportfaktors HR23 Isoform B (hHR23b) ergab, dass drei Lysine (K51, K76 und K78) die Bindungstasche auf der Proteinoberfläche von UBL flankieren (siehe Kapitel 5.7.2). Diese Lysine wurden zur Grundlage neu designter supramolekularer Phosphat-Pinzetten verwendet. Die Phosphat-Pinzette ist ein supramolekularer Ligand der durch seine offene Kavität nicht-kovalent Lysin und Arginin binden kann. Die Phosphatgruppen ermöglichen dazu, dass das aromatische Ringsystem wasserlöslich ist (interne Bezeichnung: CLR01, siehe Abb. 5.22 a). Über eine eingeführte Azidogruppe als funktionelle Gruppe an der asymmetrischen Phosphat-Pinzette (Monoazidoethylphosphat-monophosphatpinzette), lassen sich mittels Cu(I)-katalysierter Click-Reaktion multivalente Pinzetten mit einem fluoreszierenden AIE-Alkin (AIE: *aggregation induced emission*) kombinieren (siehe Abb. 5.22 b)<sup>117</sup>. Diese AIE-Liganden entwickeln bei Einschränkung ihrer Eigenrotation über Bindungen ein Fluoreszenzsignal.

Durch supramolekulare Liganden können Protein-Protein-Bindungen gezielt beeinflusst werden, wie die intramolekulare UBL-UBA1-Bindung oder die Bindung zwischen HHR23 und UBXD1. Durch die Synthese multivalenter Phosphat-Pinzetten sollen die Lysine K51, K76 und K78 der Bindungsoberfläche auf hHR23b-UBL gezielt blockiert werden, um die Bindung zur UBXD1-PUB-Domäne zu unterbinden. Dabei soll das Ziel sein, eine spezifischere Bindung mit höherer Affinität zu generieren, als es durch die Mono-Phosphat-Pinzette möglich ist. Für die Bindung an die hHR23b-UBL-Domäne sollen die folgenden AIE-Phosphat-Pinzetten untersucht werden: Monomer-AIE-Pinzette (interne Bezeichnung ABS258, siehe Abb. 5.21 a), Dimer-AIE-Pinzette (interne Bezeichnung ABS209, siehe Abb. 5.21 b) und Trimer-AIE-Pinzette (interne Bezeichnung ABS212, siehe Abb. 5.21 c).



**Abb. 5.21 Multivalente supramolekulare Phosphat-Pinzetten.**

**a:** Monomer-AIE-Pinzette ABS258. **b:** Dimer-AIE-Pinzette ABS209. **c:** Trimer-AIE-Pinzette ABS212. Alle supramolekularen Pinzetten wurden synthetisiert von Dr. Abna Kirupakaran (AG Prof. Schrader, Universität Duisburg-Essen).

Im folgenden Kapitel wurden die folgenden Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert, gereinigt und für die Interaktionsstudien verwendet:

Interne BC-Nummer	Protein (Aminosäuregrenzen)	
1141	UBXD1-PUB (150-264)	<b>PUB</b>
1500	hHR23b-UBL (1-78)	UBL
1541	hHR23b-UBL-K51S/K76S (1-78)	UBX X
1542	hHR23b-UBL-K51S/K78S (1-78)	UBX X

Genauere Details der Plasmide sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

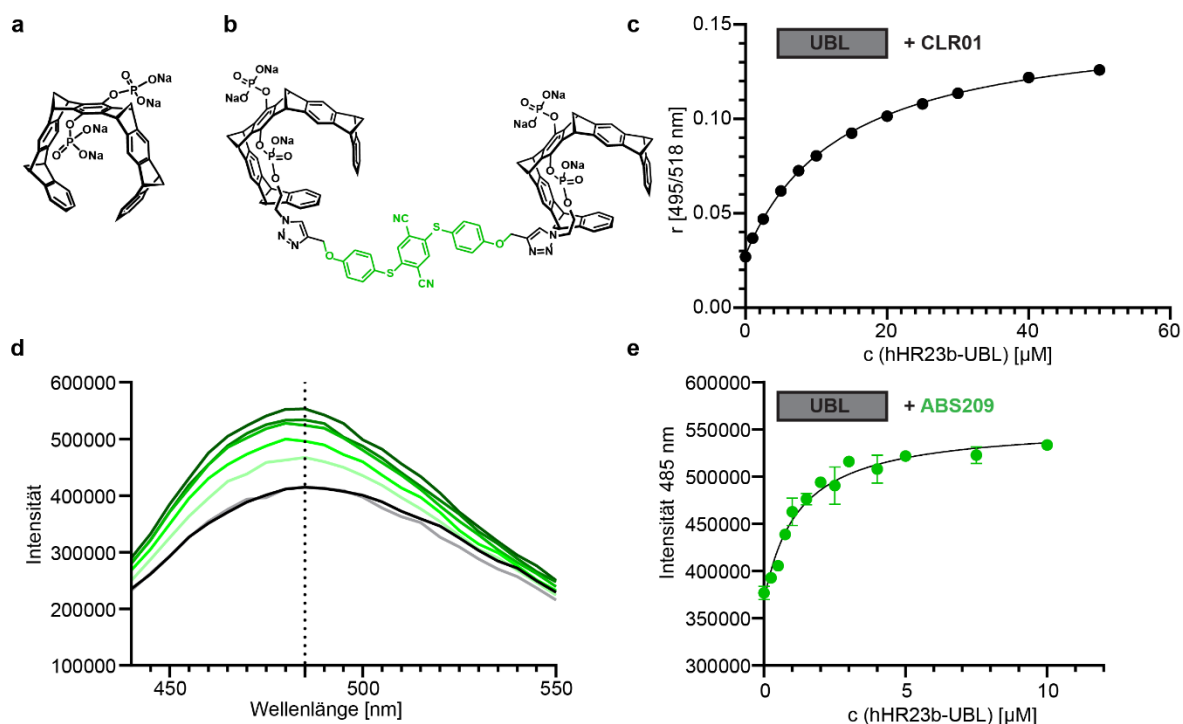
### 5.8.1 Bindung der Dimer-Pinzette an die UBL-Domäne

Moleküldynamik-Simulationen (MD) von verschiedenen multivalenten Liganden mit der UBL-Domäne, durchgeführt von Dr. Abna Kirupakaran, wiesen auf eine Bindung des Pinzetten-AIE-Dimers (interne Bezeichnung ABS209) an die Oberfläche der UBL-Domäne hin. Sowohl mit dem AIE-Monomer als auch mit dem AIE-Trimer konnten dagegen keine Bindungen vorhergesagt werden, jedoch sollte die Monomer-Pinzette ohne AIE-Kern (CLR01) an die oberflächenexponierten Lysine binden. Das AIE-Pinzetten-Dimer ABS209 band bei der MD an die Lysine K51 und K78. Diese vorhergesagte Interaktion der AIE-Liganden wurde anschließend mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen, da die Intensität des Fluoreszenzsignals im gebundenen Zustand zunimmt. Zur Kontrolle der multivalenten Liganden, wurde eine Anisotropie-Kontrollmessung mit 5,6-FAM-CLR01 ohne AIE-Einheit durchgeführt.

Die einzelne Phosphat-Pinzette CLR01 (siehe Abb. 5.22 a) bindet mit einer Dissoziationskonstante von  $13,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$  an die UBL-Domäne von HR23 (siehe Abb. 5.22 c). Durch die Zugabe an hHR23b-UBL-Domäne zu ABS209 steigt die Intensität des Fluoreszenzsignals des AIE-Kerns bei 485 nm (siehe Wellenlängenscan Abb. 5.22 d). Die Dimer-Pinzette ABS209 bindet im Gegensatz zur CLR01 mit einem 10-fach niedrigeren  $K_D$  von  $1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$  an UBL. Zur Bestätigung der Dissoziationskonstanten wurden von Dr. Abna Kirupakaran (Arbeitsgruppe Prof. Schrader, Universität Duisburg-Essen) Messungen mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie durchgeführt. Im Vergleich zwischen CLR01 und ABS209 bindet der AIE-Dimer-Ligand mit einem 34-fachen niedrigeren  $K_D$ -Wert an die UBL-Domäne als die einzelne Pinzette CLR01 (siehe Tab. 5.5 und Anhang 12.6.6). Zur Bestätigung der MD-Simulation der AIE-Monomer- und AIE-Trimer-Pinzette wurden Fluoreszenzmessungen durchgeführt, welche zeigen, dass diese supramolekulare Pinzetten nicht an die UBL-Domäne binden (siehe Anhang 12.6.6).

**Tab. 5.5** Dissoziationskonstanten supramolekularer Liganden CLR01, ABS258, ABS209 und ABS212 mit hHR23b-UBL. (▲ = Dreifachbestimmung, k.B. = keine Bindung messbar)

Ligand	Dissoziationskonstante ( $K_D$ [ $\mu\text{M}$ ])	Methode
5,6-FAM-CLR01	$K_D = 13,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ ▲ ( $R^2 = 0,9970$ )	Fluoreszenz
	$K_D = 277,8 \pm 175,5 \mu\text{M}$	$\Delta H = -1670 \pm 135 \text{ cal/mol}$ , ITC
	$K_D = 245,5 \pm 116,6 \mu\text{M}$	$\Delta S = 10,7 \text{ cal/mol/deg}$ $\Delta H = -2078 \pm 136 \text{ cal/mol}$ , ITC $\Delta S = 9,47 \text{ cal/mol/deg}$
ABS258	k.B. ▲	Fluoreszenz
ABS209	$K_D = 1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ ▲ ( $R^2 = 0,9730$ )	Fluoreszenz
	$K_D = 12,3 \pm 5,9 \mu\text{M}$	$\Delta H = -239,1 \pm 9,3 \text{ cal/mol}$ , ITC
	$K_D = 18,3 \pm 9,9 \mu\text{M}$	$\Delta S = 21,7 \text{ cal/mol/deg}$ $\Delta H = -213,2 \pm 8,1 \text{ cal/mol}$ , ITC $\Delta S = 21,9 \text{ cal/mol/deg}$
ASB212	k.B. ▲	Fluoreszenz



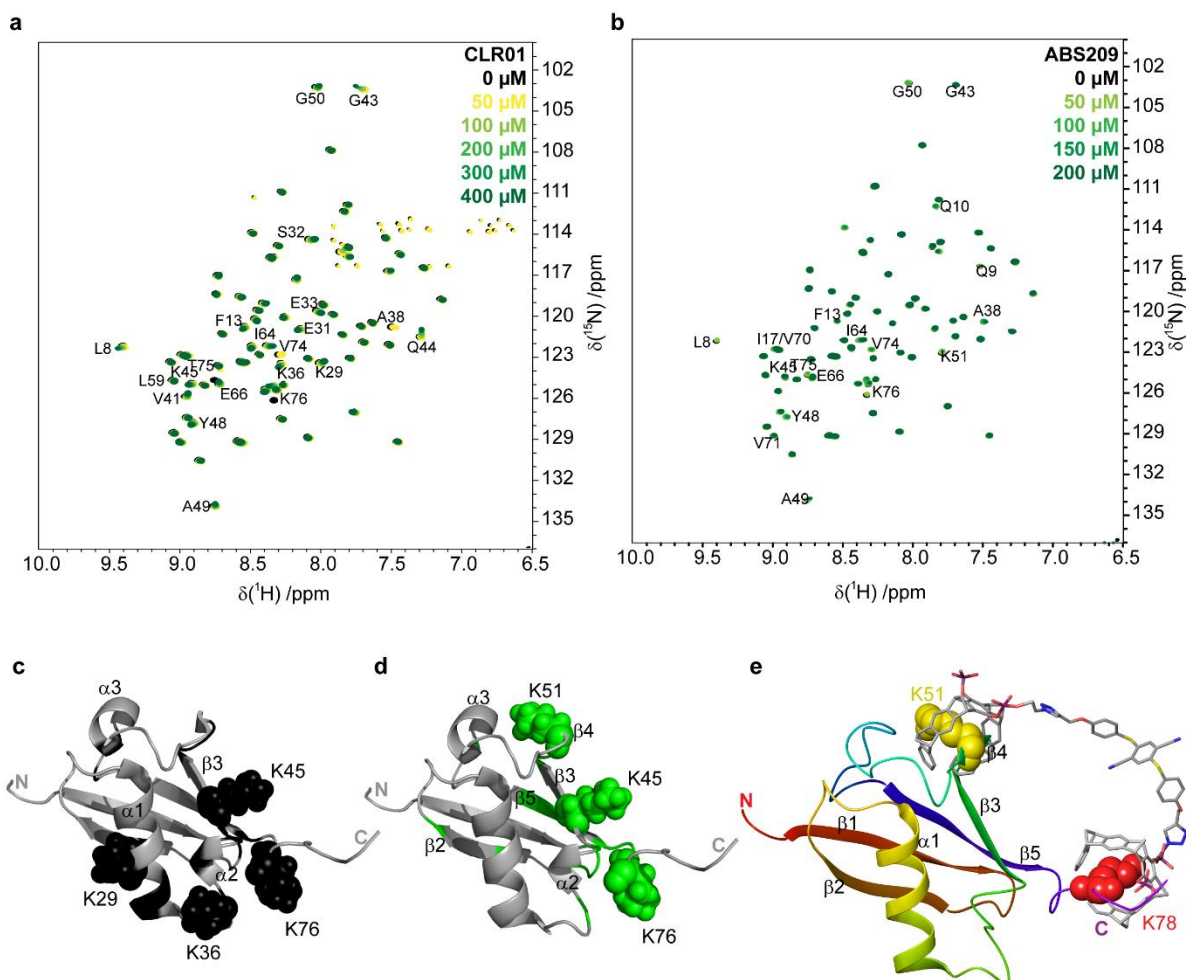
**Abb. 5.22** Supramolekulare Liganden binden an die UBL-Domäne.

**a:** Strukturformel der supramolekularen Pinzete CLR01. **b:** Strukturformel von ABS209, AIE-Kern (grün) mit zwei supramolekularen Pinzetten (schwarz). **c:** Fluoreszenzanisotropie-Titration von 5,6-FAM-CLR01 mit hHR23b-UBL bindet mit einer Dissoziationskonstante von  $K_D = 13,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ . **d:** Wellenlängenspektrum von ABS209. Unter Zugabe von UBL steigt die Intensität (0  $\mu\text{M}$ , schwarz; 0,25  $\mu\text{M}$ , grau; 0,75  $\mu\text{M}$ , pastellgrün; 1,5  $\mu\text{M}$  hellgrün; 3  $\mu\text{M}$ , grün; 5  $\mu\text{M}$  dunkelgrün; 10  $\mu\text{M}$ , olive). **e:** Bindungskurve der Fluoreszenzsignale von ABS209 bei 485 nm zeigen, das ABS209 mit einer Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$  an UBL bindet.



Da die Dimer-Pinzette eine größere Moleküloberfläche besitzt als das Monomer, sollte mittels  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration mit  $^{15}\text{N}$ -UBL die interagierenden Aminosäuren identifiziert werden, um zu vergleichen, ob unterschiedliche Aminosäuren an der Bindung der beiden supramolekularen Pinzetten beteiligt sind. Durch die Zugabe von CLR01 kam es zur chemischen Verschiebung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Signale, sowie zu einem Signalverlust (siehe Abb. 5.23 a). Dabei zeigen die Aminosäuren L8, F13, K29, E31, S32, E33, K36, A38, V41, G43, Q44, K45, Y48, A49, G50, L59, I64, E66, V74, T75 und K76 eine Signalveränderung. Dabei bindet die CLR01-Pinzette die Lysine K29, K36, K45 und K76. Die restlichen Aminosäuren verteilen sich dabei zwischen der  $\alpha$ -Helix 1 bis zum  $\beta$ -Strang 3 (siehe Abb. 5.23 c). Durch die Zugabe der Dimer-Pinzette verändern sich ähnlich zu CLR01 folgende Signale: L8, Q9, Q10, F13, I17, A38, G43, K45, Y48, A49, G50, K51, I64, E66, V70, V71, V74, T75 und K76 (Abb. 5.23). Durch ABS209 werden die Lysine K45, K51 und K76 gebunden (siehe Abb. 5.23 d). Im Vergleich zur Titration des CLR01 zeigen sich nach der Titration des Dimers keine Signalveränderungen im Bereich zwischen K29-K36 und Signalveränderungen der Aminosäuren im Bereich zwischen  $\beta$ 3 und  $\beta$ 5 (siehe Abb. 5.23 d).

Die mit ABS209 interagierenden Aminosäuren überlagern sich dabei mit den zuvor identifizierten Aminosäuren der Interaktion mit UBXD1-PUB sowie der vorhergesagten gebundenen Lysine der MD (siehe Abb. 5.23 e). In der MD von UBL mit ABS209 wurden die Lysine K51 und K78 als Interaktionspartner vorhergesagt und die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration zeigte, dass die Lysine K51 und K76 adressiert werden. Aufgrund der räumlichen Nähe von K76 zu K78 ist es möglich, dass auch K78 gebunden werden kann. Um zu untersuchen, ob K76 und K78 eine äquivalente Rolle bei der Bindung einnehmen, wurden zwei Doppelmutanten von hHR23b-UBL, K51S/K76S und K51/K78S kloniert und das Protein aus *E. coli* gereinigt. Die Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der Dissoziationskonstante zeigte, dass beide Mutanten nicht durch ABS209 gebunden werden (siehe Anhang 12.6.6). Es ist davon auszugehen, dass zusätzlich zu K51 beide Lysine K76 und K78 äquivalent zueinander durch ABS209 gebunden werden können.



**Abb. 5.23** Bindung supramolekularer Liganden an hHR23b-UBL.

**a:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von  $^{15}\text{N}$ -UBL mit CLR01. Interagierende Aminosäuren sind beschriftet. **b:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von  $^{15}\text{N}$ -UBL mit ABS209. Interagierende Aminosäuren sind beschriftet. **c:** Mit CLR01 interagierende Aminosäuren (schwarz), sowie gebundene Lysine (Kugeldarstellung) bei hHR23b-UBL (pdb 1p1a). **d:** Mit ABS209 interagierende Aminosäuren (grün), sowie gebundene Lysine (Kugeldarstellung) bei hHR23b-UBL (pdb 1p1a). **e:** Moleküldynamische Simulation von hHR23b-UBL (pdb 1p1a) mit ABS209. Die Dimer-Pinzette bindet dabei an K51 und K78.

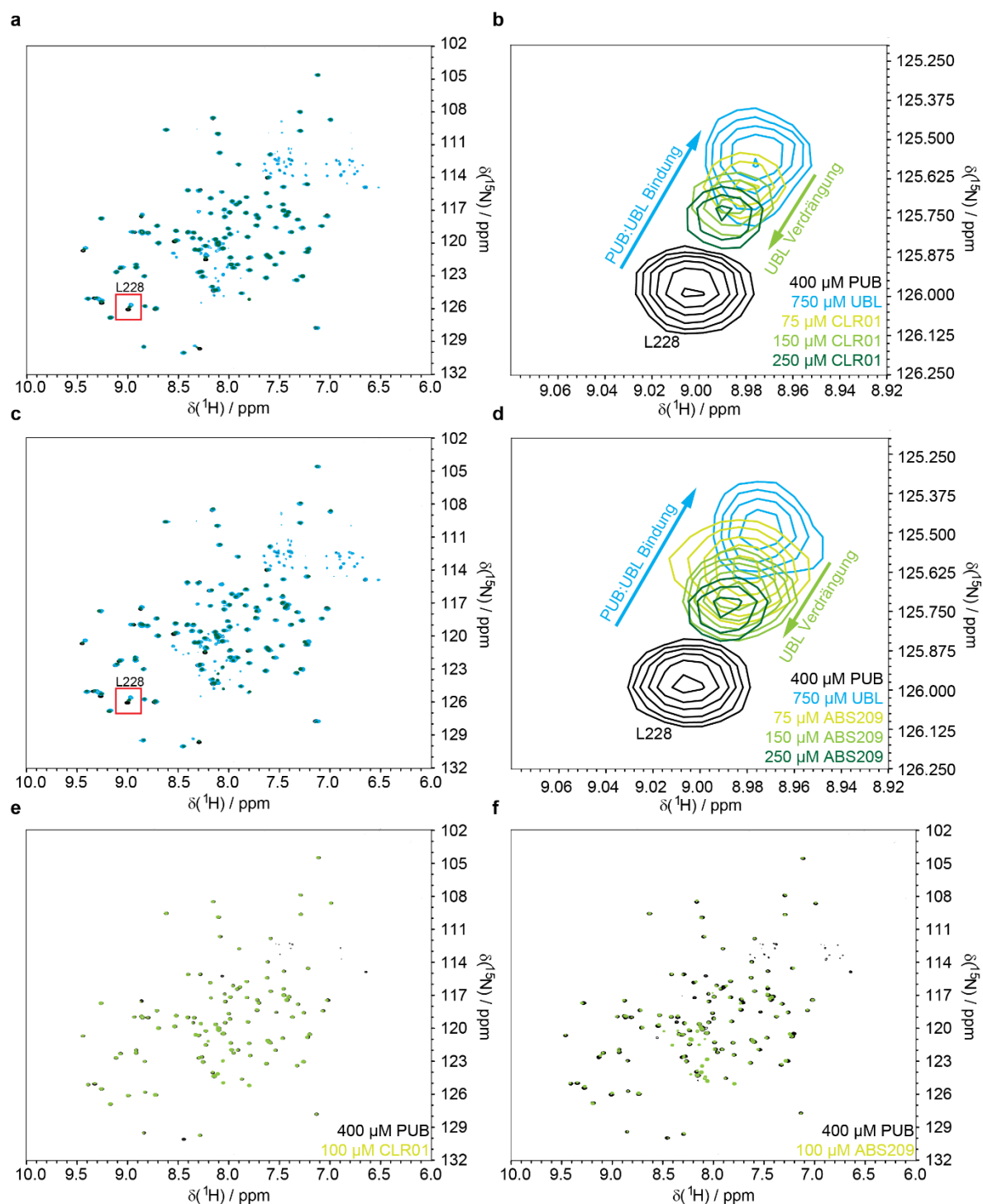
### 5.8.2 Die Dimer-Pinzette kann die Bindung zwischen der PUB- und UBL-Domäne aufheben

Da die bisherigen Messungen zeigen, dass die AIE-Dimer-Pinzette ABS209 dieselben Aminosäuren adressiert wie die PUB-Domäne bei ihrer Bindung an die UBL-Domäne des Proteasomtransportfaktors hHR23b, wurde im Folgenden untersucht, ob die spezifisch synthetisierten supramolekularen Liganden die Bindung beider Proteine zueinander aufheben kann. Dafür wurden  $400\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -UBXD1-PUB-Domäne vorgelegt und hHR23b-UBL hinzugegeben, um durch die Bindung beider Proteine aneinander eine Verschiebung der chemischen Signale zu erzeugen. Durch die schrittweise Zugabe der supramolekularen Liganden sollten sich hypothetisch die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -Signale der  $^{15}\text{N}$ -PUB-Domäne durch die Bindung der Liganden an die UBL-Domäne zurück zu ihrer Ausgangsposition bewegen.

Durch die Zugabe von 750  $\mu\text{M}$  UBL kann eine Verschiebung der Signale beobachtet werden (Abb. 5.24, blaues HSQC-Spektrum), da sich der PUB:UBL-Komplex bildet. Als Beispiel für die Verdrängung der UBL-Domäne wurde die Aminosäure L228 im Fokus dargestellt. Sowohl bei der Zugabe der Monomer-Pinzette CLR01 (Abb. 5.24 a, b), als auch bei der AIE-Dimer-Pinzette ABS209 (Abb. 5.24 c, d) bewegen sich die Signale in Richtung der Ausgangsposition des  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums von 400  $\mu\text{M}$  PUB ohne Zugabe von Bindungspartnern (Abb. 5.24, schwarzes HSQC-Spektrum). Es zeigt, dass die UBL-Domäne durch die Zugabe der supramolekularen Liganden verdrängt wird und die PUB-Domäne im ungebundenen Zustand vorliegt.

Zur Überprüfung ob die supramolekularen Liganden die Lysine oder Arginine der PUB-Domäne binden, wurden  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Kontrolltitrationen durchgeführt, indem 400  $\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -PUB-Domäne vorgelegt wurde und schrittweise die Monomerpinzette CLR01 oder die AIE-Dimer-Pinzette ABS209 hinzugegeben wurde. In beiden Titrationen gibt es geringe Signalverschiebungen durch die Zugabe der Liganden (siehe Abb. 5.24 e, f). Es kommt dabei zu starker Intensitätsabnahme durch die Bildung löslicher Aggregate, wodurch die Titration nur bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Ligand auswertbar ist. Die Intensitätsabnahme bei der Verdrängung der UBL-Domäne ist deutlich geringer und bei den Signalen kommt es zur deutlicheren Verschiebung der Signale, daher ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass die Liganden in dem Kontext an die UBL-Domäne binden. Es besteht die Möglichkeit, dass freie Liganden an freie PUB-Proteine binden und es daher zu verringerten Signalintensitäten kommt. Diese Möglichkeit besteht allerdings nur, wenn zuvor die UBL-Domäne aus der PUB:UBL-Bindung verdrängt wurde. Daher wird die spezifische Verdrängung gegenüber der unspezifischen Aggregation favorisiert.

Durch eine zuvor durchgeführte Molekulardynamik-Simulation konnte ein neuer supramolekularer Ligand ABS209 synthetisiert werden, welcher auf die bereits beschriebene Bindungsfläche der PUB:UBL-Bindung passt. Durch seine höhere Affinität gegenüber dem Ausgangsmolekül CLR01 konnte eine spezifische Bindung der Lysine K51, K76 nachgewiesen werden. Diese Bindung der Lysine kann genutzt werden, um mit geringen Konzentrationen an Ligand die Bindung zwischen dem Ubiquitinbindungspartner / p97-Cofaktor UBXD1 und dem Proteasomtransportfaktor hHR23b aufzuheben. Im Zusammenhang einer möglichen Konformationsänderung von hHR23b von einem geschlossenen Zustand (UBL:UBA1/2-Bindung) zu einem geöffneten Zustand durch die Bindung an UBXD1, kann der Ligand ABS209 dazu genutzt werden, um hHR23b in einem geöffneten Zustand zu halten, wenn der Ligand ebenfalls wie die PUB-Domäne die UBA1- und/oder UBA2-Domäne aus dem intermolekularen Komplex verdrängt.



**Abb. 5.24** Verdrängungstitration der UBXD1-PUB:hHR23b-UBL-Bindung durch supramolekulare Liganden.

**a:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $^{15}\text{N}$ -PUB Domäne mit UBL und CLR01. **b:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Ausschnitt der Aminosäure L228. Das Signal der Aminosäure bewegt sich durch die Zugabe von CLR01 in Richtung der Koordinaten der ungebundenen PUB-Domäne. **c:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $^{15}\text{N}$ -PUB Domäne mit UBL und ABS209. **d:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Ausschnitt der Aminosäure L228. Das Signal der Aminosäure bewegt sich durch die Zugabe von ABS209 in Richtung der Koordinaten der ungebundenen PUB-Domäne. **e:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Kontrolltitration von  $^{15}\text{N}$ -PUB-Domäne mit CLR01. **f:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Kontrolltitration von  $^{15}\text{N}$ -PUB-Domäne mit ABS209.

## 6 Diskussion

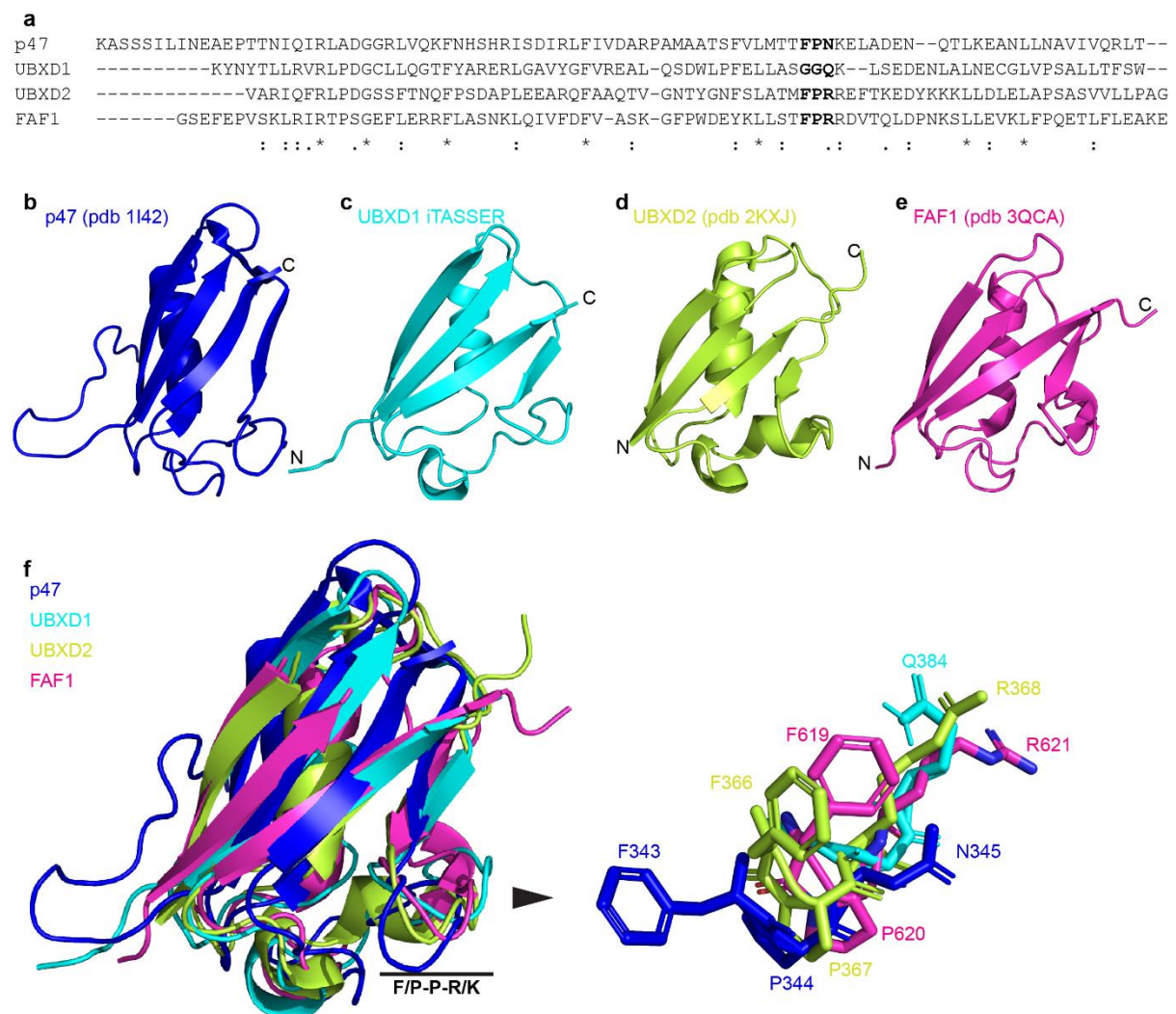
UBXD1 ist einer von zahlreichen Cofaktoren der AAA-ATPase p97/VCP. Als Ausnahme besitzt UBXD1 als einziger Interaktionspartner von p97 zwei p97-bindende Domänen. Dabei bindet der UBXD1-N-Terminus die p97-N-Domäne und die PUB-Domäne den C-Terminus von p97. Bisherige Untersuchungen fokussierten sich auf die Aufklärung der Bindung zwischen dem N-Terminus von UBXD1 an die p97-N-Domäne und ihren Einfluss auf die ND1-Dynamik und die ATPase-Aktivität von p97<sup>48,49,101</sup> sowie die Bindung der PUB-Domäne an das C-terminale PIM (*p97 interacting motif*)-Peptid<sup>49,51,67</sup>. Die Funktion der UBX-Domäne wurde bisher nicht beschrieben. In zellbiologischen Untersuchungen wurde UBXD1 bereits mit Prozessen, an denen Ubiquitin beteiligt ist in Verbindung gebracht<sup>21,66,73,118</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion der UBX-Domäne des p97-Cofaktor UBXD1 untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass UBXD1 neue funktionelle Merkmale aufweist: Zum einen eine intramolekulare Bindung zwischen der UBXD1-Linker-Region und der UBX-Domäne, welche zusammen eine erweiterte UBX-Domäne (eUBX) bilden, sowie zwei neue Bindestellen, einmal zur p97-D2-Domäne als auch zum Proteasomtransportfaktor HR23. Die UBXD1-UBX-Domäne bindet an Ubiquitin und favorisiert dabei kurze Ubiquitinketten. Durch die Strukturhomologie der PNGase-PUB-Domäne gab es Hinweise darauf, dass UBXD1 ebenfalls mit einem Proteasomtransportfaktor interagieren könnte. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die UBXD1-PUB-Domäne mit der hHR23-UBL-Domäne interagieren kann. Beide neuen Bindungen können darauf hindeuten, dass UBXD1 als Substratbindungsmodul im Proteinkomplex mit p97 dient. Da diese Interaktion als Verbindung zwischen dem Entfaltungsprozess von ubiquitylierten Substraten und deren Abbau durch das Proteasom dienen kann, wurden spezifisch für diese Bindung supramolekulare Liganden synthetisiert. Als supramolekularer Ligand wurde ein AIE-Pinzettendimer synthetisiert, welches spezifisch an die HR23b-UBL-Domäne binden kann und dazu die Bindung zur PUB-Domäne aufhebt. Durch die gezielte Adressierung der Kontaktfläche zwischen UBL- und PUB-Domäne kann durch den AIE-Pinzettendimer ABS209 die Bindung beeinflusst und für Untersuchungen der Bindung verwendet werden.

### 6.1 UBX-Domäne als funktionelles Merkmal von UBXD1

Die bereits entdeckten Bindungspartner von p97 lassen sich über ihre Bindungsmotive einteilen. Bisher konnten sieben unterschiedliche Bindungsmotive bzw. Bindungsdomänen identifiziert werden (VIM, VBM, BS1/SHP, PUL, PUB, UBX-like und UBX), wobei die Familie der UBX (*Ubiquitin regulatory X*)-domänenhaltigen Proteine die größte Gruppe abbildet<sup>38</sup>. Die UBX-Domäne besitzt ein konserviertes  $\beta$ -Faltblatt Motiv ( $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ) in seiner

Tertiärstruktur und bindet über ein F/P-P-R/K-Motiv an die N-Domäne von p97<sup>38,70,71</sup>. Dieser hydrophobe Bereich wurde als die Hauptbindestelle in der UBX-Domäne identifiziert<sup>72</sup>. Die Funktion der UBXD1-UBX-Domäne ist bisher unbekannt, da sie zwar das konservierte Tertiärstruktur besitzt, aber ihr das kanonische F/P-P-R/K-Motiv fehlt, was es anderen p97-Cofaktoren ermöglicht über ihre UBX-Domäne an die p97-N-Domäne zu binden (siehe Abb. 6.1 a)<sup>20,49,70</sup>. Das berechnete iTASSER- und AlphaFold-Strukturmodell (siehe Kapitel 5.2.2) der UBXD1-UBX-Domäne zeigt eine Homologie zu anderen UBX-Domänen (FAF1, p47 oder UBXD2, siehe Abb. 6.1 b-e), allerdings hat UBXD1 anstelle des F/P-P-R/K-Motivs ein G-G-Q-Motiv in seiner Sequenz (siehe Abb. 6.1 a, f).



**Abb. 6.1 UBX-Domänen homologer Proteine.**

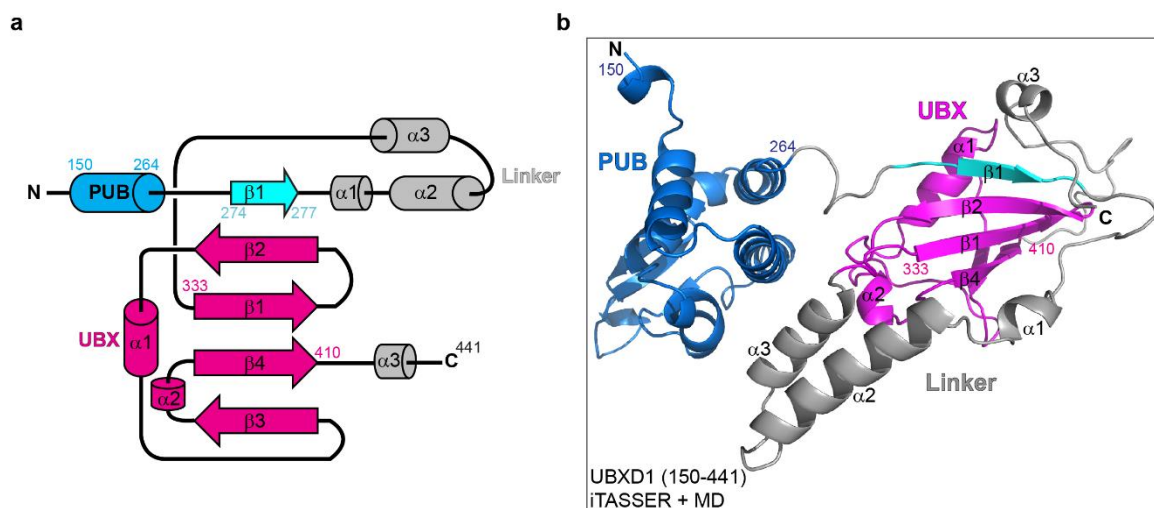
**a:** Aminosäurealignment von UBX-Domänen von p47, UBXD1, UBXD2, FAF1 zeigt, dass die UBXD1-UBX-Domäne kein F/P-P-R/K-Motiv besitzt. **b:** UBX-Domäne von p47 (pdb 1142). **c:** iTASSER-Modell der UBX-Domäne von UBXD1. **d:** UBX-Domäne von UBXD2 (pdb 2KXJ). **e:** UBX-Domäne von FAF1 (pdb 3QCA). **f:** Strukturalignment der UBXD-Domänen von p47 (blau), iTASSER-UBXD1-Modell (cyan), UBXD2 (grün) und FAF1 (magenta) (links). Isoliertes F/P-P-R/K-Motiv der überlagerten UBX-Strukturen als Stabdarstellung der Aminosäureseitenketten (rechts). Abbildungen erstellt mit PyMol.

Kern *et al.*<sup>49</sup> konnten in Pulldown-Experimenten mit rekombinanten UBXD1-Proteinen zeigen, dass die UBXD1-UBX-Domäne nicht an die p97-N-Domäne bindet. Stattdessen bindet UBXD1-N-Terminus an die p97-N-Domäne und die ND1-Schnittstelle<sup>48,49,101</sup>. Innerhalb von UBXD1 befindet sich die UBX-Domäne (333-410) C-terminal zur PUB-Domäne (150-264), welche an den p97-C-Terminus bindet<sup>49,51,67</sup> und wird daher in der Nähe zur PUB-Domäne erwartet (siehe Kapitel 5.5, Abb. 5.12 f). Für die UBX-Domäne konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Bindung zu p97 nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.5), was die UBXD1-UBX-Domäne wie bereits publiziert<sup>26,49</sup> als p97-Bindungspartner ausschließt.

Die *in silico* berechneten Modellstrukturen (siehe Kapitel 5.2.2) mittels iTASSER<sup>102–104</sup> und AlphaFold<sup>106,107</sup> basieren auf der Struktur der UBX-Domäne von ASPL (*Alveolar soft part sarcoma locus*) (siehe Abb. 5.4, Abb. 5.5 d). Die ASPL-UBX-Domäne zeigt mit der erweiterten UBX-Domäne<sup>105</sup> ein interessantes strukturelles Element, was homologe UBX-Domänen bisher nicht zeigen. Durch das chemische Crosslinking und Interaktionsexperimente mittels analytischer Gelfiltration konnte gezeigt werden, dass der UBXD1-Linker (269-332) zwischen der PUB- und UBX-Domäne mit der UBX-Domäne (333-410) interagiert (siehe Kapitel 5.2.2). Dabei wird das  $\beta$ -Faltblatt der UBX-Domäne mit dem  $\beta$ -Strang des Linkers ( $\beta$ 1) verlängert (siehe Abb. 6.2 a). Diese Bindung des  $\beta$ 1-Stranges führt dazu, dass sich der Linker zu einer Schleife formt, welche zwei  $\alpha$ -Helices enthält (siehe Abb. 6.2 a). Der Linker und die UBX-Domäne bilden ähnlich zum ASPL<sup>105</sup> eine erweiterte UBX-Domäne (269-410). Die intramolekulare Interaktion zwischen Linker und UBX-Domäne konnte wie bereits beschrieben nachgewiesen werden. Die mögliche Sekundärstruktur des Linkers wird in den berechneten Modellen (iTASSER, AlphaFold) als  $\alpha$ -Helices dargestellt, da beide Modelle auf der Kristallstruktur von ASPL beruhen. Die  $H_N$ - $N_H$ -Signale im  $^1H$ - $^{15}N$ -HSQC-Spektrum des  $^{15}N$ -markierten Linkers (263-330) (siehe Abb. 12.9 b) liegen mittig im Spektrum und überlagern sich, was auf ein unstrukturiertes Protein hinweist. Ob sich eine Sekundärstruktur durch die Bindung an einen Interaktionspartner oder im volle Länge Protein durch die PUB- und UBX-Domäne an den jeweiligen Enden des Linkers müsste untersucht werden. UBXD1 zeigt dabei eine strukturelle, aber nicht funktionelle Ähnlichkeit zu ASPL. Die erweiterte UBX-Domäne in ASPL bindet über seine UBX-Domäne an die p97-N-Domäne und lagert den Linker-Teil wie eine Schlinge um die N-Domäne, was zur Dissoziation des p97-Hexamers führt<sup>105</sup>. Die eUBX-Domäne von ASPL bindet dabei mit einer Dissoziationskonstante von 0,2 nM an p97<sup>105</sup>. Diese Auswirkung auf p97 wurde bisher bei UBXD1-UBX nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die UBXD1-UBX-Domäne nicht an N-p97 bindet (siehe Kapitel 5.5.3). Die UBXD1-UBX-Domäne bzw. die erweiterte UBXD1-UBX-Domäne (eUBX, Linker-UBX) befindet sich durch die Bindung der PUB-Domäne an den p97-C-Terminus in der Nähe



zur D2-Domäne von p97 (siehe Abb. 5.5 f). Diese Lokalisation unterscheidet die UBX-Domäne von UBXD1 von anderen bekannten p97-Cofaktoren, da diese UBX-Domäne ausschließlich an der N-Domäne von p97 lokalisiert sind<sup>19,38</sup>. Bis auf die ASPL-UBX-Domäne wurde bisher ebenfalls bei keinem anderen UBX-Domänen haltigen Protein eine erweiterte UBX-Domäne definiert.



**Abb. 6.2 Strukturmodell von UBXD1 (150-441).**

**a:** Domänenarchitektur von UBXD1 (150-441) der Anordnung der Sekundärstrukturelemente vom UBXD1-Linker (269-332) und der UBX-Domäne (333-410). **b:** Strukturmodell von UBXD1 basierend auf dem berechneten iTASSER-Modell von Linker-UBX-C (264-441) nach erfolgter *docking*-Rechnung über Crosslinks und MD zur Energieminimierung der Struktur.

Aufgrund dieser Nähe zur D2-Domäne konnte auch eine weitere Bindung zwischen UBXD1 und p97 nachgewiesen werden, wobei die Linker Region an die D2-Domäne von p97 bindet. Durch die Bestimmung der Dissoziationskonstanten verschiedener Kombinationen der Mehrdomänenproteine p97 und UBXD1 konnte gezeigt werden, dass die Bindestellen von UBXD1 unabhängig voneinander an p97 binden können und dass eine neue dritte Bindestelle identifiziert werden konnte (siehe Tab. 5.2). UBXD1 besitzt somit drei Bindestellen für p97, der N-Terminus bindet die p97-N-Domäne, die PUB-Domäne den C-Terminus von p97 und die UBXD1-Linker-Region bindet an die D2-ATPase-Domäne. Sind alle drei Bindungen additiv möglich bindet UBXD1 mit einem  $K_D$ -Wert von  $1,6 \mu\text{M}$  an p97 (siehe Tab. 5.2). Aufgrund dieser drei Bindestellen für p97 liegt die Hypothese nahe, dass UBXD1 in seiner Bindung p97 eng umschließt.

Die Dissoziationskonstanten von UBXD1 bewegen sich dabei wie die  $K_D$ -Werte anderer p97-Cofaktoren im niedrigen mikromolaren Bereich. Für UBXD1-VIM wurde von Trusch *et al.* eine Dissoziationskonstante für UBXD1-N mit p97-N-Domäne von  $9 \mu\text{M}$ <sup>48</sup> bestimmt. In dieser Arbeit konnte für UBXD1 mit der p97-N-Domäne ein  $K_D$ -Wert von  $22 \mu\text{M}$  bestimmt werden (siehe Tab. 5.2). Die UBX-Domäne von FAF1 bindet mit einem  $K_D$ -Wert von  $11,2 \mu\text{M}$ <sup>56</sup> an die



p97-N-Domäne. Eine Ausnahme bildet die erweiterte UBX-Domäne von ASPL mit einem  $K_D$ -Wert von  $0,2 \text{ nM}^{105}$ , welche durch seine Bindung die Hexamere Struktur von p97 löst. Durch die erweiterte UBX-Domäne könnten zusätzliche Kontakte zur p97-N-Domäne die Bindung begünstigen. Die Bindung des C-terminale PIM von p97 (Sequenz: TEDNDDL YG) durch die PNGase-PUB- ( $K_D$ -Wert =  $2,1 \pm 0,149 \text{ }\mu\text{M}^{69}$ ; PUB+p97-C10 =  $3,6 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{M}$  und PUB+p97 =  $16,7 \pm 1,3 \text{ }\mu\text{M}^{52}$ ), die PLAA-PUL- ( $K_D$ -Wert =  $5 \text{ }\mu\text{M}^{55}$ ) und HOIP-PUB-Domäne ( $K_D$ -Wert =  $10,2 \pm 0,47 \text{ }\mu\text{M}^{69}$ ) sind im niedrigen mikromolaren Bereich. Der  $K_D$ -Wert der isolierten UBXD1-PUB-Domäne bewegt sich dabei ebenfalls mit  $13,8 \text{ }\mu\text{M}$  im selben Konzentrationsbereich.

Die Dissoziationskonstante von UBXD1 bewegt sich im selben Konzentrationsbereich wie die der anderen p97-Cofaktoren. Allerdings könnten bei einer Blockierung einer der Bindestellen, wie z.B. der p97-N-Domäne durch einen anderen Cofaktor UBXD1 weiterhin über die PUB-Domäne, sowie die Linker-Region an p97 binden und Teil des p97-Komplexes sein. Diese drei unabhängig voneinander agierenden Bindestellen ermöglichen UBXD1 als p97-Cofaktor eine Flexibilität die andere p97-Cofaktoren nicht haben.

Ob diese unabhängig voneinander agierenden Bindestellen eine Kommunikation zwischen dem N- und C-Terminus an p97 ermöglichen müsste in Zukunft noch geklärt werden, indem Experimente zur Dynamik der Bindung durchgeführt werden. Dabei könnten Untersuchungen mittels FRET und photo-reaktives Crosslinking durch positionsspezifisches BpA weitere Ergebnisse liefern. UBXD1 wurde bereits von Kern *et al.*<sup>49</sup> als Reset-Knopf postuliert, der es ermöglicht die Bindung anderer Cofaktoren von p97 aufzuheben, falls p97 in unproduktiven Interaktion mit Cofaktoren oder Substraten feststeckt.

## 6.2 UBXD1 als Substratadapter

Bisher konnte UBXD1 in p97-Komplexen nachgewiesen werden, welche in Zusammenhang mit der Bindung von Ubiquitin bzw. ubiquitinylierten Substraten stehen. Ritz *et al.*<sup>66</sup> konnten zeigen, dass der p97:UBXD1-Komplex Mono-ubiquitinyliertes Caveolin-1 bindet. Die Arbeit von Papadopoulos *et al.*<sup>21</sup> beschrieb den ELDR (*Endo-Lysosomal Damage Response*)-Komplex, welcher über Ubiquitin beschädigte Lysosomen binden, um die Bildung von Autophagosomen zu fördern. Der ELDR-Komplex besteht dabei aus p97 mit UBXD1, PLAA (*phospholipase A2-activating protein*) und dem Deubiquitinylierungs-Enzym YOD1 (*Ubiquitin thioesterase*, auch OTU1 genannt). Eine direkte Bindung von UBXD1 zu Ubiquitin konnte bisher in diesen Komplexen nicht gezeigt werden.

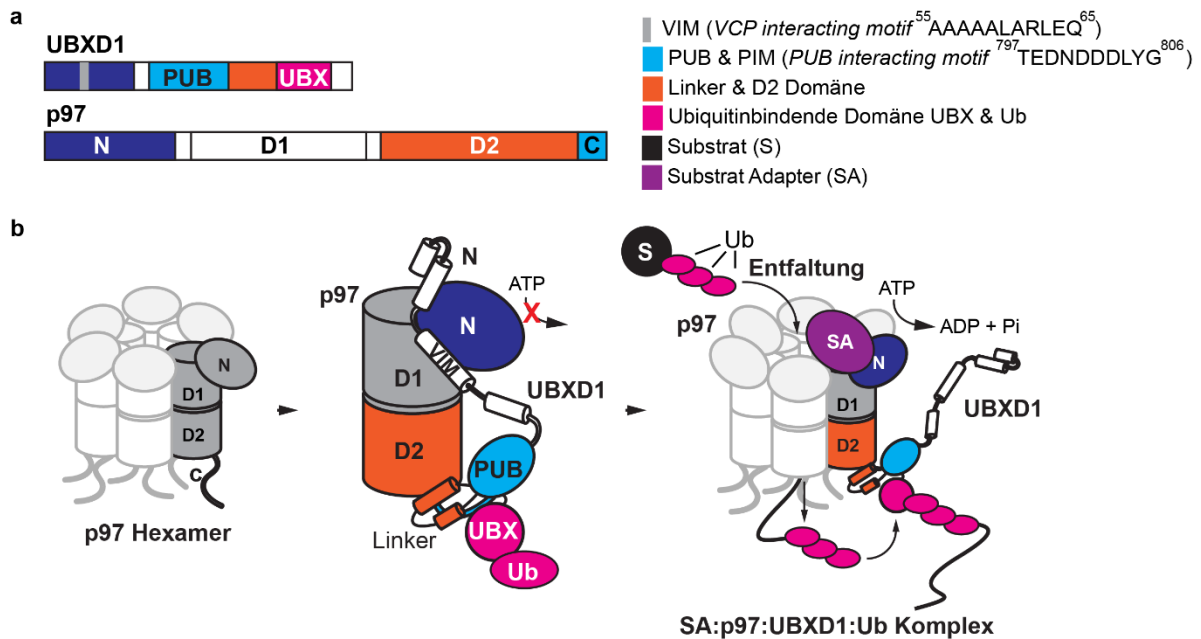
In dieser Arbeit konnte das erste Mal die direkte Bindung der UBXD1-UBX-Domäne an Ubiquitin *in vitro* nachgewiesen werden. Ubiquitinbindende Proteine wie z.B. YOD1, PLAA,

Ufd1:Npl4, S5a binden über eine hydrophobe Bindestelle (K6, I8, R42, I44, A46, K48, Q49, E51 und V70<sup>1,5</sup>) an Ubiquitin. Über eine <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Titration konnte dieser hydrophobe Bereich als Bindestelle für UBXD1 identifiziert werden. Durch Pulldowns (siehe Abb. 5.1), unterschiedliche <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Messungen mit UBXD1-Konstrukten (UBXD1-wt, UBXD1-Linker, UBXD1-PUB, siehe Abb. 5.8, Abb. 12.9) und einem Alanin-Scan, sowie einem Peptid-Array (siehe Abb. 5.9) wurde die erweiterte UBX-Domäne (269-410, Linker-UBX) als Bindestelle für Ubiquitin identifiziert. Die Ergebnisse bestätigen die UBX-Domäne als Bindungspartner von UBXD1. Aufgrund des strukturellen Elements der erweiterten UBX-Domäne kann die Linkerregion nicht vollständig als Bindungspartner ausgeschlossen werden. Aufgrund der Flexibilität des Linkers wäre es möglich, dass die UBX-Domäne das Ubiquitin bindet und die Linkerregion das Ubiquitin wie eine Schlaufe umschließt und somit zur Bindung beiträgt. Ähnlich zur Komplexstruktur von ASPL-eUBX mit der N-Domäne von p97<sup>105</sup>. Die Sekundärstruktur der Linkerregion (269-332) wird im berechneten Strukturmodell mit zwei  $\alpha$ -Helices dargestellt, diese wurden auf Basis der ASPL-Struktur berechnet (siehe Kapitel 5.2). Das NMR-Spektrum des isolierten <sup>15</sup>N-markierten UBXD1-Linkers (siehe Abb. 12.9) zeigt, dass die NH-Signale des <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HSQC-Spektrums im Bereich von <sup>1</sup>H: 7,2-8,4 ppm und <sup>15</sup>N: 108-126 ppm, wobei die meisten Signale sich in der Mitte des Spektrums überlagern, was auf ein ungefaltetes Protein hinweist. Durch die Ausbildung der intramolekularen Bindung des  $\beta$ 1-Stranges der Linker-Region zum  $\beta$ 2-Strang der UBX-Domäne (siehe Abb. 6.2) könnte der Linker eine Sekundärstruktur bilden und somit zur Bindung an Ubiquitin beitragen.

Die UBX-Domäne kann über ihr  $\beta$ -Faltblatt an die hydrophobe Bindestelle von Ubiquitin binden (siehe Kapitel 5.3.3), daher wird davon ausgegangen, dass UBXD1 eine Bindestelle für Ubiquitin hat. Aufgrund einer einzelnen Bindestelle in der UBX-Domäne für Ubiquitin (Stöchiometrie 1:1, siehe Abb. 5.8 a) zeigen die Fluoreszenzanisotropie-Titrations, dass UBXD1 Mono-Ubiquitin und kurze K48-verknüpfte-Ubiquitinketten favorisiert. Die Bindung K48-Ubiquitinketten passt dabei zu den Ergebnissen des ELDR-Komplexes, welcher beschädigte Lysosomen bindet, die mit K48- und K63-Ubiquitinketten markiert sind. Entscheidend für die Bindung sind dabei die K48-Ubiquitinketten auf der Oberfläche der Lysosomen<sup>21</sup>. Bei der Interaktion vom p97:UBXD1-Komplex mit Mono-ubiquitinyliertem Caveolin-1 liegt nun die Vermutung nahe, dass UBXD1 als Cofaktor durch seine favorisierte Bindung an Mono-Ubiquitin das Mono-ubiquitinylierte Caveolin-1 bindet und somit zur Komplexbildung beiträgt. Ritz *et al.*<sup>66</sup> konnten zeigen, dass p97 an Mono-Ub-Caveolin-1 bindet, allerdings der Transport in der Zelle ohne UBXD1 nicht stattfinden kann. Daher wurde 2011 vermutet, dass UBXD1 eine Funktion zur Substratprozessierung hat. Die Arbeit von Bento *et al.*<sup>73</sup> aus dem Jahr 2018 brachte UBXD1 mit Mitophagie, dem Abbau beschädigter

Mitochondrien in Zusammenhang. Dabei werden äußere Membranproteine OMMs (*outer mitochondrial membrane*) beschädigter Mitochondrien durch die E3-Ligase Parkin ubiquitinyliert und somit Interaktionspartner zum Abbau rekrutiert<sup>73</sup>. Interessanterweise zeigten die Untersuchungen, dass die UBX-Domäne von UBXD1 ausreichend für die Erkennung von Mitochondrien ist und dass die Rekrutierung von p97 nicht auf zusätzlichen Signalen beruht<sup>73</sup>. Diese Erkennung der mit Ubiquitin markierten Proteine kann daher auf der Ubiquitinbindung der UBXD1-UBX-Domäne beruhen. Nachfolgend wurde UBXD1 auch mit der Mitochondrien-assoziierten Degradation (MAD) in Verbindung gebracht<sup>74</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass UBXD1 selektiv das OMM-Protein MCL1 (*Myeloid cell leukemia sequence 1*) bindet und für deren Abbau mit p97 interagiert<sup>74</sup>. Das MCL1 hingegen interagiert nicht mit p97, sodass die Komplexbildung für die Proteinfaltung durch UBXD1 erfolgen muss.

In den bereits beschriebenen Komplexen (ELDR-Komplex: p97:YOD1:PLAA:UBXD1<sup>21</sup>; MAD-Komplex: p97:UBXD1:MCL1<sup>74</sup>; p97:UBXD1:Ub-Caveoli-1<sup>66</sup>; p97:UBXD1:ERGIC-53<sup>118</sup>) und zellbiologischen Prozessen (Abbau geschädigter Lysosomen<sup>21</sup>, Mitochondrien-assoziierte Degradation<sup>74</sup>, Mitophagy<sup>73</sup>, Proteintransport<sup>118</sup>, Ubiquitin-abhängige Membransortierung<sup>66</sup>,) kann UBXD1 als Ubiquitinbindungspartner betrachtet werden, der die jeweiligen ubiquitinylierten Substrate binden kann. Aufgrund der zuvor beschriebenen Lokalisation der UBX-Domäne am C-terminalen Ende von p97 (siehe Kapitel 6.1), kann postuliert werden, dass UBXD1 als Substrat-bindender Cofaktor dient, der das ubiquitinylierte Substrat festhält, wenn es aus der p97-D2-Pore austritt (siehe Abb. 6.3 b). Durch das gebundene Substrat können nachfolgende Prozessierungsschritte über weitere Interaktionspartner erfolgen, ohne dass das entfaltete Substrat sich frei in der Zelle bewegt. Hinweise darauf liefert der detaillierte Mechanismus der Substratenfaltung von ubiquitinylierten Substraten von Twomey *et al.*<sup>62</sup>. Im Komplex von p97:Ufd1:Npl4 konnte gezeigt werden, dass das erste Ubiquitin des ubiquitinylierten Substrates in die Pore der cis-Seite (D1-Domäne) zur Prozessierung eingeführt wird und somit das Ubiquitin bei erfolgter Entfaltung die trans-Pore (D2-Domäne) verlässt<sup>62</sup>. Bemerkenswerterweise bindet ein weiterer p97-Cofaktor, PLAA, auch an die trans-Seite von p97 und besitzt ebenfalls eine Ubiquitinbindestelle<sup>5,55</sup>. Daher ist es möglich, dass PLAA und UBXD1 im ELDR-Komplex bei der Regulierung der Substratverarbeitung nach der Entfaltung zusammenarbeiten.



**Abb. 6.3 Modell vom UBXD1:p97-Komplex in Interaktion mit Ubiquitin.**

**a:** Domänenstruktur von UBXD1 und p97 mit ihren jeweiligen Interaktionen. Der UBXD1-N-Terminus bindet an die p97-N-Domäne, die PUB-Domäne bindet die letzten 10 Aminosäuren vom p97-C-Terminus (PIM) und der neu identifizierte UBXD1-Linker bindet an die ATPase Domäne D2. **b:** UBXD1 umschließt durch seine Bindestellen p97 vollständig. Dabei fixiert der UBXD1-N-Terminus die p97-N-Domäne in einer *down*-Konformation was die ATPase-Aktivität reduziert. Die PUB-Domäne bindet an den C-Terminus von p97, was die Bindung des Linkers an die p97-D2-Domäne unterstützt. Diese Orientierung platziert die UBX-Domäne in der Nähe des Ausgangs der Pore an der D2-Domäne vom p97-Hexamere. Bei Anwesenheit eines Substratadapter-Cofaktors von p97, löst sich aufgrund der Bindung zur p97-N-Domäne der UBXD1-N-Terminus. Durch die Aufhebung der ATPase-Inhibierung kann das ubiquitylierte Substrat entfaltet werden. Sobald das ubiquitylierte Substrat die Pore mit dem ersten Ubiquitin verlässt und sich das Ubiquitin zurückfaltet, kann es durch die UBX-Domäne gebunden werden.

### 6.3 UBXD1 verbindet p97-Entfaltungskomplexe mit dem Proteasome

Eine Funktion von p97 ist die Proteinqualitätskontrolle und die Entfaltung mit Ubiquitin markierter Proteine für den proteasomalen Abbau. UBXD1 konnte bereits mit unterschiedlichen Entfaltungskomplexen (ELDR<sup>21</sup>, MAD<sup>74</sup>) und Prozessen zum Abbau von Proteinen in Verbindung gebracht werden<sup>66,73,118,119</sup>. Aufgrund der Orientierung der Ubiquitinbindenden UBX-Domäne an der trans-Seite (D2-Domäne) von p97 wäre es möglich, dass UBXD1 als Ubiquitinadapter bzw. Substratprozessierungsfaktor für weitere Prozessierungsschritte fungiert. Dabei kann UBXD1 das entfaltete Substrat über Ubiquitin für weitere Interaktionspartner binden und es diesen zur Prozessierung übergeben.

In Kapitel 5.6 konnte gezeigt werden, dass UBXD1 als nicht-kompetitiver Inhibitor der ATPase-Aktivität fungiert (siehe Abb. 5.13 b, d). Der Cofaktor p47, der eine Rolle bei der p97-vermittelten Membranfusion spielt, ist ebenfalls ein nicht-kompetitiver Inhibitor<sup>58</sup>. Meyer *et al.*<sup>58</sup> haben gezeigt das p47 die ATPase-Aktivität um bis zu 80 % reduziert. Zhang *et al.*<sup>59</sup> ergänzten diese Ergebnisse, indem sie zeigten, dass die Inhibition Konzentrationsabhängig und somit in zwei Phasen einteilbar ist. Bei niedrigen Konzentrationen von 6,25 nM konnte p47 die ATPase-Aktivität um bis zu 68 % inhibieren, was

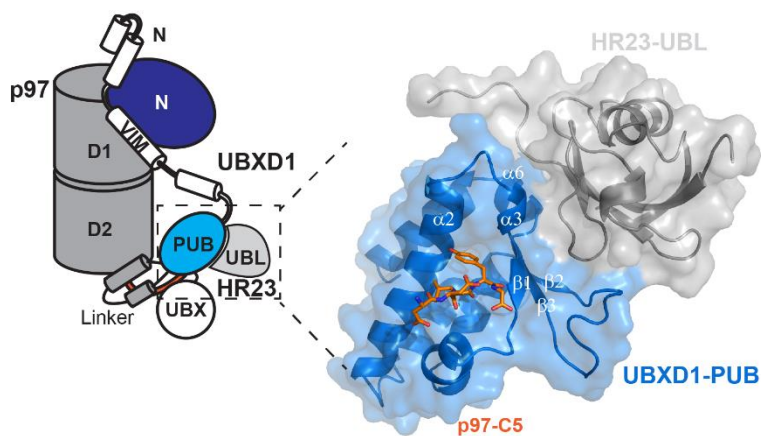
die vorherigen Ergebnisse zur Inhibition von Meyer *et al.*<sup>58</sup> bestätigt. Durch die steigenden Konzentrationen von 100 nM bis 1 µM konnte p97 nur noch um bis zu 30 % inhibiert werden. Die unterschiedliche Inhibition basiert dabei auf der Stöchiometrie von p47 zu p97, Phase 1 ist während einer Stöchiometrie von ungefähr 1:1 (4,17 nM p97-Hexamer : 6,25 nM p47<sup>59</sup>) und Phase 2 bei einer Stöchiometrie von 1 zu N (4,17 nM p97-Hexamer : 100 nM - 1 µM p47) nachweisbar. In hohen Konzentrationen liegt p47 als Trimer vor, was die Stöchiometrie zwischen p97 und p47 ändert. Eine solche Biphasen-Inhibition konnte bei UBXD1 im untersuchten Konzentrationsbereich (0-5 µM UBXD1) mit einem molaren Verhältnis von 1:1, 1:3 bis zu 1:10 nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.13).

Im Zusammenspiel mit einem Modell-Entfaltungskomplex aus p97:Ufd1:Npl4 konnte UBXD1 an diesen Komplex binden, ohne die ATPase-Aktivität für die Entfaltung des Poly-Ub-EOS Substrates zu inhibieren, was bedeutet, dass keine Bindung zwischen dem UBXD1-N-Terminus und der p97-N-Domäne stattfindet. Im Pulldown-Experiment konnte gezeigt werden, dass UBXD1 in Verbindung mit Ufd1:Npl4 an p97 binden kann, was vermuten lässt, dass UBXD1 durch seine PUB-Domäne noch am C-Terminus von p97 gebunden ist. Diese Möglichkeit trotz der Anwesenheit anderer Cofaktoren weiterhin an p97 zu binden, zeigt wiederholt die Besonderheit von UBXD1 als Cofaktor mit zwei unabhängig voneinander agierenden p97-Bindestellen. Die Hypothese der weiterhin bestehenden UBXD1-PUB:p97-C-Terminus-Bindung muss mit einem Pulldown bestätigt werden. Dabei sollte man die C-terminale Bindestelle von p97 durch Trunkationen entfernen (p97-ΔC, p97-ΔD2-C), sodass die Bindung zwischen der PUB-Domäne und dem C-Terminus nicht stattfinden kann.

Durch diesen Modellentfaltungskomplex konnte im Pulldown, als auch in den Aktivitätsassay gezeigt werden (siehe Abb. 5.14), dass UBXD1 an einen Entfaltungskomplex binden kann, ohne die ATPase-Aktivität und somit den Entfaltungsprozess zu inhibieren. Dabei kann wahrscheinlich UBXD1 flexibel als Substratadapater an unterschiedliche Entfaltungskomplexe binden, unter der Voraussetzung, dass die C-terminale Bindestelle von p97 zugänglich ist.

Aufgrund der Hypothese, dass UBXD1 die Funktion als Substratadapater oder Substratprozessierungsfaktor ausübt, liegt es Nahe, dass UBXD1 auch eine Verbindung zum proteasomalen Abbau herstellen könnte, um entfaltete Substrate zum Abbau zu übergeben.

In Kapitel 5.7 konnte die Bindung der UBXD1-PUB-Domäne zur UBL-Domäne des Proteasomtransportfaktors nachgewiesen werden. Für UBXD1 konnte die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration und anschließende *docking*-Rechnung (siehe Abb. 5.15) zeigen, dass die HR23-UBL-Domäne nicht die Bindungstasche des C-terminalen Peptides von p97 blockiert. Zur Veranschaulichung wurde die *docking*-Rechnung von PUB mit UBL mit dem bereits publizierten PUB:p97-C-Terminus-Komplex von Blueggel *et al.*<sup>51</sup> kombiniert (siehe Abb. 6.4). Die Bindetasche des p97-C-Peptides liegt zwischen der zweiten  $\alpha$ -Helix ( $\alpha_2$ ) und dem ersten  $\beta$ -Strang ( $\beta_1$ ), wohingegen die UBL-Domäne an den Bereich des zweiten und dritten  $\beta$ -Strangs ( $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) und der sechsten  $\alpha$ -Helix ( $\alpha_6$ ) bindet (siehe Abb. 6.4).

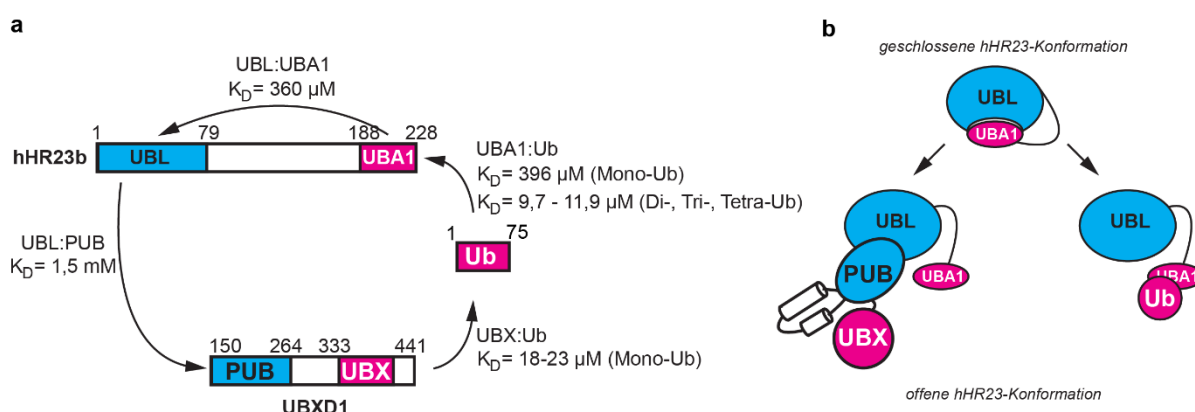


**Abb. 6.4 Strukturmodell des ternären UBXD1:p97:HR23-Komplexes.**

Links: Domänenstruktur des Komplexes aus p97 mit UBXD1 und der HR23-UBL-Domäne. Rechts: Strukturmodell aus *docking*-Rechnung von UBXD1-PUB-Domäne mit HR23-UBL-Domäne aus Abb. 5.15 e mit dem C-terminalen Peptid von p97, nach Blueggel *et al.*<sup>51</sup>.

Die hHR23b-UBL-Domäne bindet intern an seine UBA-Domänen (UBA1  $K_D = 360 \mu\text{M}$  und UBA2), als auch an die UBXD1-PUB-Domäne ( $K_D = 1,5 \text{ mM}$ ). Die UBA1-Domäne bindet an die UBL-Domäne, als auch an Ubiquitin (Mono-Ubiquitin  $K_D = 369 \mu\text{M}$ , Di- bis Tetra-Ubiquitin  $K_D$  zwischen  $9,7$ - $11,9 \mu\text{M}$ ) (siehe Abb. 6.5 a). Durch die Möglichkeit das hHR23 zwei Bindungspartner UBXD1 und/oder Ubiquitin binden kann, könnten UBXD1 und Ubiquitin bei der möglichen Konformationsänderung von hHR23 miteinander konkurrieren (siehe Abb. 6.5 b). Im freien Zustand liegt das HR23-Protein intramolekular in einer geschlossenen Konformation vor. Dabei bindet die UBL-Domäne eine der beiden UBA-Domänen, wodurch die Bindestelle der UBL für die PUB-Domäne besetzt ist (siehe Kapitel 5.7.3). Kamiya *et al.*<sup>89</sup> haben für die homologe PUB-Domäne der PNGase beschrieben, dass sich die Konformation von HR23 durch die Bindung der HR23-UBL-Domäne an die PUB-Domäne öffnet und somit die UBA-Domänen Ubiquitinketten binden können. Die Dissoziationskonstanten der isolierten Domänen / Proteinkonstrukten von hHR23b, UBXD1 und Ubiquitin befinden sich im niedrigen mikromolaren, sowie dem millimolaren Konzentrationsbereich. Dadurch lassen mögliche

präferierte Interaktionen der einzelnen Domänen ableiten, jedoch keine Aussagen über das genaue Zusammenspiel der volle-länge-Proteine treffen. Eine mögliche Hypothese ist, dass durch die Bindung von UBXD1-PUB an hHR23-UBL die Bindung zwischen UBL und UBA aufgehoben werden könnte und aufgrund der räumlichen Nähe der Ubiquitinbindenden UBX- und UBA-Domänen somit ubiquitinylierte Substrate übergeben werden. Diese Hypothese muss noch mit einem Additions-Experiment überprüft werden, ob beide Bindungen simultan bestehen können. Dafür könnten beide Bindungspartner schrittweise in einer  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration zur  $^{15}\text{N}$ -PUB-Domäne oder Fluoreszenzanisotropie-Titrations mit fluoreszenzmarkierten Liganden durchgeführt werden.



**Abb. 6.5 Zusammenfassung hHR23-UBXD1-Ubiquitin-Interaktion.**

**a:** Domänenarchitektur von hHR23, UBXD1 und Ubiquitin, sowie die Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) nachgewiesenen Bindungen. **b:** Mögliche Bindungen die zur Änderung der Konformation beitragen könnten. In der geschlossenen hHR23-Konformation binden intramolekular die UBL- und UBA1-Domäne aneinander. Durch die Bindung eines weiteren Bindungspartners UBXD1 an UBL oder Ubiquitin an UBA1 könnte sich die Konformation ändern.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, dass UBXD1 sowohl Ubiquitin, als auch ubiquitinylierte Substrate binden kann (siehe Kapitel 5.1 und 5.3) würden man ihm die Funktion als Substratadapter zuordnen. UBXD1 inhibiert die ATPase-Aktivität über die Bindung vom N-Terminus an die p97-N-Domäne (siehe Kapitel 5.6.1, Abb. 6.6 Punkt (1)). Dazu kann UBXD1 in Entfaltungskomplexen gebunden vorliegen ohne den Entfaltungskomplex zu inhibieren (siehe Kapitel 5.6.2, Abb. 6.6 Punkt (2)). Dabei wäre es möglich, dass UBXD1 wie bereits von Kern *et al.*<sup>49</sup> postuliert als Reset- oder Stopp-Knopf fungiert. UBXD1 könnte über seinen N-Terminus die ATPase-Aktivität inhibieren und den Entfaltungsprozess stoppen, falls es zu fehlerhaften Abläufen beim Prozess kommt.

Da sich die Ubiquitin-bindende Domäne UBX an der trans-Seite von p97 (D2-Domäne) befindet (siehe Abb. 5.12 f), liegt die Vermutung nahe, dass UBXD1 das Ubiquitin des entfaltenden Substrates für eine weitere Prozessierung bindet. Diese Vermutung kann durch die Interaktion mit dem Proteasomtransportfaktor HR23 bestätigt werden (siehe Kapitel 5.7,

Abb. 6.6 Punkt (4)). Ungebunden an einen Cofaktor liegt HR23 intramolekular in einer geschlossenen Konformation vor (siehe Abb. 5.16, Abb. 6.6 Punkt (8))<sup>89,116</sup>. Durch die Bindung der HR23-UBL-Domäne an die UBXD1-PUB-Domäne kann sich die Konformation von HR23 öffnen, wodurch die Ubiquitinbindestellen der UBA-Domänen (UBA1, UBA2) zugänglich werden und diese das ubiquitinylierte Substrat binden können (siehe Abb. 6.6 Punkt (5)). Da die UBA1-Domäne im Gegensatz zur UBXD1-UBX-Domäne favorisiert Ubiquitinketten mit einem niedrigeren  $K_D$ -Wert bindet, kann das ubiquitinylierte Substrat an HR23 übergeben, zum 26S Proteasome transportiert und anschließend abgebaut werden (Abb. 6.6 Punkt (6-7)).

**Bildunterschrift zu Abb. 6.6 auf der folgenden Seite:**

**(1)** Durch die Bindung von UBXD1 an den N-Terminus wird die ATPase-Aktivität inhibiert. Zusätzlich bindet die PUB-Domäne an den C-Terminus und der UBXD1-Linker an die p97-D2-Domäne. **(2)** Durch Substratadapter-Cofaktoren (SA, z.B. Ufd1:Npl4) an der p97-N-Domäne können ubiquitinylierte Substrate gebunden und entfaltet werden. **(3)** Nach der erfolgten Entfaltung des Substrates bindet die UBXD1-UBX-Domäne nach Austritt aus der Pore an das rückgefaltete Ubiquitin des Substrates. **(4)** Der Proteasometransportfaktor HR23 bindet über die UBL-Domäne an die PUB-Domäne, wodurch sich die Konformation von geschlossen zu geöffnet ändert. Ob sich nach der Entfaltung des Substrates der Substratadapter lösen muss in Zukunft untersucht werden. Sollte der Substratadapter sich aus dem Komplex gelöst haben, kann der UBXD1-N-Terminus an die p97-N-Domäne binden und durch die Inhibierung der ATPase-Aktivität den Entfaltungsprozess stoppen. **(5)** Die freien UBA-Domänen von HR23 (UBA1, UBA2) können an die Ubiquitinkette des ubiquitinylierten Substrates binden. Dabei übergibt die UBX-Domäne das gebundene Substrat an HR23. **(6)** Über das HR23-Protein wird das Substrat zum Proteasome transportiert. **(7)** Die HR23-UBL-Domäne bindet an die Untereinheit des 26S Proteasomes, wodurch das ubiquitinylierte Substrat abgebaut werden kann. **(8)** Nach dem erfolgten Transport bindet die UBL-Domäne an eine der beiden UBA-Domänen, wodurch der Proteasometransportfaktor in einer geschlossenen Konformation vorliegt.



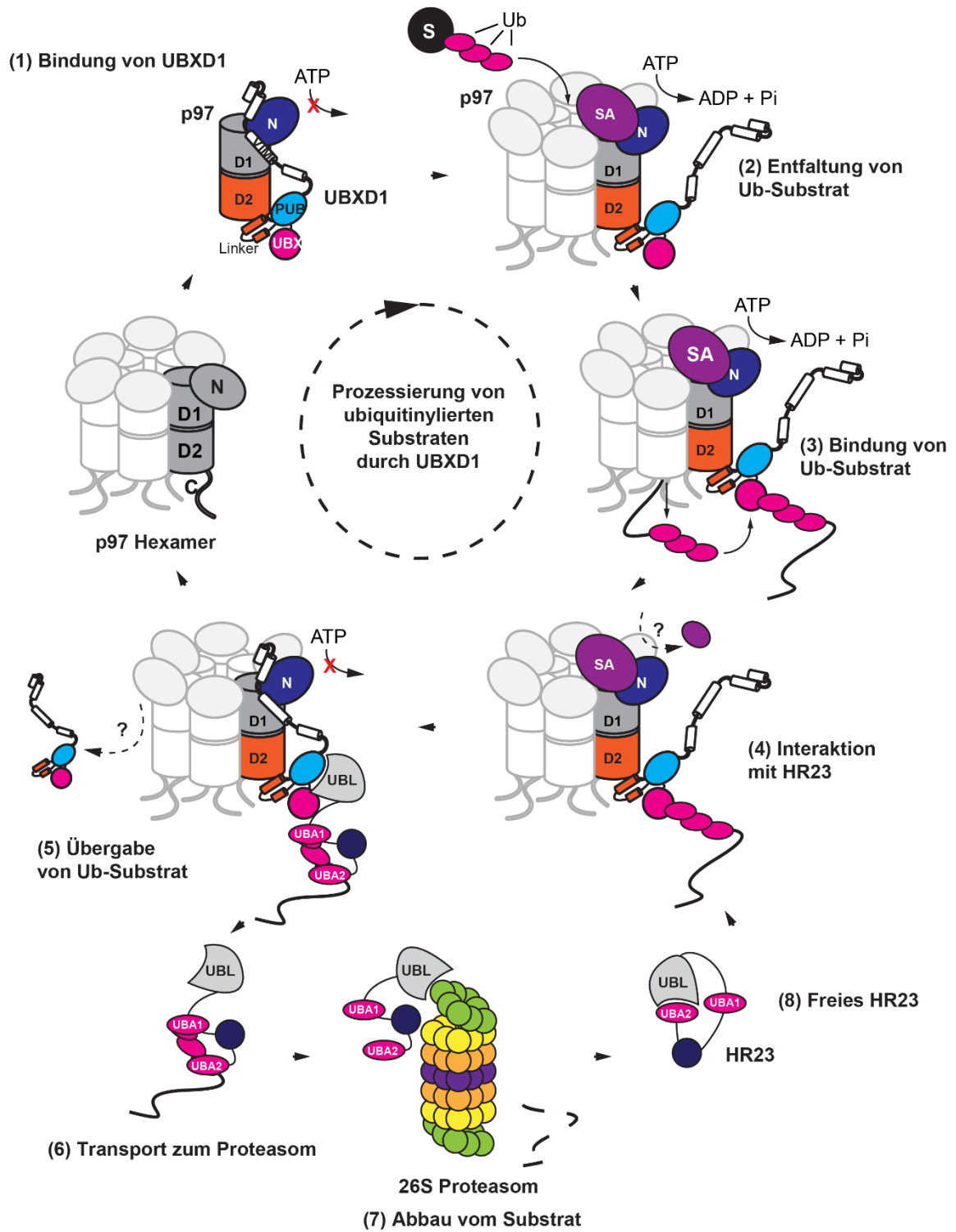


Abb. 6.6 Modellablauf zur Prozessierung von ubiquitinylierten Substraten durch p97:UBXD1-Komplex und Transport zum 26S Proteasome über HR23.  
Bildunterschrift auf der vorherigen Seite.

## 7 Ausblick

Mit Hilfe von Pulldown-Experimenten und Interaktionsstudien konnte die Bindung von UBXD1 zu Ubiquitin biochemisch charakterisiert werden. Durch einen Peptid-Array mit Mutationsmatrix und einem Alanin-Screening wurden für die Interaktion beteiligte Aminosäuren identifiziert. Um diese Bindung im Detail zu untersuchen, sollten zunächst die UBX-Mutanten (R272, R274, R275, F277, Q278, K320, T352, Y363, R367) in *E. coli* überexprimiert und gereinigt werden, um die Dissoziationskonstante  $K_D$  mit Ubiquitin für die jeweilige Mutante mittels Fluoreszenzanisotropie zu bestimmen. Dadurch konnten für die Interaktion wichtige Aminosäuren weiter identifiziert und bestätigt werden.

Da von der Struktur der UBXD1-UBX-Domäne keine Proteinstruktur vorhanden ist, könnte diese ggf. auch im Komplex mit Ubiquitin durch Proteinkristallisation oder Cryo-EM ermittelt werden. Durch die geringe Ausbeute der Proteinexpression des UBXD1-Linker-UBX-C-Proteins ist keine Isotopenmarkierung für NMR-Messungen möglich.

UBXD1 wurde mit unterschiedlichen Interaktionspartnern<sup>66</sup> und Entfaltungskomplexen (ELDR<sup>21</sup>, MAD<sup>74</sup>) in Verbindung gebracht. Die Aktivität dieser Komplexe kann mit dem Prinzip des Entfaltungssassays mit fluoreszierenden Substraten weiter *in vitro* untersucht werden. Ob UBXD1 als Reset- oder Stop-Knopf<sup>49</sup> beim Entfaltungsprozess fungiert würde sich mittels eines Entfaltungssassay weiter untersuchen lassen. Diese Hypothese könnte über einen modifizierten Entfaltungskomplex untersucht werden, indem man das Substrat über photo-reaktives Crosslinking während des Entfaltungskomplexes fixiert und somit den Ablauf der Entfaltung stört oder das Substrat gezielt während der Entfaltung zum Aggregieren bringt. Die intramolekulare Bindung der UBL- und UBA-Domäne von HR23 konnte nachgewiesen werden, doch sollte die Konformationsänderung von einer geschlossenen zu einer offenen Konformation im Zusammenhang mit der Bindung der UBXD1-PUB-Domäne untersucht werden. Dazu sollten mit dem HR23b-UBL-UBA1 Protein Relaxationsexperimente (t1, t2, hetNOE) mittels NMR-Spektroskopie durchgeführt werden. Dafür wurden bereits in Kapitel 5.7.4 die  $H_N-N_H$ -Signale des UBL-UBA1-Proteins den jeweiligen Aminosäuren im  $^1H-^{15}N$ -HSQC-Spektrum zugeordnet. Durch den Einsatz von Proteinkristallographie oder Cryo-EM kann auch die Proteinkomplexstruktur von hHR23:UBXD1 aufgeklärt werden.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Komander, D. & Rape, M. The ubiquitin code. *Annual review of biochemistry* **81**, 203–229; 10.1146/annurev-biochem-060310-170328 (2012).
2. Clague, M. J. & Urbé, S. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* **143**, 682–685; 10.1016/j.cell.2010.11.012 (2010).
3. Vijay-kumar, S., Bugg, C. E. & Cook, W. J. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *Journal of molecular biology* **194**, 531–544; 10.1016/0022-2836(87)90679-6 (1987).
4. Dikic, I., Wakatsuki, S. & Walters, K. J. Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 659–671; 10.1038/nrm2767 (2009).
5. Fu, Q.-S. *et al.* Structural basis for ubiquitin recognition by a novel domain from human phospholipase A2-activating protein. *The Journal of biological chemistry* **284**, 19043–19052; 10.1074/jbc.M109.009126 (2009).
6. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. & Gatto, G. J. *Stryer Biochemie*. 7th ed. (Springer, Berlin, 2012).
7. Li, W. & Ye, Y. Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 2397–2406; 10.1007/s00018-008-8090-6 (2008).
8. Chau, V. *et al.* A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science (New York, N.Y.)* **243**, 1576–1583; 10.1126/science.2538923 (1989).
9. Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. & Pickart, C. M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal* **19**, 94–102; 10.1093/emboj/19.1.94 (2000).
10. Ye, Y. Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *Journal of structural biology* **156**, 29–40; 10.1016/j.jsb.2006.01.005 (2006).
11. Jentsch, S. & Rumpf, S. Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway? *Trends in biochemical sciences* **32**, 6–11; 10.1016/j.tibs.2006.11.005 (2007).
12. Kim, H. T. *et al.* Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *The Journal of biological chemistry* **282**, 17375–17386; 10.1074/jbc.M609659200 (2007).
13. Babu, J. R., Geetha, T. & Wooten, M. W. Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *Journal of neurochemistry* **94**, 192–203; 10.1111/j.1471-4159.2005.03181.x (2005).

14. Reggiori, F. & Klionsky, D. J. Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Current opinion in cell biology* **17**, 415–422; 10.1016/j.ceb.2005.06.007 (2005).
15. Xu, P. *et al.* Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133–145; 10.1016/j.cell.2009.01.041 (2009).
16. Swatek, K. N. & Komander, D. Ubiquitin modifications. *Cell research* **26**, 399–422; 10.1038/cr.2016.39 (2016).
17. Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. L. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry* **65**, 801–847; 10.1146/annurev.bi.65.070196.004101 (1996).
18. van den Boom, J. & Meyer, H. VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling. *Molecular cell* **69**, 182–194; 10.1016/j.molcel.2017.10.028 (2018).
19. Hänzelmann, P. & Schindelin, H. The Interplay of Cofactor Interactions and Post-translational Modifications in the Regulation of the AAA+ ATPase p97. *Frontiers in molecular biosciences* **4**, 21; 10.3389/fmolb.2017.00021 (2017).
20. Hänzelmann, P. & Schindelin, H. The structural and functional basis of the p97/valosin-containing protein (VCP)-interacting motif (VIM): mutually exclusive binding of cofactors to the N-terminal domain of p97. *The Journal of biological chemistry* **286**, 38679–38690; 10.1074/jbc.M111.274506 (2011).
21. Papadopoulos, C. *et al.* VCP/p97 cooperates with YOD1, UBXD1 and PLAA to drive clearance of ruptured lysosomes by autophagy. *The EMBO journal* **36**, 135–150; 10.15252/emj.201695148 (2017).
22. Meyer, H. & Wehl, C. C. The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *Journal of cell science* **127**, 3877–3883; 10.1242/jcs.093831 (2014).
23. Meyer, H., Bug, M. & Bremer, S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature cell biology* **14**, 117–123; 10.1038/ncb2407 (2012).
24. Stolz, A., Hilt, W., Buchberger, A. & Wolf, D. H. Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends in biochemical sciences* **36**, 515–523; 10.1016/j.tibs.2011.06.001 (2011).
25. Wolf, D. H. & Stolz, A. The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Biochimica et biophysica acta* **1823**, 117–124; 10.1016/j.bbamcr.2011.09.002 (2012).

26. Buchberger, A., Schindelin, H. & Hänzelmann, P. Control of p97 function by cofactor binding. *FEBS letters* **589**, 2578–2589; 10.1016/j.febslet.2015.08.028 (2015).
27. Moir, D., Stewart, S. E., Osmond, B. C. & Botstein, D. Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**, 547–563; 10.1093/genetics/100.4.547 (1982).
28. Fröhlich, K. U. *et al.* Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *The Journal of cell biology* **114**, 443–453; 10.1083/jcb.114.3.443 (1991).
29. Peters, J.-M. *et al.* Ubiquitous soluble Mg<sup>2+</sup>-ATPase complex. *Journal of molecular biology* **223**, 557–571; 10.1016/0022-2836(92)90670-F (1992).
30. Feiler, H. S. *et al.* The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *The EMBO journal* **14**, 5626–5637; 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00250.x (1995).
31. Lamb, J. R., Fu, V., Wirtz, E. & Bangs, J. D. Functional analysis of the trypanosomal AAA protein TbVCP with trans-dominant ATP hydrolysis mutants. *The Journal of biological chemistry* **276**, 21512–21520; 10.1074/jbc.M100235200 (2001).
32. Pamnani, V. *et al.* Cloning, sequencing and expression of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS letters* **404**, 263–268; 10.1016/S0014-5793(97)00138-5 (1997).
33. Rockel, B. *et al.* Structure of VAT, a CDC48/p97 ATPase homologue from the archaeon *Thermoplasma acidophilum* as studied by electron tomography. *FEBS letters* **451**, 27–32; 10.1016/S0014-5793(99)00431-7 (1999).
34. Huang, R., Ripstein, Z. A., Rubinstein, J. L. & Kay, L. E. Cooperative subunit dynamics modulate p97 function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 158–167; 10.1073/pnas.1815495116 (2019).
35. Tang, W. K. & Di Xia. Mutations in the Human AAA+ Chaperone p97 and Related Diseases. *Frontiers in molecular biosciences* **3**, 79; 10.3389/fmolb.2016.00079 (2016).
36. Zhang, X. *et al.* Structure of the AAA ATPase p97. *Molecular cell* **6**, 1473–1484; 10.1016/S1097-2765(00)00143-X (2000).
37. Banerjee, S. *et al.* 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition. *Science (New York, N.Y.)* **351**, 871–875; 10.1126/science.aad7974 (2016).

38. Madsen, L., Seeger, M., Semple, C. A. & Hartmann-Petersen, R. New ATPase regulators—p97 goes to the PUB. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 2380–2388; 10.1016/j.biocel.2009.05.017 (2009).
39. Kondo, H. *et al.* p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* **388**, 75–78; 10.1038/40411 (1997).
40. Uchiyama, K. *et al.* p37 is a p97 adaptor required for Golgi and ER biogenesis in interphase and at the end of mitosis. *Developmental cell* **11**, 803–816; 10.1016/j.devcel.2006.10.016 (2006).
41. Song, E. J., Yim, S.-H., Kim, E., Kim, N.-S. & Lee, K.-J. Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway. *Molecular and cellular biology* **25**, 2511–2524; 10.1128/MCB.25.6.2511-2524.2005 (2005).
42. McNeill, H., Knebel, A., Arthur, J. S. C., Cuenda, A. & Cohen, P. A novel UBA and UBX domain protein that binds polyubiquitin and VCP and is a substrate for SAPKs. *The Biochemical journal* **384**, 391–400; 10.1042/BJ20041498 (2004).
43. Meyer, H. H., Shorter, J. G., Seemann, J., Pappin, D. & Warren, G. A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *The EMBO journal* **19**, 2181–2192; 10.1093/emboj/19.10.2181 (2000).
44. Rumpf, S. & Jentsch, S. Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Molecular cell* **21**, 261–269; 10.1016/j.molcel.2005.12.014 (2006).
45. Ye, Y. *et al.* Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14132–14138; 10.1073/pnas.0505006102 (2005).
46. Schulze, A. *et al.* The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *Journal of molecular biology* **354**, 1021–1027; 10.1016/j.jmb.2005.10.020 (2005).
47. Wang, Q., Li, L. & Ye, Y. Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *The Journal of cell biology* **174**, 963–971; 10.1083/jcb.200605100 (2006).
48. Trusch, F. *et al.* The N-terminal Region of the Ubiquitin Regulatory X (UBX) Domain-containing Protein 1 (UBXD1) Modulates Interdomain Communication within the Valosin-

- containing Protein p97. *The Journal of biological chemistry* **290**, 29414–29427; 10.1074/jbc.M115.680686 (2015).
49. Kern, M., Fernandez-Sáiz, V., Schäfer, Z. & Buchberger, A. UBXD1 binds p97 through two independent binding sites. *Biochemical and biophysical research communications* **380**, 303–307; 10.1016/j.bbrc.2009.01.076 (2009).
50. Ballar, P., Shen, Y., Yang, H. & Fang, S. The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 35359–35368; 10.1074/jbc.M603355200 (2006).
51. Blueggel, M., van den Boom, J., Meyer, H., Bayer, P. & Beuck, C. Structure of the PUB Domain from Ubiquitin Regulatory X Domain Protein 1 (UBXD1) and Its Interaction with the p97 AAA+ ATPase. *Biomolecules* **9**; 10.3390/biom9120876 (2019).
52. Zhao, G. *et al.* Studies on peptide:N-glycanase-p97 interaction suggest that p97 phosphorylation modulates endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8785–8790; 10.1073/pnas.0702966104 (2007).
53. Allen, M. D., Buchberger, A. & Bycroft, M. The PUB domain functions as a p97 binding module in human peptide N-glycanase. *The Journal of biological chemistry* **281**, 25502–25508; 10.1074/jbc.M601173200 (2006).
54. Schaeffer, V. *et al.* Binding of OTULIN to the PUB domain of HOIP controls NF- $\kappa$ B signaling. *Molecular cell* **54**, 349–361; 10.1016/j.molcel.2014.03.016 (2014).
55. Qiu, L. *et al.* Structure and function of the PLAA/Ufd3-p97/Cdc48 complex. *The Journal of biological chemistry* **285**, 365–372; 10.1074/jbc.M109.044685 (2010).
56. Kim, K. H., Kang, W., Suh, S. W. & Yang, J. K. Crystal structure of FAF1 UBX domain in complex with p97/VCP N domain reveals a conformational change in the conserved FcisP touch-turn motif of UBX domain. *Proteins* **79**, 2583–2587; 10.1002/prot.23073 (2011).
57. Song, C., Wang, Q. & Li, C.-C. H. ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. *The Journal of biological chemistry* **278**, 3648–3655; 10.1074/jbc.M208422200 (2003).
58. Meyer, H. H., Kondo, H. & Warren, G. The p47 co-factor regulates the ATPase activity of the membrane fusion protein, p97. *FEBS letters* **437**, 255–257; 10.1016/S0014-5793(98)01232-0 (1998).

59. Zhang, X. *et al.* Altered cofactor regulation with disease-associated p97/VCP mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E1705-14; 10.1073/pnas.1418820112 (2015).
60. Blythe, E. E., Olson, K. C., Chau, V. & Deshaies, R. J. Ubiquitin- and ATP-dependent unfoldase activity of P97/VCP•NPLOC4•UFD1L is enhanced by a mutation that causes multisystem proteinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E4380-E4388; 10.1073/pnas.1706205114 (2017).
61. Tonddast-Navaei, S. & Stan, G. Mechanism of transient binding and release of substrate protein during the allosteric cycle of the p97 nanomachine. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 14627–14636; 10.1021/ja404051b (2013).
62. Twomey, E. C. *et al.* Substrate processing by the Cdc48 ATPase complex is initiated by ubiquitin unfolding. *Science (New York, N.Y.)* **365**; 10.1126/science.aax1033 (2019).
63. Carim-Todd, L., Escarceller, M., Estivill, X. & Sumoy, L. Identification and characterization of UBXD1, a novel UBX domain-containing gene on human chromosome 19p13, and its mouse ortholog. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1517**, 298–301; 10.1016/s0167-4781(00)00248-7 (2001).
64. Madsen, L. *et al.* Ubx1 is a novel co-factor of the human p97 ATPase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 2927–2942; 10.1016/j.biocel.2008.06.008 (2008).
65. Nagahama, M. *et al.* UBXD1 is a VCP-interacting protein that is involved in ER-associated degradation. *Biochemical and biophysical research communications* **382**, 303–308; 10.1016/j.bbrc.2009.03.012 (2009).
66. Ritz, D. *et al.* Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. *Nature cell biology* **13**, 1116–1123; 10.1038/ncb2301 (2011).
67. Blüggel, M. *Untersuchung der Bindung der UBXD1-PUB-Domäne und deren Mutanten an die AAA-ATPase p97. Masterarbeit (M.Sc.)* (2019).
68. Elliott, P. R. *et al.* Molecular basis and regulation of OTULIN-LUBAC interaction. *Molecular cell* **54**, 335–348; 10.1016/j.molcel.2014.03.018 (2014).
69. Elliott, P. R. *et al.* SPATA2 Links CYLD to LUBAC, Activates CYLD, and Controls LUBAC Signaling. *Molecular cell* **63**, 990–1005; 10.1016/j.molcel.2016.08.001 (2016).



70. Schubert, C. & Buchberger, A. UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 2360–2371; 10.1007/s00018-008-8072-8 (2008).
71. Buchberger, A., Howard, M. J., Proctor, M. & Bycroft, M. The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. *Journal of molecular biology* **307**, 17–24; 10.1006/jmbi.2000.4462 (2001).
72. Dreveny, I. *et al.* Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *The EMBO journal* **23**, 1030–1039; 10.1038/sj.emboj.7600139 (2004).
73. Bento, A. C. *et al.* UBXD1 is a mitochondrial recruitment factor for p97/VCP and promotes mitophagy. *Scientific reports* **8**, 12415; 10.1038/s41598-018-30963-z (2018).
74. Guo, X. & Qi, X. VCP cooperates with UBXD1 to degrade mitochondrial outer membrane protein MCL1 in model of Huntington's disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* **1863**, 552–559; 10.1016/j.bbadis.2016.11.026 (2017).
75. Walters, K. J., Kleijnen, M. F., Goh, A. M., Wagner, G. & Howley, P. M. Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a. *Biochemistry* **41**, 1767–1777; 10.1021/bi011892y (2002).
76. 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* **8**; 10.3390/cells8010040 (2019).
77. Mueller, T. D. & Feigon, J. Solution Structures of UBA Domains Reveal a Conserved Hydrophobic Surface for Protein–Protein Interactions. *Journal of molecular biology* **319**, 1243–1255; 10.1016/S0022-2836(02)00302-9 (2002).
78. Hofmann, K. & Bucher, P. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends in biochemical sciences* **21**, 172–173; 10.1016/S0968-0004(96)30015-7 (1996).
79. Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T. G. & Madura, K. Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO reports* **2**, 933–938; 10.1093/embo-reports/kve203 (2001).
80. Walters, K. J., Lech, P. J., Goh, A. M., Wang, Q. & Howley, P. M. DNA-repair protein hHR23a alters its protein structure upon binding proteasomal subunit S5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12694–12699; 10.1073/pnas.1634989100 (2003).

81. van Laar, T., van der Eb, A. J. & Terleth, C. A role for Rad23 proteins in 26S proteasome-dependent protein degradation? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **499**, 53–61; 10.1016/S0027-5107(01)00291-3 (2002).
82. Ryu, K.-S. *et al.* Binding surface mapping of intra- and interdomain interactions among hHR23B, ubiquitin, and polyubiquitin binding site 2 of S5a. *The Journal of biological chemistry* **278**, 36621–36627; 10.1074/jbc.M304628200 (2003).
83. Wade, S. L. & Auble, D. T. The Rad23 ubiquitin receptor, the proteasome and functional specificity in transcriptional control. *Transcription* **1**, 22–26; 10.4161/trns.1.1.12201 (2010).
84. Kim, I., Mi, K. & Rao, H. Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis. *Molecular biology of the cell* **15**, 3357–3365; 10.1091/mbc.e03-11-0835 (2004).
85. Raasi, S., Orlov, I., Fleming, K. G. & Pickart, C. M. Binding of polyubiquitin chains to ubiquitin-associated (UBA) domains of HHR23A. *Journal of molecular biology* **341**, 1367–1379; 10.1016/j.jmb.2004.06.057 (2004).
86. Elsasser, S. *et al.* Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nature cell biology* **4**, 725–730; 10.1038/ncb845 (2002).
87. 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* **296**, 813–819; 10.1016/S0006-291X(02)02002-8 (2002).
88. Medina, B. *et al.* The ubiquitin-associated (UBA) 1 domain of *Schizosaccharomyces pombe* Rhp23 is essential for the recognition of ubiquitin-proteasome system substrates both in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **287**, 42344–42351; 10.1074/jbc.M112.419838 (2012).
89. Kamiya, Y. *et al.* NMR characterization of the interaction between the PUB domain of peptide:N-glycanase and ubiquitin-like domain of HR23. *FEBS letters* **586**, 1141–1146; 10.1016/j.febslet.2012.03.027 (2012).
90. Kang, Y., Chen, X., Lary, J. W., Cole, J. L. & Walters, K. J. Defining how ubiquitin receptors hHR23a and S5a bind polyubiquitin. *Journal of molecular biology* **369**, 168–176; 10.1016/j.jmb.2007.03.008 (2007).
91. Raasi, S. & Pickart, C. M. Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains. *The Journal of biological chemistry* **278**, 8951–8959; 10.1074/jbc.m212841200 (2003).

92. Keller, R. *The computer aided resonance assignment tutorial*. 1st ed. (Cantina Verl., Goldau, 2004).
93. Whitmore, L. & Wallace, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic acids research* **32**, W668-73; 10.1093/nar/gkh371 (2004).
94. Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400; 10.1002/bip.20853 (2008).
95. Miles, A. J., Ramalli, S. G. & Wallace, B. A. DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data. *Protein science : a publication of the Protein Society* **31**, 37–46; 10.1002/pro.4153 (2022).
96. van Zundert, G. C. P. *et al.* The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *Journal of molecular biology* **428**, 720–725; 10.1016/j.jmb.2015.09.014 (2016).
97. Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A. M. J. J. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 1731–1737; 10.1021/ja026939x (2003).
98. Meyer, H. H., Wang, Y. & Warren, G. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *The EMBO journal* **21**, 5645–5652; 10.1093/emboj/cdf579 (2002).
99. Dong, K. C. *et al.* Preparation of distinct ubiquitin chain reagents of high purity and yield. *Structure (London, England : 1993)* **19**, 1053–1063; 10.1016/j.str.2011.06.010 (2011).
100. Her, N.-G. *et al.* p97 Composition Changes Caused by Allosteric Inhibition Are Suppressed by an On-Target Mechanism that Increases the Enzyme's ATPase Activity. *Cell chemical biology* **23**, 517–528; 10.1016/j.chembiol.2016.03.012 (2016).
101. Schuetz, A. K. & Kay, L. E. A Dynamic molecular basis for malfunction in disease mutants of p97/VCP. *eLife* **5**; 10.7554/eLife.20143 (2016).
102. Yang, J. *et al.* The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods* **12**, 7–8; 10.1038/nmeth.3213 (2015).
103. Yang, J. & Zhang, Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic acids research* **43**, W174-81; 10.1093/nar/gkv342 (2015).

104. Zheng, W. *et al.* Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell reports methods* **1**; 10.1016/j.crmeth.2021.100014 (2021).
105. Arumughan, A. *et al.* Quantitative interaction mapping reveals an extended UBX domain in ASPL that disrupts functional p97 hexamers. *Nature communications* **7**, 13047; 10.1038/ncomms13047 (2016).
106. Varadi, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research* **50**, D439-D444; 10.1093/nar/gkab1061 (2022).
107. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589; 10.1038/s41586-021-03819-2 (2021).
108. Shih, S. C. *et al.* A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *The EMBO journal* **22**, 1273–1281; 10.1093/emboj/cdg140 (2003).
109. McIntyre, J. *et al.* Ubiquitin mediates the physical and functional interaction between human DNA polymerases  $\eta$  and  $\iota$ . *Nucleic acids research* **41**, 1649–1660; 10.1093/nar/gks1277 (2013).
110. Saha, A., Lewis, S., Kleiger, G., Kuhlman, B. & Deshaies, R. J. Essential role for ubiquitin-ubiquitin-conjugating enzyme interaction in ubiquitin discharge from Cdc34 to substrate. *Molecular cell* **42**, 75–83; 10.1016/j.molcel.2011.03.016 (2011).
111. Bayer, P., Matena, A. & Beuck, C. NMR Spectroscopy of supramolecular chemistry on protein surfaces. *Beilstein journal of organic chemistry* **16**, 2505–2522; 10.3762/bjoc.16.203 (2020).
112. Weith, M. *et al.* Ubiquitin-Independent Disassembly by a p97 AAA-ATPase Complex Drives PP1 Holoenzyme Formation. *Molecular cell* **72**, 766-777.e6; 10.1016/j.molcel.2018.09.020 (2018).
113. Bodnar, N. O. & Rapoport, T. A. Molecular Mechanism of Substrate Processing by the Cdc48 ATPase Complex. *Cell* **169**, 722-735.e9; 10.1016/j.cell.2017.04.020 (2017).
114. Papadopoulos, C. & Meyer, H. Detection and Clearance of Damaged Lysosomes by the Endo-Lysosomal Damage Response and Lysophagy. *Current biology : CB* **27**, R1330-R1341; 10.1016/j.cub.2017.11.012 (2017).
115. Lee, J.-H., Choi, J. M., Lee, C., Yi, K. J. & Cho, Y. Structure of a peptide:N-glycanase-Rad23 complex: insight into the deglycosylation for denatured glycoproteins. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 9144–9149; 10.1073/pnas.0502082102 (2005).
116. Jung, J. *et al.* Binding of HIV-1 Vpr protein to the human homolog of the yeast DNA repair protein RAD23 (hHR23A) requires its xeroderma pigmentosum complementation group C binding (XPCB) domain as well as the ubiquitin-associated 2 (UBA2) domain. *The Journal of biological chemistry* **289**, 2577–2588; 10.1074/jbc.M113.534453 (2014).
117. Kirupakaran, A. *Multivalente Pinzetten zur Erkennung von Poren, Schleifen und Flanken auf Proteinoberflächen. Dissertation* (2022).
118. Haines, D. S. *et al.* Protein interaction profiling of the p97 adaptor UBXD1 points to a role for the complex in modulating ERGIC-53 trafficking. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, M111.016444; 10.1074/mcp.M111.016444 (2012).
119. Prophet, S. M., Naughton, B. S. & Schlieker, C. p97/UBXD1 Generate Ubiquitylated Proteins That Are Sequestered into Nuclear Envelope Herniations in Torsin-Deficient Cells. *International journal of molecular sciences* **23**; 10.3390/ijms23094627 (2022).

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1 Ubiquitin als Posttranslationale Modifikation. ....	4
Abb. 3.2 Proteasomaler Abbau von Proteinen nach Berg und Tymoczko <sup>6</sup> . ....	5
Abb. 3.3 Struktur der AAA-ATPase p97. ....	8
Abb. 3.4 Domänenstruktur von UBXD1. ....	13
Abb. 3.5 UBXD1-Domänen Strukturen. ....	14
Abb. 3.6 Die UBX-Domänen zeigen eine Ubiquitin Faltung. ....	14
Abb. 3.7 Proteinstruktur von HR23. ....	17
Abb. 4.1 Verwendeter Proteinmarker. ....	23
Abb. 5.1 UBXD1 bindet Ubiquitin durch seine UBX-Domäne. ....	60
Abb. 5.2 Chemisches Crosslinking von UBXD1. ....	62
Abb. 5.3 Intramolekulare Interaktion von UBXD1 in Abwesenheit von p97. ....	64
Abb. 5.4 Berechnete Strukturmodelle von UBXD1 mittels iTASSER und AlphaFold. ....	65
Abb. 5.5 Erweiterte UBX-Domäne von UBXD1 sorgt für intramolekulare Interaktion. ....	68
Abb. 5.6 Restriktionsklonierung von UBXD1-Linker. ....	70
Abb. 5.7 Proteinreinigung von Ubiquitin. ....	72
Abb. 5.8 Charakterisierung der Interaktion von UBXD1 mit Ubiquitin. ....	75
Abb. 5.9 Mutationsanalyse von UBXD1. ....	78
Abb. 5.10 Optimierung der Synthese von K48-verknüpften Ubiquitinketten. ....	81
Abb. 5.11 Interaktion von UBXD1 mit K48-Polyubiquitinketten. ....	83
Abb. 5.12 Biochemische Charakterisierung der UBXD1:p97 Interaktionen. ....	87
Abb. 5.13 Michealis-Menten-Kinetik des ATP-Umsatzes von p97 mit UBXD1. ....	91
Abb. 5.14 UBXD1 bildet mit p97 und dem Substratadapter Ufd:Npl4 einen ternären Komplex. ....	93
Abb. 5.15 UBXD1-PUB bindet an die UBL-Domäne des Proteasomtransportfaktors HR23. ....	98
Abb. 5.16 Intramolekulare Interaktion von hHR23. ....	99
Abb. 5.17 Intramolekulare Interaktion zwischen der UBL- und der UBA1/UBA2-Domäne. ....	100
Abb. 5.18 Fluoreszenzanisotropie von hHR23b-UBA1 mit Ubiquitin und kurzen K48-Ubiquitinketten. ....	101
Abb. 5.19 Sequentielle Zuordnung von hHR23b-UBA1 (Aminosäure 188-228). ....	104
Abb. 5.20 Zuordnung des Peptidrückgrats von UBL-Linker-UBA1 Protein. ....	106
Abb. 5.21 Multivalente supramolekulare Phosphat-Pinzetten. ....	107
Abb. 5.22 Supramolekulare Liganden binden an die UBL-Domäne. ....	109
Abb. 5.23 Bindung supramolekularer Liganden an hHR23b-UBL. ....	111
Abb. 5.24 Verdrängungstitration der UBXD1-PUB:hHR23b-UBL Bindung durch supramolekulare Liganden. ....	113

Abb. 6.1 UBX-Domänen homologer Proteine.....	115
Abb. 6.2 Strukturmodell von UBXD1 (150-441).....	117
Abb. 6.3 Modell vom UBXD1:p97-Komplex in Interaktion mit Ubiquitin. ....	121
Abb. 6.4 Strukturmodell des ternären UBXD1:p97:HR23-Komplexes.....	123
Abb. 6.5 Zusammenfassung hHR23-UBXD1-Ubiquitin-Interaktion.....	124
Abb. 6.6 Modellablauf zur Prozessierung von ubiquitinylierten Substraten durch p97:UBXD1-Komplex und Transport zum 26S Proteasome über HR23.....	126
Abb. 12.1 Proteinaufreinigung von UBXD1-wt, sowie UBXD1-Linker-UBX-C.....	146
Abb. 12.2 Proteinaufreinigung der E1- und E2-Enzyme mUbe1 und Ubc7.....	147
Abb. 12.3 Proteinreinigung von p97- $\Delta$ C.....	148
Abb. 12.4 Proteinreinigung verschiedener hHR23-Proteine.....	149
Abb. 12.5 Ubiquitin-GST- / GST-Westernblots der UBXD1-Pulldowns.....	159
Abb. 12.6 Kontrollen der Bindungsstudien von UBXD1/p97/Ubiquitin/SUMO1.....	163
Abb. 12.7 Fluoreszenzanisotropie-Titration von Atto594-Ubiquitin mit UBXD1- $\Delta$ UBX-C....	164
Abb. 12.8 Peptid-Array Membranen.....	164
Abb. 12.9 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrations von UBXD1-Linker, -PUB mit Ubiquitin.....	165
Abb. 12.10 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von $^{15}\text{N}$ -PUB mit hHR23-UBL-Domäne.....	166
Abb. 12.11 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von $^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL mit PUB-Domäne.....	167
Abb. 12.12 Gelfiltration von UBXD1-PUB:hHR23b-UBL Komplex.....	167
Abb. 12.13 ITC-Messungen von hHR23b-UBL mit supramolekularen Liganden CLR01 und ABS209.....	168

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1 p97-Interaktionspartner. ....	9
Tab. 4.1 Verwendete Chemikalien. ....	20
Tab. 4.2 Verwendete Antikörper für Westernblot und Co-Immunopräzipitation.....	22
Tab. 4.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien und Kits.....	22
Tab. 4.4 Verwendete Puffer. ....	24
Tab. 4.5 Verwendete Antibiotika. ....	25
Tab. 4.6 Verwendete Nährmedien.....	26
Tab. 4.7 Verwendete Plasmide zur Proteinexpression. (MB = Mike Blüggel, MK = Matthias Kracht, JvdB = Johannes van den Boom, n.b. = Angaben nicht bekannt) .....	27
Tab. 4.8 Verwendete Geräte und Software. ....	29
Tab. 4.9 PCR-Programm für QuickChange Mutagenese.....	31
Tab. 4.10 PCR-Programm für UBXD1 <i>UBX extension</i> (263-337).....	32
Tab. 4.11 Nukleotidsequenz der zur Restriktionsklonierung und Mutagenese eingesetzten Oligonukleotide. Tm bezieht sich auf die Schmelztemperatur zum Ausgangsvektor. ....	32
Tab. 4.12 Verwendete Bakterienstämme zur DNA- und Proteinexpression.....	33
Tab. 4.13 Bedingungen der Proteinexpression aller verwendeten Proteinkonstrukte. ....	35
Tab. 4.14 Protokoll der Methoden zur Proteinaufreinigungen unterschiedlicher Fusionsproteine. ....	36
Tab. 4.15 Reinigungsprogramm für IMAC. ....	37
Tab. 4.16 Reinigungsprogramm für GSH Reinigung. ....	38
Tab. 4.17 Reinigungsprogramm für die Anionenaustauschchromatografie.....	38
Tab. 4.18 Reinigungsprogramm für die Kationenaustauschchromatographie.....	39
Tab. 4.19 Messbedingungen der analytischen Gelfiltration. ....	43
Tab. 4.20 Proteingrößenstandard (BioRad).....	43
Tab. 4.21 Verwendete Crosslinking Proben. ....	46
Tab. 4.22 Parameter zur Aufnahme der CD-Spektren.....	47
Tab. 4.23 Parameter zur Messung der Fluoreszenzanisotropie der Fluorophore 5,6-FAM, Atto594 und Rhodamin. (* = G-Faktor einzelner Messung als Beispiel). ....	48
Tab. 4.24 Parameter für die Nicht-lineare Regression "one specific binding (w. offset)". ....	49
Tab. 4.25 Titrationspläne <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC .....	53
Tab. 4.26 Antikörper und Bedingungen für die Detektion mittels Western Blot. ....	57
Tab. 5.1 Dissoziationskonstante von Ubiquitin mit UBXD1.....	73
Tab. 5.2 Dissoziationskonstanten zwischen UBXD1 und p97.....	88
Tab. 5.3 Dissoziationskonste von hHR23b-UBA1 mit Ubiquitin. (▲ = Dreifachbestimmung) .....	102



Tab. 5.4 Anteil zugeordneter Atome von hHR23b-UBA1.....	105
Tab. 5.5 Dissoziationskonstanten supramolekularer Liganden CLR01, ABS258, ABS209 und ABS212 mit hHR23b-UBL. (▲ = Dreifachbestimmung, k.B. = keine Bindung messbar) .....	109
Tab. 12.1 Intramolekulare chemische Crosslinks von UBXD1 mit DSSO (vier biologische Replikate).....	150
Tab. 12.2 Intermolekulare chemische Crosslinks von der UBXD1-298PreSc Fragmente (nach PreSc Verdau) mit DSSO (drei technische Replikate). UBXD1-1 Protein: Aminosäure 1-298, UBXD1-2 Protein: Aminosäure 299-441.....	154
Tab. 12.3 Intermolekulare chemische Crosslinks zwischen UBXD1 und Ubiquitin mit DSSO (drei technische Replikate).....	155
Tab. 12.4 Intermolekulare Crosslinks zwischen UBXD1 und Ubiquitin-F4BpA (vier technische Rplikate). Das X markiert die photo-reaktive Aminosäure p-Benzoyl-L-phenylalanin (BpA) in der Peptidsequenz. ....	155
Tab. 12.5 Chemische Crosslinks zwischen UBXD1 und p97 in drei technischen Replikaten. ....	156
Tab. 12.6 Photo-Crosslinks zwischen UBXD1 und p97-photoLeu/photoMet in drei technischen Replikaten. Das X markiert die photo-reaktive Aminosäure in der Peptidsequenz.....	157
Tab. 12.7 Chemische Crosslinks zwischen UBXD1 und HR23b in drei technischen Replikaten. ....	157
Tab. 12.8 Photo-reaktive Crosslinks zwischen UBXD1 und hhR23b-UBL-F69BpA in fünf technischen Replikaten. ....	158
Tab. 12.9 ATPase-Aktivität und Michaelis-Menten-Kinetik von p97 +/- UBXD1. (* Dreifachbestimmung).....	160
Tab. 12.10 ATPase-Aktivität von p97 in Anwesenheit von UBXD1, Ufd1 und Npl4. (* Dreifachbestimmung).....	161
Tab. 12.11 Atomliste der zugeordneten <sup>15</sup> N-, <sup>13</sup> C-Atome von hHR23b-UBA1.....	162

## 11 Abkürzungsverzeichnis

Aa	Aminosäure
$\beta$	Massenkonzentration [g/L]
c	Stoffmengenkonzentration [mol/L]
CD	Circular Dichroismus
CX	Chemisches Crosslinking
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Da	Dalton (= g/mol)
dd. H <sub>2</sub> O	Doppel destilliertes / vollkommen entsalztes Wasser
FPLC	fast protein liquid chromatography
HetNOE	Hetero-Nuclear-Overhouser-Effect-Spektrum
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K <sub>A</sub>	Assoziationskonstante
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
M	Molar [mol/L], Einheit für Stoffmengenkonzentration
NaKPi	Natrium-Kalium-Phosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
p97	AAA-ATPase p97 / VCP (vasolin-containing protein)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Identifikationsnummer der Proteindatenbank
PIM	<i>PUB-interacting motif</i>
PUB	<i>Peptide:N-glycanase/UBA or UBX-containing protein</i>
PX	Photoreaktives Crosslinking
UBXD1	<i>UBX domain-containing protein 1</i>
UV	Ultraviolettes Licht
VIM	<i>VCP-interacting motif</i>
VIS	Sichtbares Licht
wt	Wildtyp

## Aminosäuren

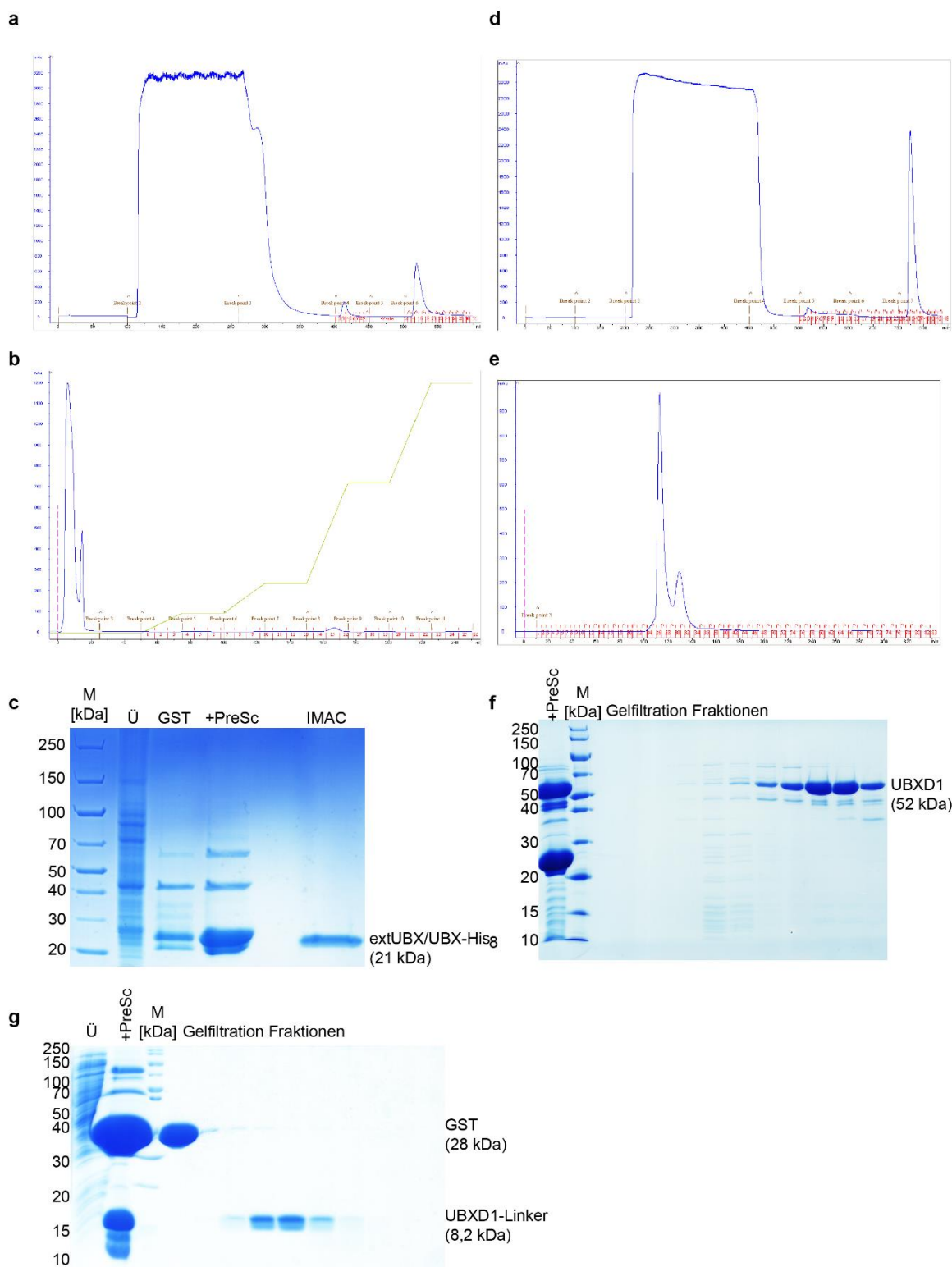
Ala	(A)	Alanin
Arg	(R)	Arginin
Asn	(N)	Asparagin
Asp	(D)	Aspartat
Cys	(C)	Cystein
Gln	(Q)	Glutamin
Glu	(E)	Glutamat
Gly	(G)	Glycin
His	(H)	Histidin
Ile	(I)	Isoleucin
Leu	(L)	Leucin
Lys	(K)	Lysin
Met	(M)	Methionin
Phe	(F)	Phenylalanin
Pro	(P)	Prolin
Ser	(S)	Serin
Thr	(T)	Threonin
Trp	(W)	Tryptophan
Tyr	(Y)	Tyrosin
Val	(V)	Valin

## **12 Anhang**

### **12.1 Proteinaufreinigung**

Im folgenden Kapitel sind exemplarisch für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine die jeweiligen Proteinaufreinigungen gezeigt.

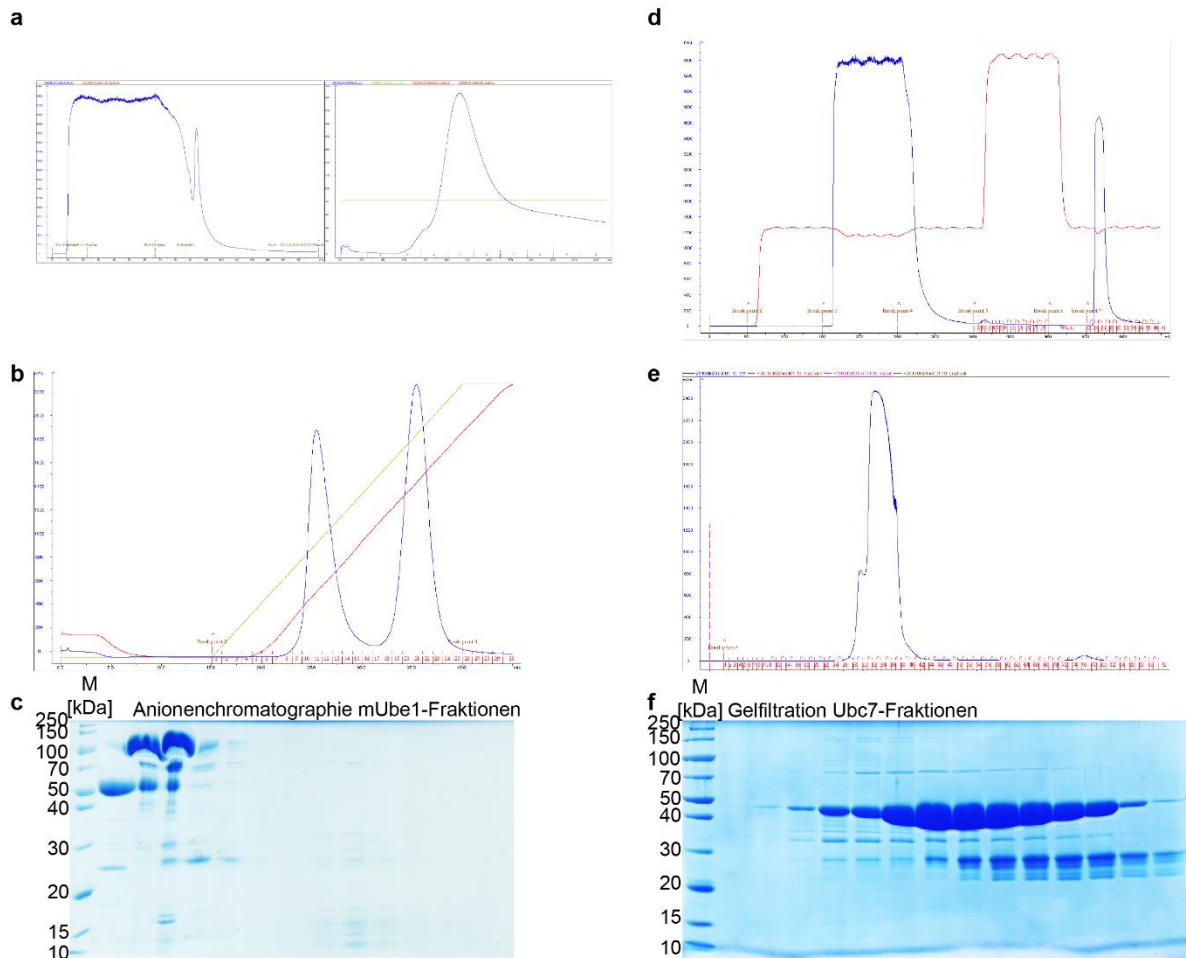
## 12.1.1 Proteinreinigung UBXD1



**Abb. 12.1** Proteinaufreinigung von UBXD1-wt, sowie UBXD1-Linker-UBX-C.

**a:** GST-Reinigung von GST-UBXD1-Linker-UBX-C-His<sub>8</sub> (269-441). **b:** IMAC von mit PreSc geschnittenen UBXD1-Linker-UBX-C-His<sub>8</sub>. **c:** Zur Visualisierung der Proteinreinigung wurden die Proben vom Überstand (Ü), der GST-Reinigung (GST), nach erfolgter Inkubation mit PreSc (+PreSc) und der IMAC (IMAC) auf ein 5-20% SDS-Gel geladen und mittels Comassie gefärbt. **d:** GST-Reinigung von GST-UBXD1 (1-441). **e:** Gelfiltration (75 µg, 16/60) von UBXD1. **f:** SDS-Gel der Gelfiltration von UBXD1, sowie dem Probenauftrag nach der Inkubation mit PreSc (+PreSc). **g:** SDS-Gel der Reinigung von UBXD1-Linker (263-330) durchgeführt von Bettina Tugui unter Anleitung von Dr. Christine Beuck (AG Prof. Bayer, Universität Duisburg-Essen).

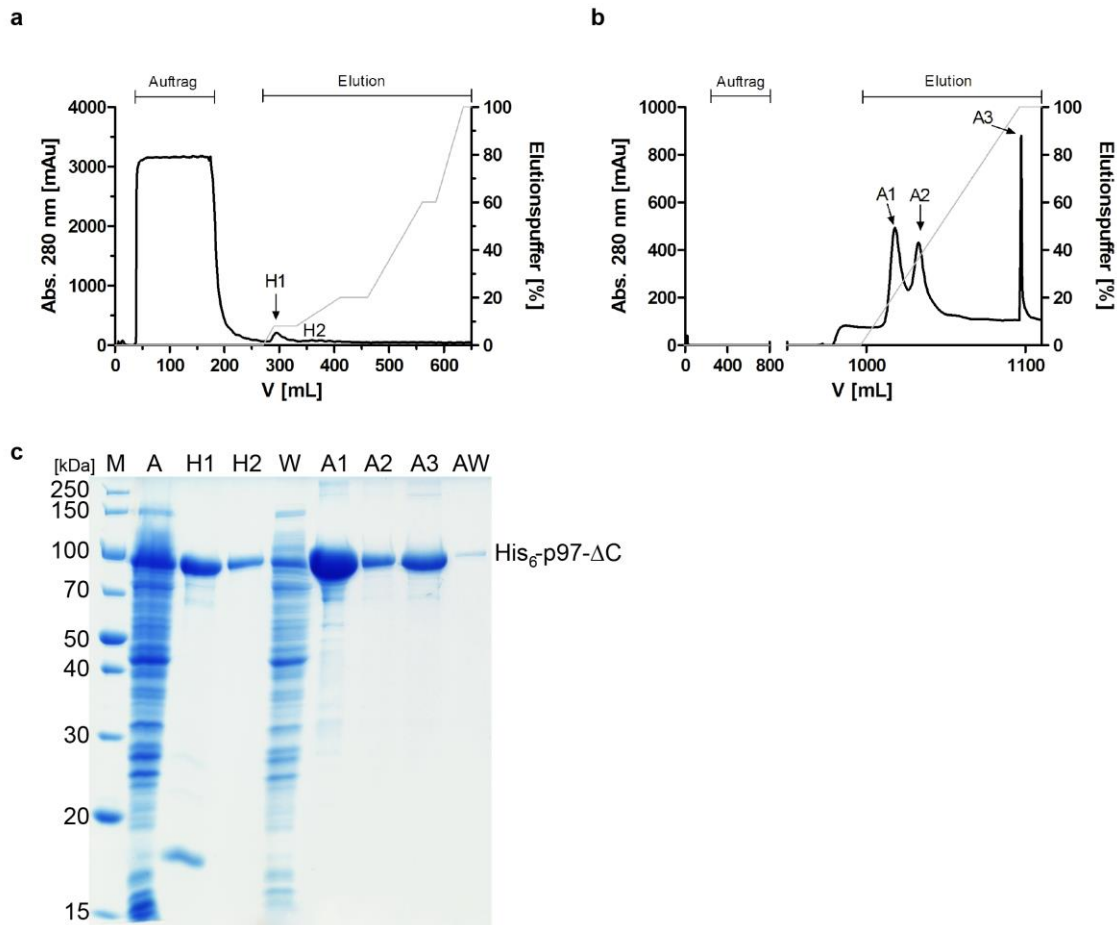
## 12.1.2 Proteinreinigung mUbe1 und Ubc7



**Abb. 12.2 Proteinaufreinigung der E1- und E2-Enzyme mUbe1 und Ubc7.**

**a:** IMAC Reinigung von His<sub>6</sub>-mUbe1. Auftrag auf die NiNTA-Säule (links) und Elution (rechts). **b:** Anionenaustauschchromatographie von mUbe1. **c:** SDS-Gel zur Visualisierung der Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie. **d:** GST-Reinigung von GST-Ubc7. **e:** Gelfiltration von Ubc7. **f:** SDS-Gel zur Visualisierung der Fraktionen der Gelfiltration von Ubc7.

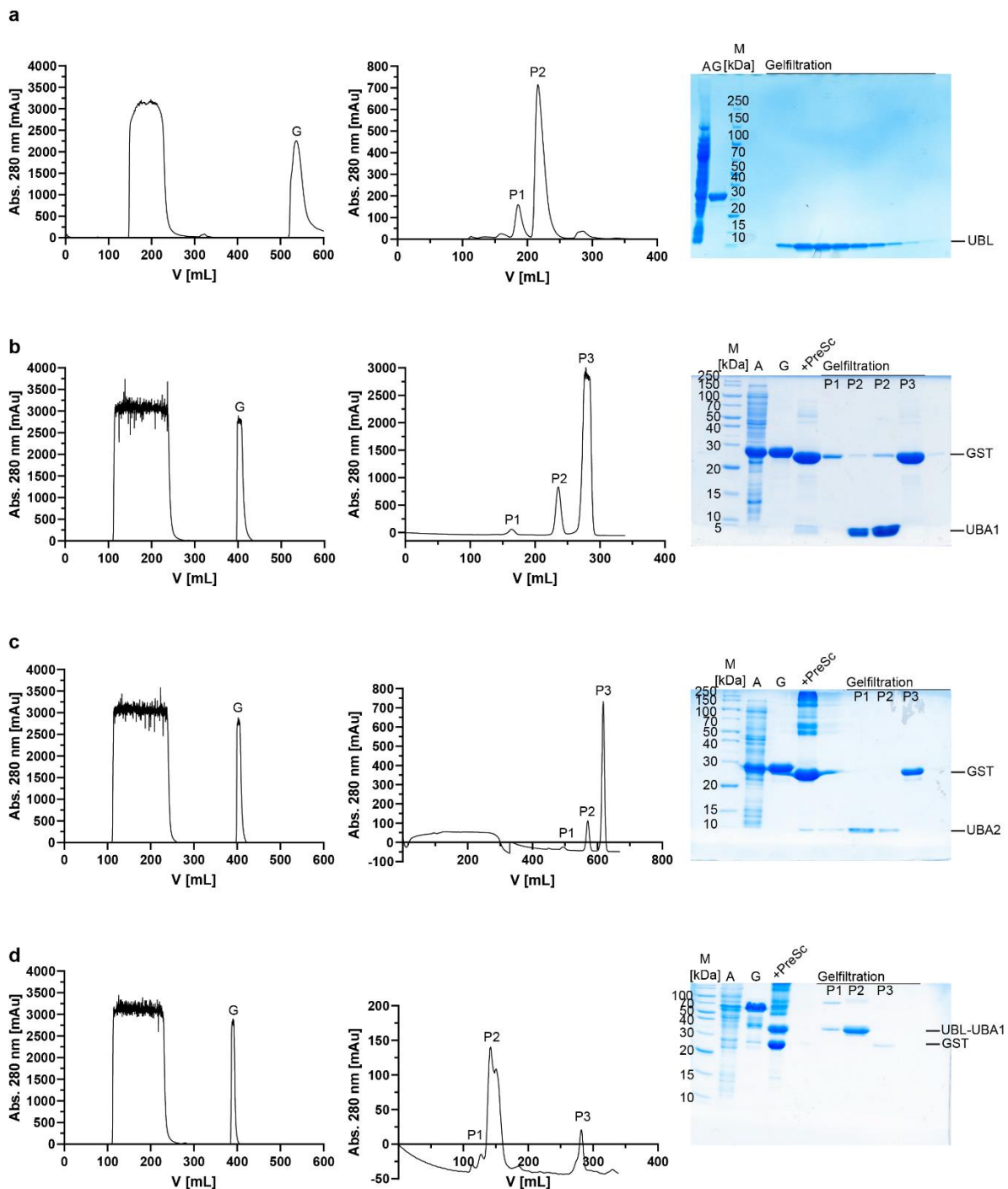
## 12.1.3 Proteinreinigung p97



**Abb. 12.3 Proteinreinigung von p97-ΔC.**

**a:** IMAC Reinigung von His<sub>6</sub>-p97-ΔC. Elution erfolgte bei 12-15 % Elutionspuffer. **b:** Anionenaustauschchromatographie von His<sub>6</sub>-p97-ΔC. **c:** SDS-Gel der p97-ΔC Reinigung. M: Proteinmarker, A: Zellysat, H1 und H2: Fraktionen der IMAC-Reinigung, W: Durchlauf der IMAC-Reinigung. A1-A3: Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie, AW: Durchlauf der Anionenaustauschchromatographie.

## 12.1.4 Proteinreinigung HR23b



**Abb. 12.4 Proteinreinigung verschiedener hHR23-Proteine.**

Chromatogramme der GSH-Affinitätschromatographie (links) und der Größenausschlusschromatographie nach erfolgtem Verdau mit PreSc (mitte). Proben der Proteinaufreinigungen wurden mittels SDS-Gel untersucht (rechts). **a:** Proteinaufreinigung von hHR23b-UBL-F69BpA Mutante. **b:** Proteinaufreinigung von hHR23b-UBA1. **c:** Proteinaufreinigung von hHR23b-UBA2. **d:** Proteinaufreinigung von hHR23b-UBL-UBA1.



## 12.2 Chemisches und photoreaktives Crosslinking

Alle in dieser Arbeit durchgeführten LC-MS Analysen der gecrosslinkten Proteinproben sind im folgenden aufgeführt:

**Tab. 12.1 Intramolekulare chemische Crosslinks von UBXD1 mit DSSO (vier biologische Replikate).**

Score	Protein 1	XL Aa 1	Peptide 1	Protein 2	XL Aa 2	Peptide 2
339.88	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	325	EKEEQR
326.11	UBXD1	142	DACIKEAILLHFSTDPVAASIMK	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK
317.97	UBXD1	142	DACIKEAILLHFSTDPVAASIMK	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK
312.42	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	269	AKLDR
311.59	UBXD1	180	LGVDTIAKYLDNIHLHPEEEK	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR
311.59	UBXD1	180	LGVDTIAKYLDNIHLHPEEEK	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR
310.05	UBXD1	180	LGVDTIAKYLDNIHLHPEEEK	UBXD1	202	IKLQNKVFQER
296.94	UBXD1	180	LGVDTIAKYLDNIHLHPEEEKYR	UBXD1	202	IKLQNKVFQER
287.94	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	320	TKAMR
285.7	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	319	TKAMR
285.24	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	66	LEQKQSR
283.46	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	325	AMREKEEQR
269.44	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	66	LEQKQSR
257.54	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	172	VKLGVDTIAK
257.54	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	198	IKLQNK
257.01	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	319	TKAMR
251.51	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	325	AMREKEEQR
250.68	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	333	KYNYTLLR
250.04	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	269	AKLDR
232.19	UBXD1	301	RVFQPSPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK
227.14	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	325	AMREKEEQR
226.32	UBXD1	301	VFQPSPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	325	AMREKEEQR
226.11	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	333	KYNYTLLR
225.77	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	66	LEQKQSR
225.17	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	202	LQNKVFQER
220.45	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	202	LQNKVFQER
218.85	UBXD1	202	IKLQNKVFQER	UBXD1	66	LEQKQSR
210.95	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	320	TKAMREK
209.11	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	66	LEQKQSR
209.11	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	325	AMREKEEQRGLR
206.45	UBXD1	301	VFQPSPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	142	DACIKEAILLHFSTDPVAASIMK
204.62	UBXD1	75	AWGPTSQDTIR	UBXD1	66	LEQKQSR
203.75	UBXD1	194	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	198	IKLQNK
198.35	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	325	AMREKEEQRGLR
194.59	UBXD1	193	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	198	IKLQNK
192.58	UBXD1	194	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	202	LQNKVFQER
192.19	UBXD1	202	LQNKVFQER	UBXD1	269	AKLDR
190.03	UBXD1	301	RVFQPSPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	325	AMREKEEQR

189	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	269	AKLDR
188.98	UBXD1	334	KYNYTLLR	UBXD1	66	LEQKQSR
188.49	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	66	LEQKQSR
181.81	UBXD1	334	KYNYTLLR	UBXD1	325	EKEEQR
180.87	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	66	LEQKQSR
180.34	UBXD1	301	RVFQSPPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	333	KYNYTLLR
177.84	UBXD1	142	DQRDACIKEAILLHFSTDPVAASIMK	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK
174.86	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	325	AMREKEEQR
174.81	UBXD1	202	IKLQNKVFQER	UBXD1	66	LEQKQSR
170.95	UBXD1	172	VKLGVDIAK	UBXD1	333	KYNYTLLR
170.05	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	325	AMREKEEQR
168	UBXD1	202	LQNKVFQER	UBXD1	325	EKEEQR
167.3	UBXD1	301	RVFQSPPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	166	IYTFNKDQDR
164.96	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	269	AKLDR
162.97	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	320	TKAMR
162.8	UBXD1	325	AMREKEEQR	UBXD1	269	AKLDR
161.32	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	320	TKAMR
159.64	UBXD1	430	AAGAEPDSILKPELLSAIEK	UBXD1	269	AKLDR
158.74	UBXD1	296	RVFQSPPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	325	AMREKEEQR
156.01	UBXD1	301	RVFQSPPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	333	KYNYTLLR
155.07	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	198	IKLQNK
155.07	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	269	AKLDR
153.97	UBXD1	193	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	202	LQNKVFQER
153.67	UBXD1	194	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	202	IKLQNKVFQER
150.06	UBXD1	177	LGVDIAKYLDNIHLHPEEEK	UBXD1	202	IKLQNKVFQER
148.33	UBXD1	325	EKEEQR	UBXD1	320	TKAMR
147.18	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	166	IYTFNKDQDR
146.03	UBXD1	85	KELQAEATVSGSPEAPGTVVSEPR	UBXD1	333	KYNYTLLR
145.04	UBXD1	325	EKEEQR	UBXD1	319	TKAMR
144.55	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	320	TKAMR
142.62	UBXD1	325	AMREKEEQR	UBXD1	269	AKLDR
142.55	UBXD1	202	LQNKVFQER	UBXD1	333	KYNYTLLR
142.04	UBXD1	75	AWGPTSQDTIR	UBXD1	66	LEQKQSR
141.66	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	333	KYNYTLLR
136.65	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	333	KYNYTLLR
136.65	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	333	KYNYTLLR
136.65	UBXD1	202	IKLQNKVFQER	UBXD1	333	KYNYTLLR
135.18	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	66	LEQKQSR
135.03	UBXD1	325	AMREKEEQRGLR	UBXD1	333	GLRKYNYTLLR
132.94	UBXD1	193	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	198	KIKLQNKVFQER
132.88	UBXD1	301	VFQSPPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	202	LQNKVFQER
131.5	UBXD1	172	VKLGVDIAK	UBXD1	320	TKAMR
131.45	UBXD1	202	LQNKVFQER	UBXD1	269	AKLDR
131.06	UBXD1	193	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	202	IKLQNKVFQER

130.16	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	333	KYNYTLLR
129.96	UBXD1	202	IKLQNKVFQER	UBXD1	202	LQNKVFQER
128.76	UBXD1	172	VKLGVDIAK	UBXD1	333	KYNYTLLR
127.32	UBXD1	181	LGVDIAKYLDNIHLHPEEEK	UBXD1	202	LQNKVFQER
126.67	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	202	LQNKVFQER
125.47	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	319	TKAMREK
124.37	UBXD1	198	IKLQNK	UBXD1	320	TKAMR
122.3	UBXD1	151	DACIKEAILLHFSTDPVAASIMK	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK
121.87	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	334	KYNYTLLR
121.62	UBXD1	194	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	202	LQNKVFQER
120.96	UBXD1	142	DACIKEAILLHFSTDPVAASIMK	UBXD1	166	IYTFNKDQDR
120.78	UBXD1	172	DQDRVKLGVDIAK	UBXD1	333	KYNYTLLR
119.75	UBXD1	301	VFQPSPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	172	VKLGVDIAK
119.23	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	325	AMREEEQR
118.48	UBXD1	172	VKLGVDIAK	UBXD1	202	LQNKVFQER
118.11	UBXD1	194	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	333	KYNYTLLR
118.11	UBXD1	256	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	333	KYNYTLLR
118.11	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	333	KYNYTLLR
117.98	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	172	VKLGVDIAK
116.3	UBXD1	194	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	172	VKLGVDIAK
115.71	UBXD1	202	IKLQNKVFQER	UBXD1	66	LEQKQSR
115.71	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	66	LEQKQSR
113.82	UBXD1	180	LGVDIAKYLDNIHLHPEEEK	UBXD1	202	LQNKVFQER
113.76	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	172	VKLGVDIAK
112.51	UBXD1	35	EKPNQPAPRPPRQGPTNEAQMAAAAALAR	UBXD1	15	FKSAGPGQK
112.35	UBXD1	296	RVFQPSPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	UBXD1	325	EKEEQR
111.28	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	320	TKAMREK
110.35	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	202	IKLQNKVFQER
110.31	UBXD1	134	KDQRDACIK	UBXD1	269	EQLLAAEPVRAKLDR
110.24	UBXD1	430	AAGAEPDSILKPELLSAIEK	UBXD1	269	AKLDR
110.17	UBXD1	35	EKPNQPAPRPPRQGPTNEAQMAAAAALAR	UBXD1	22	SAGPGQK
110.17	UBXD1	163	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	325	AMREEEQR
108.99	UBXD1	193	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	66	LEQKQSR
108.99	UBXD1	256	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	66	LEQKQSR
108.24	UBXD1	194	YLDNIHLHPEEEKYRK	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR
108.24	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	333	KYNYTLLR
107.9	UBXD1	6	EQLLAAEPVRAKDQDRVK	UBXD1	269	AKLDRQR
106.29	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	134	KDQRDACIK
106.15	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	66	LEQKQSR
106.15	UBXD1	334	KYNYTLLR	UBXD1	66	LEQKQSR
106.05	UBXD1	15	FKSAGPGQK	UBXD1	24	LKESVGEK
105.82	UBXD1	333	GLRKYNYTLLR	UBXD1	66	LEQKQSR
105.16	UBXD1	180	LGVDIAKYLDNIHLHPEEEK	UBXD1	202	LQNKVFQER
104.95	UBXD1	134	KDQRDACIK	UBXD1	333	GLRKYNYTLLR

104.01	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	198	IKLQNK
103.41	UBXD1	325	AMREKEEQR	UBXD1	134	KDQRDACIK
100.78	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVRAK	UBXD1	333	KYNYTLLR
100.74	UBXD1	256	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	202	LQNKVFQER
100.48	UBXD1	430	AAGAEPDSILKPELLSAIEK	UBXD1	333	KYNYTLLR
100.15	UBXD1	193	YLDNIHLHPREEEKYRK	UBXD1	198	IKLQNK
100.15	UBXD1	194	YLDNIHLHPREEEKYRK	UBXD1	325	EKEEQR
100.15	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	325	EKEEQR
100.15	UBXD1	334	KYNYTLLR	UBXD1	325	AMREKEEQR
98.03	UBXD1	181	LGVDTIAKYLDNIHLHPREEEK	UBXD1	66	LEQKQSR
96.73	UBXD1	296	RVFQPSPLASQFELPGDFNLTAEEIKR	UBXD1	325	AMREKEEQR
96.25	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	325	EKEEQR
95.57	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	325	AMREKEEQR
95.53	UBXD1	172	VKLGVDTIAK	UBXD1	325	EKEEQR
93.54	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	325	EKEEQR
91.87	UBXD1	96	KELQAEATVSGSPEAPGTNNVSEPR	UBXD1	325	EKEEQR
91.32	UBXD1	193	YLDNIHLHPREEEKYRK	UBXD1	66	LEQKQSR
91.27	UBXD1	163	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	320	TKAMR
91.27	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	269	AKLDR
91.27	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	269	AKLDR
90.13	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	198	IKLQNK
89.78	UBXD1	172	VKLGVDTIAK	UBXD1	333	KYNYTLLR
88.59	UBXD1	150	DACIKEAILLHFSTDPVAASIMK	UBXD1	166	IYTFNKDQDR
86.34	UBXD1	102	KELQAEATVSGSPEAPGTNNVSEPR	UBXD1	66	LEQKQSR
86.01	UBXD1	177	LGVDTIAKYLDNIHLHPREEEK	UBXD1	325	EKEEQR
86.01	UBXD1	202	IKLQNKVFQER	UBXD1	325	EKEEQR
86.01	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	269	AKLDR
86.01	UBXD1	334	KYNYTLLR	UBXD1	308	SEAVER
85.73	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	66	LEQKQSR
85.73	UBXD1	430	AAGAEPDSILKPELLSAIEK	UBXD1	66	LEQKQSR
84.57	UBXD1	102	KELQAEATVSGSPEAPGTNNVSEPR	UBXD1	333	KYNYTLLR
83.26	UBXD1	66	LEQKQSR	UBXD1	325	AMREKEEQR
83.23	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	202	LQNKVFQER
82.92	UBXD1	74	AWGPTSQDTIR	UBXD1	269	AKLDR
82.92	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	269	AKLDR
82.6	UBXD1	163	IYTFNKDQDR	UBXD1	269	AKLDR
82.6	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	269	AKLDR
82.6	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	320	TKAMR
82.6	UBXD1	320	TKAMR	UBXD1	269	AKLDR
82.6	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	269	AKLDR
82.5	UBXD1	198	IKLQNK	UBXD1	269	AKLDR
81.88	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	325	EKEEQR
81.63	UBXD1	320	TKAMR	UBXD1	269	AKLDR
80.07	UBXD1	427	AAGAEPDSILKPELLSAIEK	UBXD1	325	EKEEQR

75.9	UBXD1	320	TKAMR	UBXD1	269	AKLDR
------	-------	-----	-------	-------	-----	-------

**Tab. 12.2 Intermolekulare chemische Crosslinks von der UBXD1-298PreSc Fragmente (nach PreSc Verdau) mit DSSO (drei technische Replikate). UBXD1-1 Protein: Aminosäure 1-298, UBXD1-2 Protein: Aminosäure 299-441.**

Score	Protein 1	XL Aa 1	Peptide 1	Protein 2	XL Aa 2	Peptide 2
287.83	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	Y334	KYNYTLLR
277.28	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	325	EKEEQR
268.98	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	325	AMREKEEQR
236.98	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	319	TKAMR
229.24	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	333	KYNYTLLR
226.73	UBXD1-1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1-2	320	TKAMR
217.45	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	325	EKEEQR
215.45	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	333	KYNYTLLR
206.49	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	300*	GPLGSEIKR
206.49	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1-2	333	KYNYTLLR
192.17	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	319	TKAMR
190.03	UBXD1-2	325	AMREKEEQR	UBXD1-1	269	AKLDR
177.58	UBXD1-2	325	AMREKEEQR	UBXD1-1	269	AKLDR
168.4	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	320	TKAMR
163.91	UBXD1-2	325	AMREKEEQR	UBXD1-1	269	AKLDR
135.66	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	320	TKAMR
84.24	UBXD1-1	257	HKEQLLAAEPVR	UBXD1-2	333	KYNYTLLR
75.9	UBXD1-2	320	TKAMR	UBXD1-1	269	AKLDR
65.09	UBXD1-2	320	TKAMR	UBXD1-1	269	AKLDR
51.69	UBXD1-2	300*	GPLGSEIKR	UBXD1-1	269	AKLDR
49.48	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	320	TKAMR
38.09	UBXD1-2	334	KYNYTLLR	UBXD1-1	269	AKLDR
36.68	UBXD1-1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1-2	334	KYNYTLLR

S300\* = Serin von der eingefügten PreSc Schnittstelle (LEVL<sup>299</sup>FQ(GPLGS)E<sup>302</sup>IKR)

**Tab. 12.3 Intermolekulare chemische Crosslinks zwischen UBXD1 und Ubiquitin mit DSSO (drei technische Replikate).**

Score	Protein 1	XL Aa 1	Peptide 1	Protein 2	XL Aa 2	Peptide 2
195.22	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGR	UBXD1	269	AKLDR
170.7	Ubiquitin	63	TLSDYNIQKESTLHLVLR	UBXD1	194	YLDNIHLHPPEEKYRK
170.3	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK
169.58	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGR	UBXD1	333	KYNYTLLR
164.1	Ubiquitin	63	TLSDYNIQKESTLHLVLR	UBXD1	257	HKEQLLAAEPVR
144.6	Ubiquitin	63	QLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLR	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK
113.8	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	202	IKLQNKVFQER
109	Ubiquitin	66	TLSDYNIQKESTLHLVLR	UBXD1	66	LEQKQSR
106.2	Ubiquitin	57	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	66	LEQKQSR
106.1	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	333	KYNYTLLR
95.91	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	269	EQLLAAEPVRAKDR
93.04	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	198	IKLQNK
81.97	Ubiquitin	59	TLSDYNIQKESTLHLVLR	UBXD1	198	IKLQNK
62.69	Ubiquitin	57	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	320	TKAMREK
45.34	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	320	TKAMR
43.26	Ubiquitin	48	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	325	AMREKEEQR
42.57	Ubiquitin	57	LIFAGKQLEDGRTLSDYNIQK	UBXD1	269	AKLDRQR

**Tab. 12.4 Intermolekulare Crosslinks zwischen UBXD1 und Ubiquitin-F4BpA (vier technische Replikate). Das X markiert die photo-reaktive Aminosäure p-Benzoyl-L-phenylalanin (BpA) in der Peptidsequenz.**

Protein 1	XL Aa 1	Peptide 1	Protein 2	XL Aa 2	Peptide 2
UBXD1	54	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	53	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	53	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	48	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	52	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	49	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	49	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	48	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	48	QGPTNEAQM <sup>X</sup> AAAAAALAR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK	UBXD1	326	EEQRGLR
Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK	UBXD1	321	TKAMR
UBXD1	330	EEQRGLR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	326	EKEEQR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	334	YNYTLLR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	223	VFQERINCLEGT <sup>X</sup> HEFFEAIGFQK	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
UBXD1	334	YNYTLLR	Ubiquitin-F4BpA	4	MQIxVK
Ubiquitin-F4BpA	4	QIxVKTLTGK <sup>X</sup> TITLEVEPSDTIENVK	UBXD1	321	AMREKEEQR

**Tab. 12.5 Chemische Crosslinks zwischen UBXD1 und p97 in drei technischen Replikaten.**

Score	Protein 1	XL Aa 1	Peptid 1	Protein 2	XL Aa 2	Peptid 2
65.09	p97	60	GDTVLLKGGK	UBXD1	320	TKAMR
46.61	UBXD1	66	LEQKQSR	p97	211	KQLAQIK
82.5	UBXD1	66	LEQKQSR	p97	663	KSPVAK
81.52	UBXD1	66	LEQKQSR	p97	696	ACKLAIR
104.04	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	p97	696	ACKLAIR
67.76	p97	211	KQLAQIK	UBXD1	320	TKAMR
166.08	p97	211	KQLAQIK	UBXD1	320	TKAMR
48.28	p97	211	KQLAQIK	UBXD1	325	EKEEQR
134.7	p97	211	KQLAQIK	UBXD1	325	TKAMR
100.78	p97	288	KAFEEAEK	UBXD1	13	LEQKQSR
106.05	p97	288	KAFEEAEK	UBXD1	66	LEQKQSR
65.09	p97	288	KAFEEAEK	UBXD1	269	AKLDR
119.74	UBXD1	301	VFQPSPLASQFELPGDFFNLTAEEIKR	p97	754	KYEMFAQTLQQSR
65.06	p97	315	EKTHGEVER	UBXD1	325	EKEEQR
59.82	UBXD1	334	KYNYTLLR	p97	565	EIFDKAR
91.32	UBXD1	334	KYNYTLLR	p97	696	ACKLAIR
72.14	p97	385	LEILQIHTKNMK	UBXD1	66	LEQKQSR
53.17	p97	385	LEILQIHTKNMK	UBXD1	66	LEQKQSR
95.85	p97	584	QAAPCVLFFDELDSIAKAR	UBXD1	325	EKEEQR
86.11	p97	658	VAILKANLR	UBXD1	66	LEQKQSR
72.79	p97	658	VAILKANLR	UBXD1	320	EKEEQR
65.06	p97	658	VAILKANLR	UBXD1	325	EKEEQR
80.23	p97	658	VAILKANLR	UBXD1	325	EKEEQR
72.47	p97	664	SPVAKDVDLEFLAK	UBXD1	320	TKAMR
50.16	p97	664	SPVAKDVDLEFLAK	UBXD1	325	EKEEQR
55.58	p97	668	SPVAKDVDLEFLAK	UBXD1	320	TKAMR
50.86	p97	696	ACKLAIR	UBXD1	269	AKLDR
54.41	p97	696	ACKLAIR	UBXD1	319	TKAMR
65.09	p97	696	ACKLAIR	UBXD1	320	TKAMR
55.06	p97	696	ACKLAIR	UBXD1	325	EKEEQR
37.72	p97	754	KYEMFAQTLQQSR	UBXD1	320	TKAMR
141.7	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	333	KYNYTLLR
118.1	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	334	KYNYTLLR
96.25	UBXD1	334	KYNYTLLR	UBXD1	325	EKEEQR
95.53	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	325	EKEEQR
91.27	UBXD1	256	HKEQLLAAEPVR	UBXD1	269	AKLDR
83.0	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	325	EKEEQR
81.96	UBXD1	166	IYTFNKDQDRVK	UBXD1	269	AKLDR
73.29	UBXD1	193	YLDNIHLHPREEKYRK	UBXD1	198	IKLQNK
65.09	UBXD1	163	IYTFNKDQDR	UBXD1	269	AKLDR
64.24	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	269	AKLDR
59.8	UBXD1	172	VKLGVDTIK	UBXD1	325	EKEEQR
59.39	UBXD1	333	KYNYTLLR	UBXD1	320	TKAMR

58.98	UBXD1	325	EKEEQR	UBXD1	320	TKAMR
58.74	UBXD1	194	YLDNIHLHPREEKYRK	UBXD1	198	IKLQNK
55.58	UBXD1	166	IYTFNKDQDR	UBXD1	320	TKAMR
54.76	UBXD1	308	SEAVR	UBXD1	320	TKAMR
54.41	UBXD1	325	EKEEQR	UBXD1	269	AKLDR
54.41	UBXD1	336	KYNYTLLR	UBXD1	320	TKAMR
49.48	UBXD1	336	KYNYTLLR	UBXD1	269	AKLDR
41.98	UBXD1	336	KYNYTLLR	UBXD1	320	TKAMR
40.95	UBXD1	320	TKAMR	UBXD1	269	AKLDR
40.95	UBXD1	202	LQNKVFQER	UBXD1	269	AKLDR

**Tab. 12.6 Photo-Crosslinks zwischen UBXD1 und p97-photoLeu/photoMet in drei technischen Replikaten. Das X markiert die photo-reaktive Aminosäure in der Peptidsequenz.**

Score	Protein 1	XL Aa 1	Peptide 1	Protein 2	XL Aa 2	Peptide 2
104	UBXD1		KDQR	p97	740	RDHFEEAxR
81	UBXD1		LRSEAVR	p97	740	DHFEEAxR
72	UBXD1		KDQR	p97	740	RDHFEEAxR
72	UBXD1		LGAVYGFVR	p97	740	RDHFEEAxR
70	UBXD1		LGAVYGFVR	p97	740	RDHFEEAxR
69	UBXD1		LGAVYGFVR	p97	740	RDHFEEAxR
68	UBXD1		GLRK	p97	740	DHFEEAxRFAR
67	UBXD1		ESVGEK	p97	740	DHFEEAxRFARR
67	UBXD1		LGAVYGFVR	p97	740	RDHFEEAxR
67	UBXD1		LGVDIAK	p97	740	DHFEEAxR
66	UBXD1		ESVGEK	p97	740	RDHFEEAxRFAR
66	UBXD1		YNYTLLR	p97	740	DHFEEAxR
66	UBXD1		LGVDIAK	p97	740	DHFEEAxR
65	UBXD1		DQRDACIK	p97	740	RDHFEEAxR
65	UBXD1		YNYTLLR	p97	740	DHFEEAxR
65	UBXD1		YNYTLLR	p97	740	DHFEEAxR
65	UBXD1		KDQR	p97	740	RDHFEEAxR

**Tab. 12.7 Chemische Crosslinks zwischen UBXD1 und HR23b in drei technischen Replikaten.**

Protein 1	XL Aa 1	Peptid 1	Protein 2	XL Aa 2	Peptid 2	Häufigkeit n
UBXD1	-3	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	6	GPLGSMQVTLKTLQQQTFK	1x
UBXD1	-3	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	14	TLQQQTFKIDIDPEETVK	1x
UBXD1	-3	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	24	IDIDPEETVKALK	1x
UBXD1	-3	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	51	LIYAGKILNDDTALK	4x
UBXD1	-3	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	76	NFVVVMVTKPK	1x
UBXD1	-3	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	78	NFVVVMVTKPK	1x
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	45	GKDAFPVAGQKLIYAGK	1x
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	-1	GPLGSMQVTLK	1x
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	6	GPLGSMQVTLKTLQQQTFK	1x
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	14	TLQQQTFKIDIDPEETVK	1x
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	45	DAFPVAGQKLIYAGK	1x



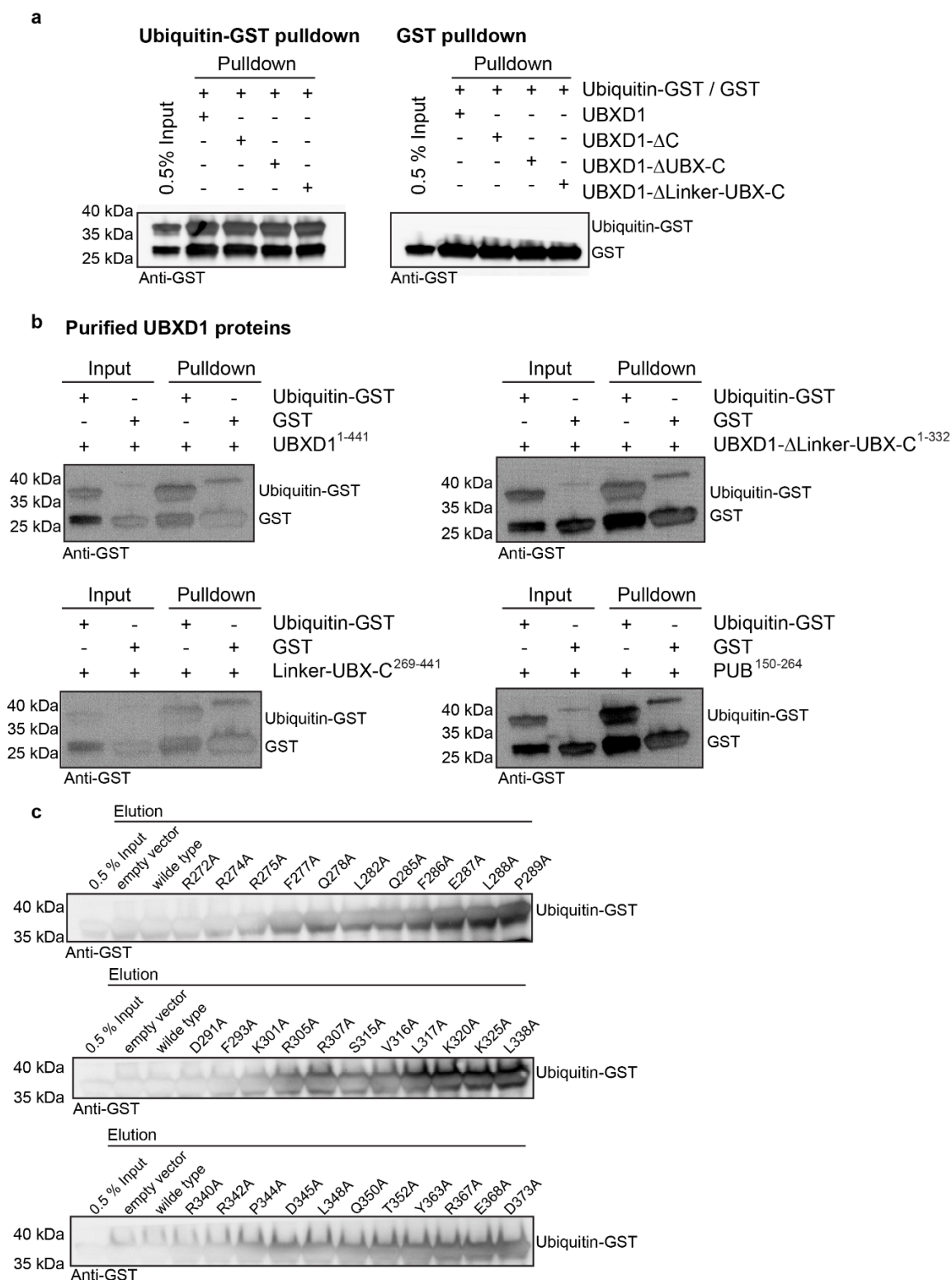
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	51	LIYAGKILNDDTALK	1x
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	76	NFVVVMVTKPK	1x
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	78	EYKIDEKNFVVVMVTKPK	1x
UBXD1	166	IYTFNKDQDR	hHR23b	78	NFVVVMVTKPK	1x
UBXD1	172	VKLGVDIAK	hHR23b	6	GPLGSMQVTLKTLQQQTFK	1x
UBXD1	172	VKLGVDIAK	hHR23b	51	LIYAGKILNDDTALK	1x
UBXD1	180	LGVDIAKYLDNIHLHPEEEK	hHR23b	-1	GPLGSMQVTLK	1x
UBXD1	180	LGVDIAKYLDNIHLHPEEEK	hHR23b	45	GKDAFPVAGQKLIYAGK	3x
UBXD1	180	LGVDIAKYLDNIHLHPEEEK	hHR23b	51	LIYAGKILNDDTALK	1x
UBXD1	180	LGVDIAKYLDNIHLHPEEEK	hHR23b	76	NFVVVMVTKPK	1x
UBXD1	198	IKLQNK	hHR23b	6	GPLGSMQVTLKTLQQQTFK	1x
UBXD1	198	LQNKVFQER	hHR23b	45	DAFPVAGQKLIYAGK	1x
UBXD1	198	IKLQNK	hHR23b	51	LIYAGKILNDDTALK	1x
UBXD1	198	IKLQNK	hHR23b	76	NFVVVMVTKPK	1x
UBXD1	198	IKLQNK	hHR23b	78	NFVVVMVTKPK	1x
UBXD1	202	LQNKVFQER	hHR23b	51	LIYAGKILNDDTALK	1x
UBXD1	257	HKEQLLAAE	hHR23b	-1	GPLGSMQVTLK	1x
UBXD1	257	HKEQLLAAE	hHR23b	6	GPLGSMQVTLKTLQQQTFK	1x
UBXD1	257	HKEQLLAAE	hHR23b	45	DAFPVAGQKLIYAGK	x1
UBXD1	257	HKEQLLAAE	hHR23b	51	LIYAGKILNDDTALK	1x
UBXD1	257	HKEQLLAAE	hHR23b	78	NFVVVMVTKPK	1x

**Tab. 12.8 Photo-reaktive Crosslinks zwischen UBXD1 und hHR23b-UBL-F69BpA in fünf technischen Replikaten.**

Protein 1	XL Aa 1	Peptid 1	Protein 2	XL Aa 2	Peptid 2	Häufigkeit n
UBXD1	236	VLLPAQDQEDPEEFYVLSETTLAQPQSLER	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	2x
UBXD1	238	VLLPAQDQEDPEEFYVLSETTLAQPQSLER	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	1x
UBXD1	239	VLLPAQDQEDPEEFYVLSETTLAQPQSLER	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	2x
UBXD1	240	VLLPAQDQEDPEEFYVLSETTLAQPQSLER	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	2x
UBXD1	241	VLLPAQDQEDPEEFYVLSETTLAQPQSLER	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	1x
UBXD1	150	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	1x
UBXD1	153	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	2x
UBXD1	154	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	1x
UBXD1	155	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	2x
UBXD1	159	GSHMSTDPVAASIMK	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	2x
UBXD1	175	LGVDIAK	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	1x
UBXD1	213	INCLEGTHEFFEAIQFQK	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	1x
UBXD1	218	INCLEGTHEFFEAIQFQK	hHR23b	69	NXVVVMVTKPK	1x

## 12.3 GST- Westernblot Ladekontrolle

Für die in Abb. 4.1 und 4.5 gezeigten Westernblots, wurden zusätzlich Anti-GST-Westernblots durchgeführt, als Kontrolle des eluierten Ub-GST Proteins.



**Abb. 12.5 Ubiquitin-GST- / GST-Westernblots der UBXD1-Pulldowns.**

**a:** Anti-GST Westernblot von Abb. 4.1 c). **b:** Anti-GST Westernblot von Abb. 4.1 e). **c:** Anti-GST Westernblot von Abb. 4.5 a). Eluiertes Ubiquitin-GST oder GST Protein wurde durch einen GST-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

## 12.4 ATPase-Aktivität von p97

Im folgenden sind die Messwerte des ATPase-Aktivitätsassays aufgeführt:

**Tab. 12.9 ATPase-Aktivität und Michaelis-Menten-Kinetik von p97 +/- UBXD1. (\* Dreifachbestimmung).**

<b>Michaelis-Menten Kinetik, Abb. 5.13 a</b>		
<b>c (ATP) [mM]</b>	<b>v p97 [nmol min<sup>-1</sup> µg<sup>-1</sup>]*</b>	<b>v p97 + 2 µM UBXD1 [nmol min<sup>-1</sup> µg<sup>-1</sup>]*</b>
0	0 ± 0	0 ± 0
0,25	0,14 ± 0,02	0,07 ± 0,003
0,5	0,20 ± 0,01	0,10 ± 0,006
0,75	0,24 ± 0,01	0,11 ± 0,0007
1,0	0,25 ± 0,006	0,12 ± 0,014
2,0	0,26 ± 0,004	0,14 ± 0,01
3,0	0,29 ± 0,01	0,17 ± 0,005
	<b>p97</b>	<b>p97 + 2 µM UBXD1</b>
K <sub>M</sub> [mM]	0,27 ± 0,05	0,47 ± 0,08
v <sub>max</sub> [nmol Pi min <sup>-1</sup> µg <sup>-1</sup> ]	0,31 ± 0,01	0,19 ± 0,01
R <sup>2</sup>	0,9864	0,9855
<b>Lineweaver Burk Fit (Doppeltreziproke Auftragung), Abb. 5.13 b</b>		
Schnittpunkt der x-Achse [-1/K <sub>M</sub> ]	-2,98	-2,84
Schnittpunkt der y-Achse [K <sub>M</sub> /v <sub>max</sub> ]	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2
R <sup>2</sup>	0,9695	0,9750
<b>Berechnung der Inhibierungskonstante K<sub>i</sub></b>		
Unter der Annahme, dass:		
$v_{\max}^{\text{app}} = v_{\max} / (1 + c(\text{UBXD1}) / K_i)$		
$K_i = v_{\max}^{\text{app}} / v_{\max} * (1 + c(\text{UBXD1}))$		
Ergibt sich:		
$K_i = 0,19 \text{ nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} / 0,31 \text{ nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} * (1 + 2 \mu\text{M}) = 1,84 \mu\text{M}$		
<b>Relative ATPase Aktivität von p97 mit UBXD1, Abb. 5.13 c</b>		
<b>c (UBXD1) [µM]</b>	<b>Relative ATPase Aktivität*</b>	
0	1 ± 0,1	
0,5	0,74 ± 0,01	
1,0	0,58 ± 0,03	
1,5	0,60 ± 0,05	
2,0	0,58 ± 0,01	
2,5	0,53 ± 0,01	
5,0	0,51 ± 0,02	

**Tab. 12.10 ATPase-Aktivität von p97 in Anwesenheit von UBXD1, Ufd1 und Npl4. (\* Dreifachbestimmung).**

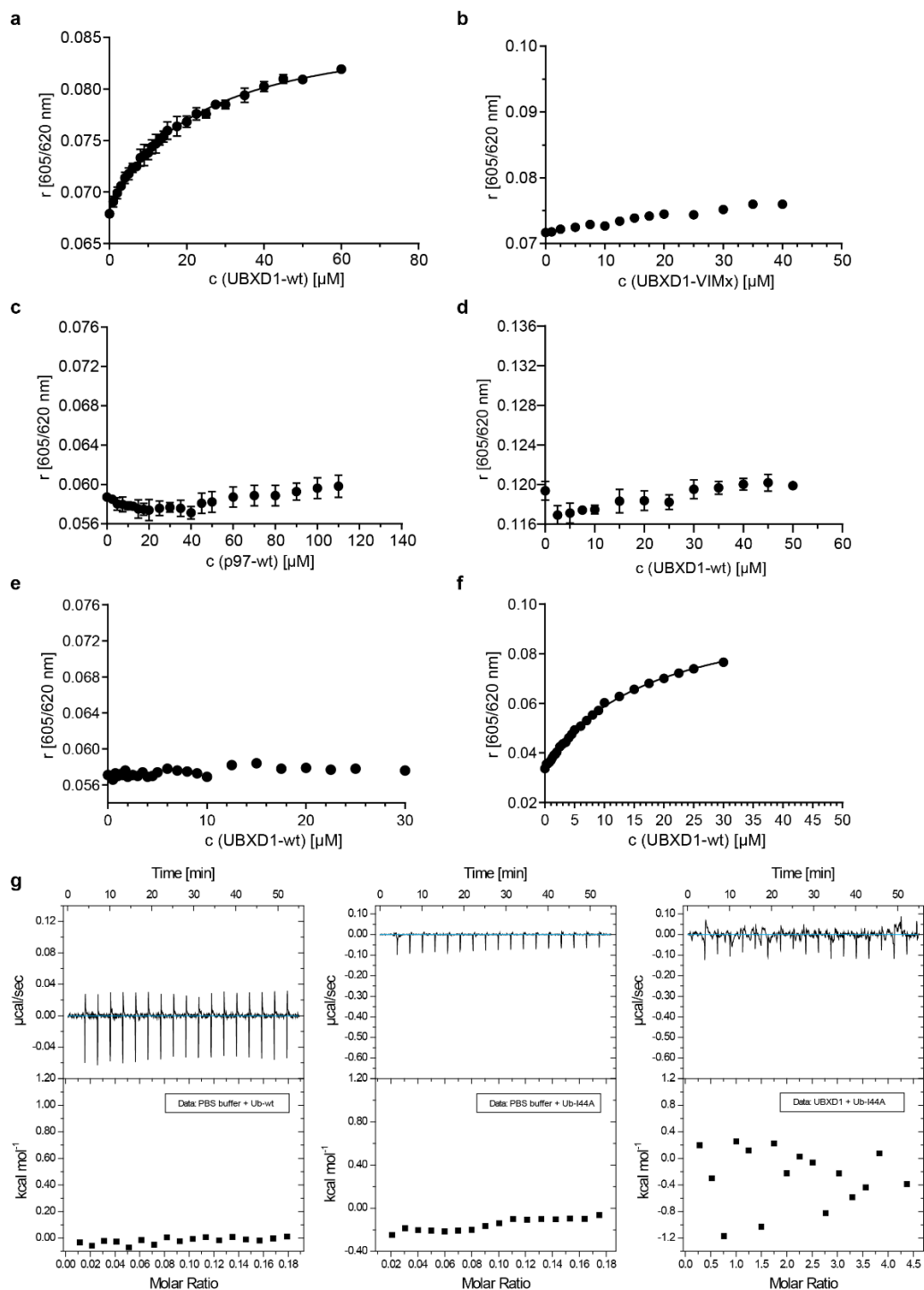
Relative ATPase Aktivität	
Protein Komplexe	Relative ATPase Aktivität*
p97	1,0 ± 0,12
p97 + UBXD1	0,60 ± 0,03
p97 + UBXD1-VIMx	0,83 ± 0,06
p97	1,0 ± 0,1
p97 + CBS5083	0,51 ± 0,03
p97 + NMS873	0,43 ± 0,12
p97	0,99 ± 0,03
p97 + UBXD1	0,62 ± 0,02
p97 + Ufd1:Npl4	0,95 ± 0,05
p97 + Ufd1:Npl4 + UBXD1	0,88 ± 0,02

12.5 Atomliste  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBA1Tab. 12.11 Atomliste der zugeordneten  $^{15}\text{N}$ -,  $^{13}\text{C}$ -Atome von hHR23b-UBA1.

Aminosäure	Sequenzposition	H <sub>N</sub>	N <sub>H</sub>	CA	CB	CO
GLY	-5					
PRO	-4					
LEU	-3	8,554	122,777	55,699	42,480	178,129
GLY	-2	8,468	109,398	45,353		174,394
SER	-1	8,155	115,343	58,625	63,798	175,021
GLN	188	8,343	122,060	56,692	29,469	176,665
SER	189	8,352	116,268	59,252	63,589	175,619
TYR	190	8,449	124,450	61,865	38,404	176,769
GLU	191	8,515	117,335	59,148	28,685	179,249
ASN	192	7,948	117,597	55,804	37,829	177,262
MET	193	7,830	121,451	59,461	32,761	177,680
VAL	194	7,851	118,824	66,463	31,559	178,532
THR	195	8,123	114,461		68,814	177,367
GLU	196	8,212	123,293	59,723	29,260	179,906
ILE	197	8,032	120,930	65,418	37,098	179,593
MET	198	8,844	120,179	59,984	33,910	180,489
SER	199	7,823	114,459	61,395	63,015	174,827
MET	200	7,765	120,435	56,953	32,656	175,245
GLY	201	8,167	106,250	45,040		172,825
TYR	202	7,298	117,727	57,215	43,107	175,126
GLU	203	8,739	120,451	55,647	30,775	177,800
ARG	204	9,068	124,163	61,551	30,566	178,203
GLU	205	9,140	115,264	60,141	28,633	179,862
GLN	206	7,150	117,677	58,416	28,842	178,771
VAL	207	7,891	121,617	67,404	31,141	177,411
ILE	208	8,560	119,713	65,366	37,568	179,144
ALA	209	7,618	121,631	55,229	17,921	180,280
ALA	210	7,866	122,630	54,915	18,705	180,220
LEU	211	8,555	120,101	57,946	41,278	179,428
ARG	212	8,017	120,445	59,357	29,678	179,981
ALA	213	7,549	120,870	53,714	18,078	177,860
SER	214	7,380	110,116	57,006	64,060	174,707
PHE	215	7,468	120,007	58,939	35,530	175,649
ASN	216	8,996	110,283	54,550	36,523	172,765
ASN	217	7,327	117,590	50,317	39,553	174,872
PRO	218					
ASP	219	7,496	118,568	57,476	40,128	179,354
ARG	220	7,628	119,610	57,737	30,409	178,173
ALA	221	8,138	122,673	55,386	17,817	178,935
VAL	222	7,744	117,076	67,195	31,716	177,367
GLU	223	7,157	118,368	59,775	29,364	179,025
TYR	224	8,013	119,364	60,611	37,725	179,115
LEU	225	8,014	121,614	57,371	40,546	179,249
LEU	226	7,972	118,958	56,692	42,636	178,771
MET	227	7,541	117,401	56,431	32,865	176,500
GLY	228	7,483	113,881	46,294		179,070

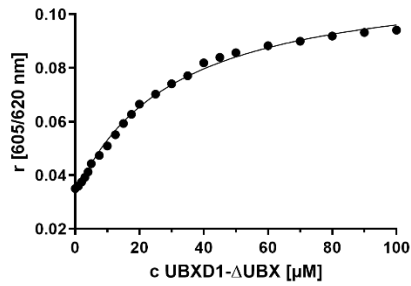
## 12.6 Interaktionen Messungen

### 12.6.1 Fluoreszenzanisotropie und ITC



**Abb. 12.6** Kontrollen der Bindungsstudien von UBXD1/p97/Ubiquitin/SUMO1.

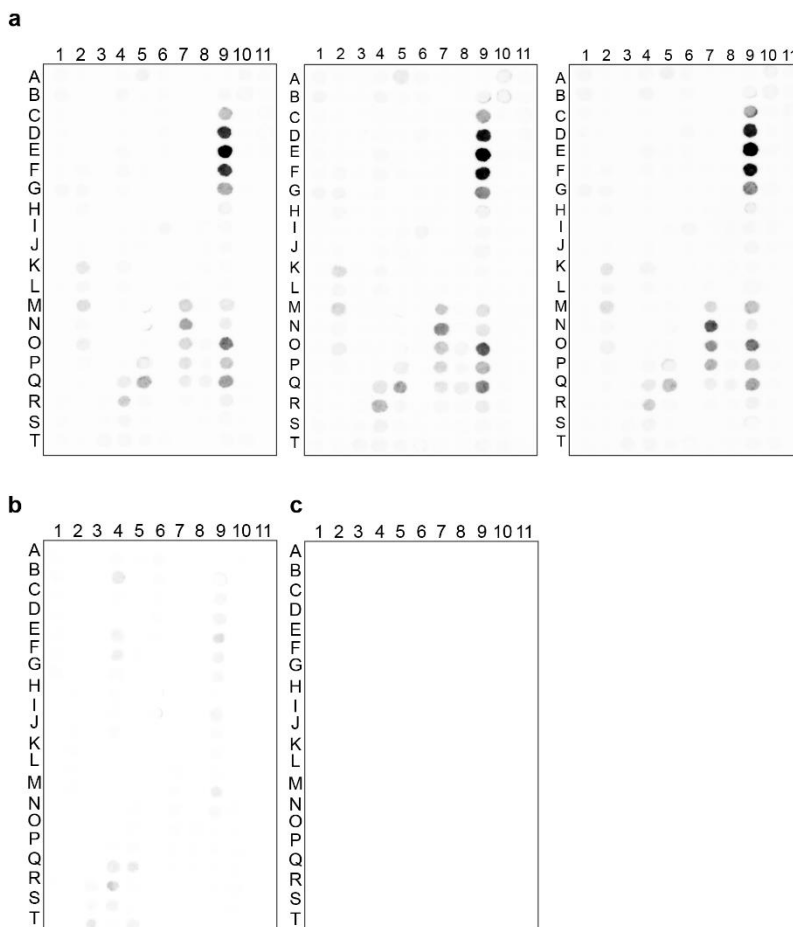
**a:** Fluoreszenzanisotropie von UBXD1-wt + p97-N Domäne (Aminosäure 1-199, Dreifachbestimmung). UBXD1-wt bindet mit einem  $K_D$  von  $22 \pm 1 \mu\text{M}$  an p97-N ( $R^2 = 0,9972$ ). **b:** Fluoreszenzanisotropiemessung von UBXD1-VIMx Mutante (D111/12AA, RL62/63AA) mit p97-N Domäne (1-199). **c:** Kontrollmessung von Atto594-GST Protein mit p97-wt. Die Messung zeigt, dass p97 nicht unspezifisch das verwendete Fluorophore Atto594 bindet. **d:** Anisotropiemessung von Atto594-SUMO1 mit UBXD1-wt. **e:** Kontrollmessung von UBXD1-wt mit Atto594-GST Protein. **f:** Anisotropiemessung von UBXD1-wt mit Atto594-Ubiquitin in Dreifachbestimmung zeigt einen  $K_D$  von  $16,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$  ( $R^2 = 0,9988$ ). **g:** ITC Messung von PBS Puffer mit Ubiquitin-wt (links) oder Ubiquitin-I44A (mitte) und ITC Messung von Ubiquitin-I44A mit UBXD1 (rechts).



**Abb. 12.7 Fluoreszenzanisotropie-Titration von Atto594-Ubiquitin mit UBXD1-ΔUBX-C.**

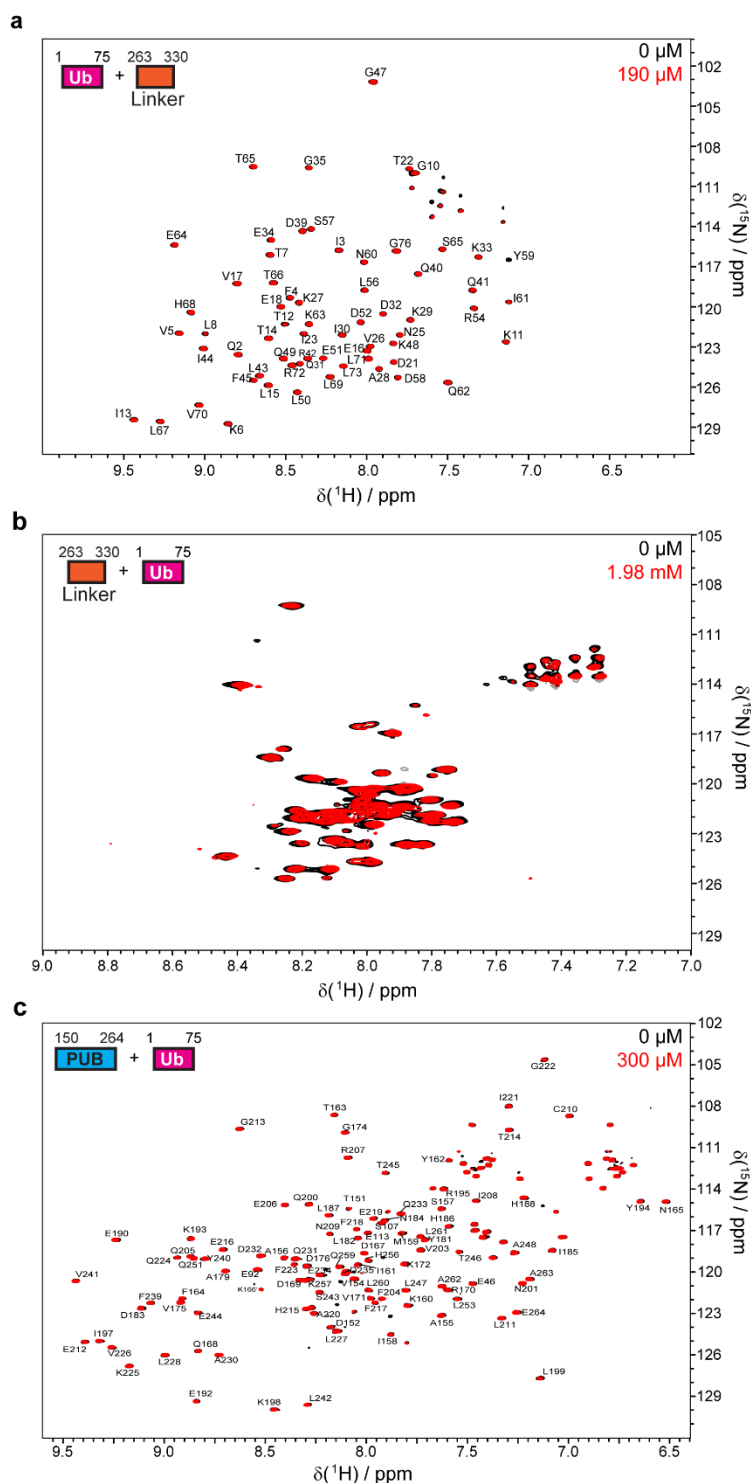
Titration von 0,1 μM Atto594-Ubiquitin mit UBXD1-ΔUBX-C-Protein ergibt einen  $K_D$ -Wert von  $30,2 \pm 2,1$  μM ( $R^2 = 0,9961$ ).

### 12.6.2 Peptid-Array



**Abb. 12.8 Peptid-Array Membranen.**

**a:** Dreifachbestimmung der Interaktion von Atto594-Ubiquitin (10 μg/mL) mit der UBXD1-Aminosäuresequenz. **b:** Kontrolle UBXD1-Membran inkubiert mit nicht-reaktivem Atto594-Tris-Farbstoff. **c:** Kontrolle UBXD1-Membran inkubiert mit 5 % BSA.

12.6.3  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titrations zwischen UBXD1 und Ubiquitin

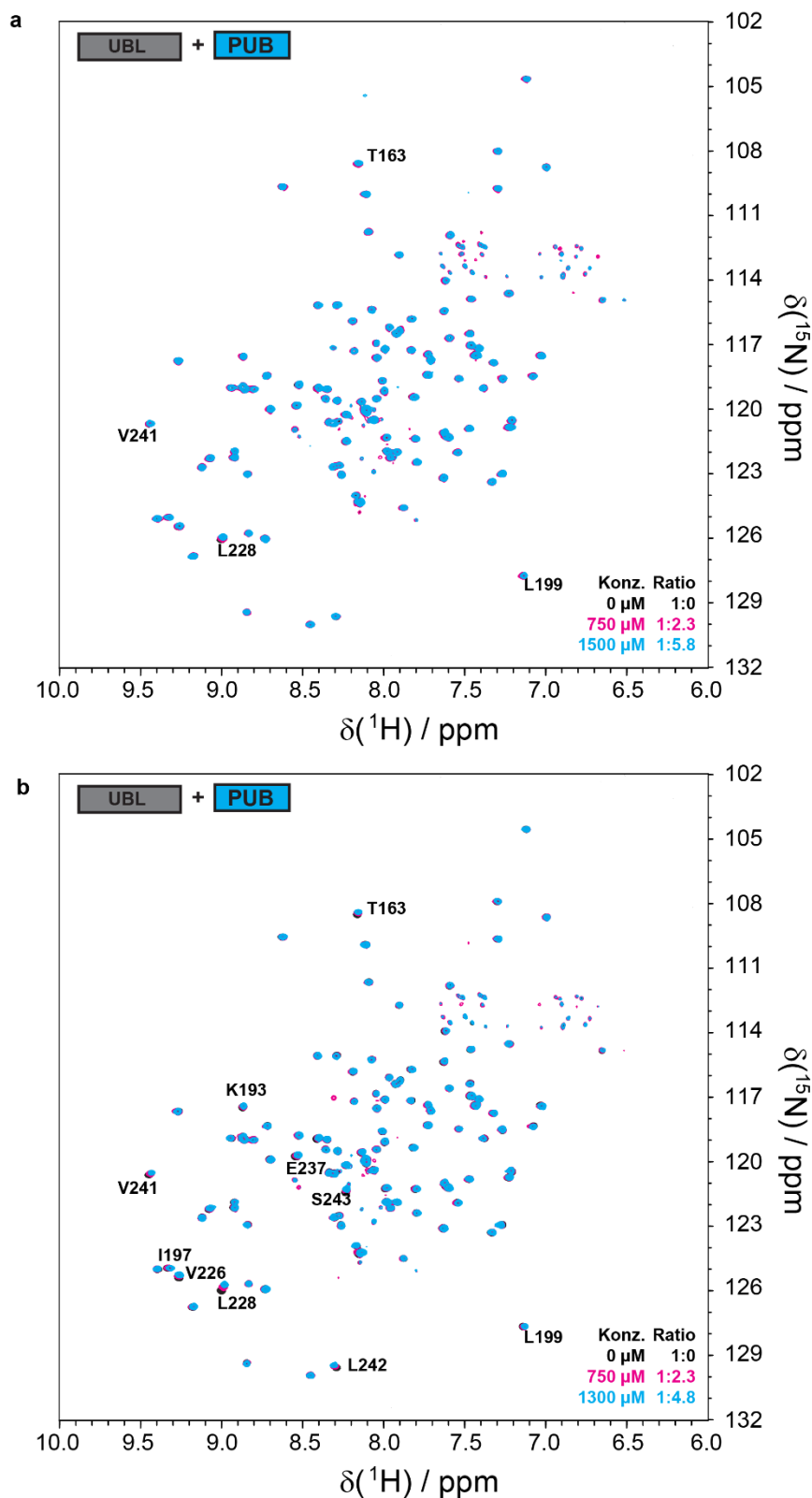
**Abb. 12.9**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titrations von UBXD1-Linker, -PUB mit Ubiquitin.

**a:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $^{15}\text{N}$ -markiertem Ubiquitin ( $50\ \mu\text{M}$ ) zeigt keine Änderung der Signale durch die Zugabe von UBXD1-Linker ( $0\ \mu\text{M}$ , Schwarz;  $190\ \mu\text{M}$ , Rot). **b:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $495\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markiertem UBXD1 Linker (263-330, Schwarz) zeigt keinen Effekt durch die Zugabe von Ubiquitin ( $1,98\ \text{mM}$ , 4-facher Überschuss, Rot). **c:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titration von  $495\ \mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -markiertem PUB-Domäne (150-264, Schwarz) zeigt keinen Effekt durch die Zugabe von Ubiquitin ( $300\ \mu\text{M}$ , 1,6-facher Überschuss, Rot).



### 12.6.4 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Titrations von UBXD1 mit HR23

Im folgenden sind die in Kapitel 5.7.2 beschriebenen NMR-Titrations von  $^{15}\text{N}$ -UBXD1-PUB mit hHR23a/b-UBL und  $^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL mit UBXD1-PUB aufgeführt.



**Abb. 12.10**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von  $^{15}\text{N}$ -PUB mit hHR23-UBL-Domäne.

**a:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von  $^{15}\text{N}$ -PUB-Domäne mit hHR23a-UBL-Domäne. **b:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von  $^{15}\text{N}$ -PUB-Domäne mit hHR23b-UBL-Domäne.

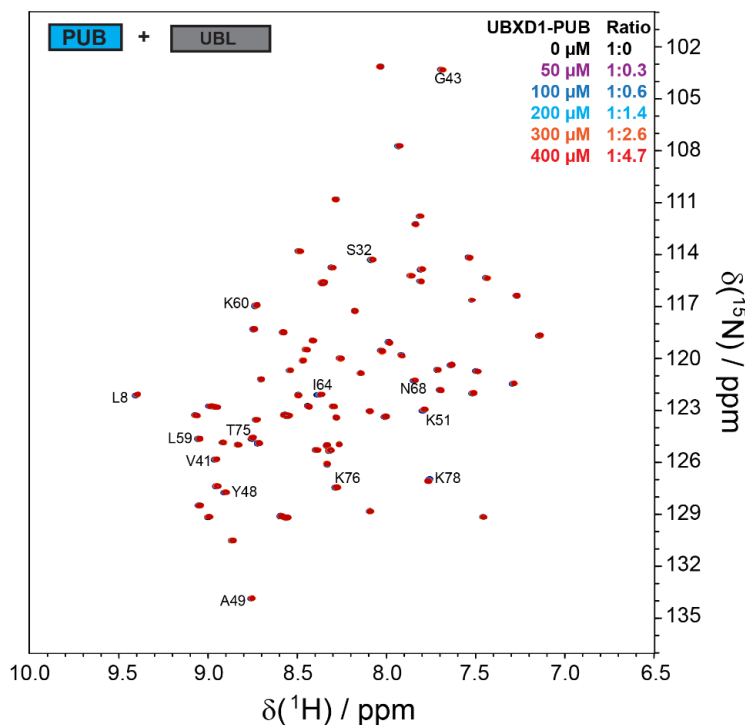


Abb. 12.11  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration von  $^{15}\text{N}$ -hHR23b-UBL mit PUB-Domäne.

### 12.6.5 Proteinaufreinigung vom gecrosslinkten PUB:UBL-Komplex

Im folgenden ist das Chromatogramm der Gelfiltration des mittels DSSO gecrosslinkten UBxD1-PUB:hHR23b-UBL-Komplexes aufgeführt, zusammen mit der Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mittels BioRad Proteinstandard.

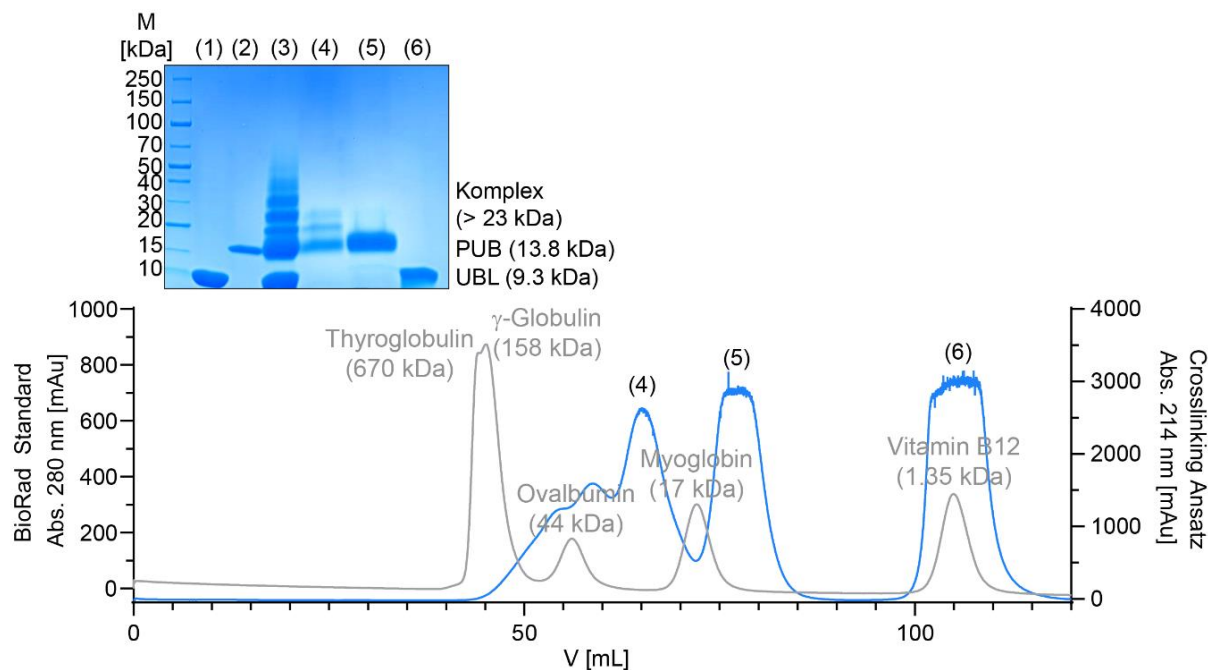
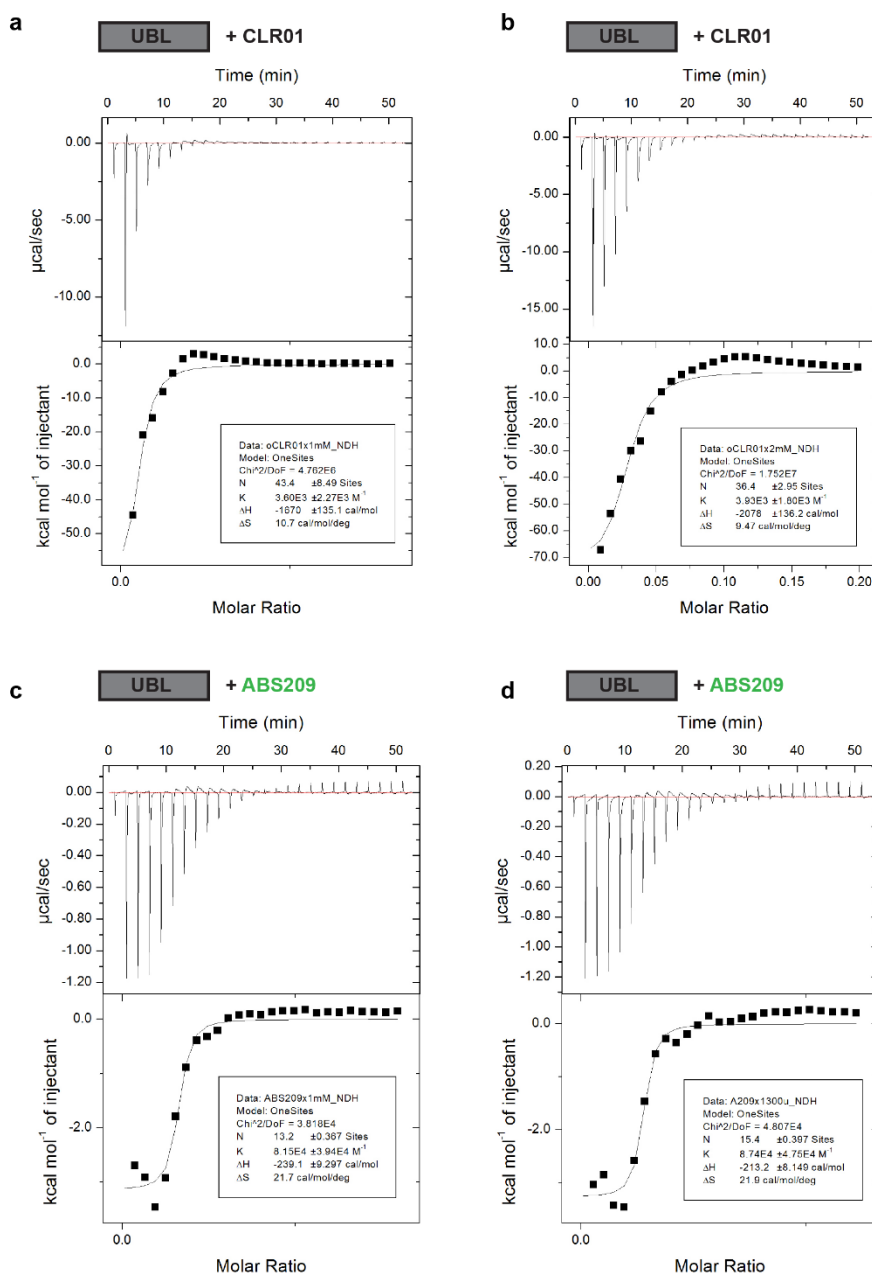


Abb. 12.12 Gelfiltration von UBxD1-PUB:hHR23b-UBL Komplex.

Der gecrosslinkte Komplex (SDS-Gel, (3)) wurde mittels Gelfiltration von nichtreagierten Proteinen getrennt, wodurch man einen aufgereinigten Komplex (4) erhält und die getrennte PUB- (5) und UBL-Domäne (6).

## 12.6.6 Interaktion zwischen hHR23b und supramolekularen Liganden



**Abb. 12.13** ITC-Messungen von hHR23b-UBL mit supramolekularen Liganden CLR01 und ABS209.

Alle ITC-Messungen wurden durchgeführt in 50 mM NaKPi-Puffer (pH 6,5) von Dr. Abna Kirupakaran (AG Prof. Schrader, Universität Duisburg-Essen). **a**: ITC-Messung von 2 mM UBL (Vorlage) mit 1 mM CLR01 (Zugabe) ergibt eine Dissoziationskonstante von  $277,8 \pm 175,2 \mu\text{M}$ . **b**: ITC-Messung von 2 mM UBL (Vorlage) mit 2 mM CLR01 (Zugabe) ergibt eine Dissoziationskonstante von  $254,5 \pm 116,6 \mu\text{M}$ . **c**: ITC-Messung von 2 mM UBL (Vorlage) mit 1 mM ABS209 AIE-Dimer (Zugabe) ergibt eine Dissoziationskonstante von  $12,3 \pm 5,9 \mu\text{M}$ . **d**: ITC-Messung von 2 mM UBL (Vorlage) mit 1,3 mM ABS209 AIE-Dimer (Zugabe) ergibt eine Dissoziationskonstante von  $18,3 \pm 9,9 \mu\text{M}$ .

## 13 Danksagungen

Als Erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Peter Bayer für die Möglichkeit der Promotion bedanken. Er hat mir ein großartiges und spannendes Projekt anvertraut, bei dem man zum einen viel lernen konnte und zum anderen unterschiedliche spannende Aspekte bearbeiten konnte. Ich bedanke mich für die Unterstützung und die Freiräume bei der Bearbeitung des Projektes, das so viele Facetten hat, denen man sich widmen konnte. Danke, dass sein Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten nie geendet hat!

Bei Herrn Prof. Hemmo Meyer bedanke ich mich für die biologische Fragestellung des Projektes und die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Bayer. Ich bedanke mich für die spannende und anregende Kooperation, in der ich immer etwas Neues gelernt habe.

Bei Herr Prof. Thomas Schrader und Dr. Abbna Kirupakaran möchte ich mich für die speziell synthetisierten supramolekularen Liganden bedanken. Die finalen Arbeiten zu diesem Projekt haben mich fasziniert und motiviert.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Kooperationspartnern Dr. Johannes van den Boom, Dr. Matthias Kracht und Dr. Abbna Kirupakaran für die tolle Zusammenarbeit, die spannenden Diskussionen und Anregungen für das Projekt.

Vielen Dank an Herrn Prof. Markus Kaiser und Dr. Farnusch Kashani für die Möglichkeit der massenspektrometrischen Analysen. Besonders möchte ich mich bei Svenja Heimann und Dr. Sabrina Ninck für die Probenaufbereitung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Bayer. Danke für die unvergessliche Zeit und dass ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite standet. Danke für unsere gemeinsame Zeit im Büro, im Labor, bei Ausflügen, gemeinsamen Feiern oder kleinen Kaffee- und Eispausen. Meine lieben Promotionsbuddys Anna, Daniel und Bianca: Danke für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und Büro, sowie für alle schönen und lustigen Momente. Schrödingers Katze in Realität, „Für nichts und wieder nichts“, Razupaltuff und so viele weitere Momente in so kurzer Zeit. Besonders auch an Anna für den Zusammenhalt vom Anfang bis zu Ende. Für unsere gemeinsame Zeit vom ersten Uni-Tag bis zur Promotion. Lieber Marius, auch wenn dich deine Promotion einige hundert Kilometer weit weg geführt hat danke ich dir für die gemeinsame Zeit, das gemeinsame Durchhalten, unsere Diskussionen und die zahlreichen Pizzas. Liebe Jenni, Fig and Kürbis are a hervorragende combination.

Liebe Alma und Tina, von euch habe ich alles über DNA, Plasmide, Proteine und Tipps und Tricks im Labor gelernt. Ihr habt mich immer unterstützt, habt mir bei Problemen geholfen und seid für mich im Labor eingesprungen, wenn ich nicht da war.

Liebe Anja und Edisa, danke, dass ihr euch immer Zeit für mich genommen habt und mich unterstützt habt. Jedes Gespräch hat mir immer weitergeholfen. Liebe Christine, ohne dich hätte das Projekt gar nicht seinen Anfang genommen und wäre nie bis zu diesem Punkt gekommen. Danke für alles was ich von dir lernen konnte und jede Diskussion zu allen Daten, jede Besprechung von Ideen, welche die Kreativität weiter angefacht haben.

Liebe Dana und Elke, danke für eure Unterstützung und unsere gemeinsame künstlerische Zeit und den ein oder anderen humorvollen Moment im Kunstmuseum. Danke Elke, du hast es immer geschafft alles hinzubekommen egal was man brauchte.

Lieber Peter Binz, danke für deine Organisation und dass du alles in Ordnung gehalten hast. Gab es Probleme hast du diese im Handumdrehen gelöst und Geräte repariert. Danke das du alle schönen Momente unserer Arbeitsgruppe mit deinen Fotos festgehalten hast.

Liebe Mina, ohne dich würde im Labor kaum etwas laufen und wenn dann nur in einem sehr langsamen Tempo. Du hast dich immer mit viel Herz um alles gekümmert.

Ausdrücklich möchte ich mich auch bei all den fantastischen Menschen bedanken, die ich während meiner Zeit in dieser Arbeitsgruppe treffen und mit denen ich Zeit verbringen durfte. Danke an die gesamte Arbeitsgruppe Vorkamp, Sabine, Tina, Terrylin, Meike, Manuela, Christoph, Marianne, Giuseppe, Tanja, Elke und Heike und unsere gemeinsame Zeit. Danke Andre, Helmut, Niklas, Joel, Lisa, Jasmin, Svenja, Doris, Melissa, Gina, Jenny, Lukas, Matthias, Angela, Alicia, Daria, Lisa Marie und Leah für jeden gemeinsamen Moment.

Insbesondere bedanke ich mich auf zu tiefst bei meiner Familie und meinen Freunden für die jahrelange Unterstützung voller guter Laune, Motivation und Zuspruch. Bei meiner Familie, insbesondere bei meiner Mutter die mir das Studium ermöglicht hat. Meiner Schwester und Larissa für ihr Interesse, ihren liebevollen Zuspruch und jeden gemeinsamen Moment.

## **14 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen in der Online-Version nicht enthalten

## 15 Eidesstattliche Erklärungen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden, Mike Blüggel

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des Doktoranden, Mike Blüggel

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2 g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. Nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die UBX-Domäne von UBXD1 organisiert die Ubiquitinbindung am C-Terminus der AAA-ATPase VCP/p97 zum proteasomalen Abbau“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Mike Blüggel befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

\_\_\_\_\_  
Name des Mitglieds der Universität Duisburg-Essen in Druckbuchstaben

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des Mitglieds der Universität Duisburg-Essen  
Prof. Dr. Peter Bayer