

Die Ufm1-Kaskade in *Caenorhabditis elegans*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

- Dr. rer. nat. -

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

im Fachbereich Biologie

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Patrick Edwin Hertel

aus Marl

Münster, im Mai 2011

Dekan: Prof. Dr. Christian Klämbt

Erster Gutachter: Prof. Dr. Eva Liebau

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Wolf-Michael Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2011

Tag der Promotion: 22.07.2011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis VII

Tabellenverzeichnis IX

Abkürzungsverzeichnis IX

1 Einleitung 1

 1.1 *Caenorhabditis elegans*-Anatomie, Vorkommen und taxonomische Einordnung 1

 1.2 *C. elegans* als Modellorganismus 1

 1.3 Posttranslationale Modifikationen 3

 1.4 Das Ubiquitin-System 4

 1.5 *Ubiquitin-like proteins* und *Ubiquitin-domain proteins* (UBLs und UDPs) 9

 1.6 Ufm1-Kaskade 10

 1.6.1 *Ubiquitin-fold modifier 1* (Ufm1) 10

 1.6.2 *Ufm1-specific proteases 1/2* (UfSP1 & UfSP2) 11

 1.6.3 *Ubiquitin-activating enzyme 5* (Uba5) 12

 1.6.4 *Ufm1-conjugating enzyme 1* (Ufc1) 13

 1.7 UPR (*unfolded protein response*) 14

 1.8 Ufm1-Kaskade (Fortsetzung) 17

 1.8.1 *Ufm1-ligating enzyme 1* (Ufl1, KIAA0776, MAXER, RCAD, NLBP) 17

 1.8.2 *Ufm1-binding protein 1* (Ufbp1, C20orf116, DDRGK, Dashurin) 18

 1.9 Potentielle Interaktionspartner der Ufm1-Kaskade 20

 1.9.1 *Kelch-like Protein-8* (Kel-8) 20

 1.9.2 *Cyclin Dependent Kinase 5 Regulatory subunit-associated protein 3* (CDK5Rap3, C53, LZAP) 21

 1.10 Zielsetzung 22

2 Material & Methoden 24

 2.1 Material 24

 2.1.1 Geräte 24

 2.1.2 Chemikalien und Fertiglösungen 25

 2.1.3 Enzyme 26

 2.1.4 Kitsysteme 27

 2.1.5 Größenstandards 27

 2.1.6 Plasmide & Oligonukleotide 28

 2.1.6.1 Vektoren und Oligonukleotide zur rekombinanten Expression in *E. coli* 28

 2.1.6.2 Vektoren und Oligonukleotide zur Hefe-Zwei-Hybrid Analyse 29

2.1.6.3 Vektoren und Oligonukleotide für Untersuchungen in <i>C. elegans</i>	31
2.1.6.3.1 Generierung des Plasmids pPD95.77N-Term	33
2.1.7 Verwendete Organismen	35
2.1.7.1 <i>C. elegans</i> -Stämme	35
2.1.7.2 <i>E. coli</i> - und <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	36
2.1.8 Antikörper	37
2.1.9 Puffer, Lösungen und Medien	37
2.2 Methoden	43
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> - Stammhaltung und Kultivierung	43
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Kultivierung und Lagerung	43
2.2.3 <i>Caenorhabditis elegans</i>	43
2.2.3.1 Stammhaltung und Kultivierung	43
2.2.3.2 <i>Bleaching</i> (Axenisieren): Synchronisation von <i>C. elegans</i> Kulturen	43
2.2.3.3 Generierung von transgenen <i>C. elegans</i> -Stämmen durch Mikroinjektion	44
2.2.3.4 Mikroskopische Untersuchung von GFP <i>C. elegans</i> -Stämmen	44
2.2.3.5 Einzelwurmlyse	45
2.2.3.6 RNAinterference (RNAi)	45
2.2.3.7 Bestimmung der adulten Lebensdauer	46
2.2.3.8 Bestimmung der postembryonalen Entwicklung und der Reproduktionsrate ..	46
2.2.3.9 Stress-Resistenz	46
2.2.3.10 Tunicamycin Sensitivitäts-assay	47
2.2.4 Sporen und Toxinpräparation von <i>Bacillus thuringiensis</i>	47
2.2.5 Statistische Auswertung	48
2.2.6 Molekularbiologische Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren	48
2.2.6.1 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>C. elegans</i> und Synthese von cDNA	48
2.2.6.2 Präparation genomischer DNA von <i>C. elegans</i>	49
2.2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
2.2.6.4 PCR-Mutagenese	49
2.2.6.5 Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen	49
2.2.6.6 Plasmidpräparation durch Fällung und über Säulenaufreinigung	49
2.2.6.7 Phenol/Chloroform-Extraktion	50
2.2.6.8 Ethanol-Natriumacetat Fällung	50
2.2.6.9 Elektrophoretische Trennung von DNA in Agarose-Gelen	50
2.2.6.10 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	51

2.2.6.11 Konzentrationsbestimmung von DNA	51
2.2.6.12 DNA-Sequenzierung	51
2.2.7 Molekularbiologische Klonierungsmethoden	52
2.2.7.1 Restriktion von DNA	52
2.2.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	52
2.2.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten	52
2.2.7.4 Klonierung von PCR-Produkten	52
2.2.7.5 Zwischenklonierung in pGEM-T-Vektor	53
2.2.7.6 Transformation von Bakterien	53
2.2.7.6.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	53
2.2.7.6.2 Plasmidtransformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> -Zellen durch Hitzeschock	53
2.2.8 Biochemische Methoden	54
2.2.8.1 Proteinexpression	54
2.2.8.1.1 Standard-Proteinexpression (IPTG-Induktion)	54
2.2.8.1.2 Proteinexpression durch Autoinduktion	54
2.2.8.2 Protein-Aufreinigung (GST-tag / His-tag)	55
2.2.8.3 Strep-tag Aufreinigung	55
2.2.8.4 Bradford-assay	55
2.2.8.5 TCA-Präzipitation von Proteinen	55
2.2.8.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.2.8.7 Tricin-Disk-Elektrophorese	56
2.2.8.8 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	56
2.2.8.8.1 Kolloidale Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	56
2.2.8.8.2 Färbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliant-Blue in Polyacrylamidgelen	56
2.2.8.9 Western-Blot Analyse	57
2.2.8.9.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen nach „Western-Blotting“	57
2.2.9 Protein-Protein Interaktionsanalysen	58
2.2.9.1 <i>In vitro</i> Thioesterbildungs-assay	58
2.2.9.2 <i>Pull-down assay</i>	58
2.2.9.3 Hefe-Zwei-Hybrid System	58
2.2.9.3.1 Transformation von Hefen	59
2.2.9.3.2 Interaktionsstudie unter Verwendung des HIS3 Reportergens (Tropftest)	60

2.2.9.4 DCLA (<i>Different Cytolocalization Assay</i>)	61
2.2.10 Probenvorbereitung für Transkriptom- und Proteom-Analysen	62
2.2.10.1 Microarray <i>C. elegans</i>	62
2.2.10.2 LC-MS Analyse von <i>uba5(ok3364)</i>	63
3 Ergebnisse	64
3.1 Interaktionsanalysen	64
3.1.1 Rekombinante Expression von Ufm1, Uba5 und Ufc1 in <i>E. coli</i>	64
3.1.2 <i>In vitro</i> Interaktionsanalyse von Uba5 und Ufm1 mittels Thioesterbildungs- <i>assay</i>	65
3.1.3 <i>In vitro</i> Interaktionsstudien zwischen Uba5 und Ufc1 (<i>Pull-down</i> Analyse)	68
3.1.4 <i>In vivo</i> Interaktionsanalyse der Ufm1-Kaskade beteiligten Komponenten mittels Hefe-Zwei-Hybrid System	70
3.1.4.1 UfSP2-Ufm1 & UfSP2- Kel8	70
3.1.4.2 Ufm1-Ufl1 & Ufm1-Ufbp1	71
3.1.4.3 Uba5-Ufc1 & CDK5Rap3-AAKB1	72
3.1.4.4 Ufl1-Ufbp1, Ufl1-CDK5Rap3 & Ufbp1-CDK5Rap3	74
3.1.5 <i>In vivo</i> Interaktionsanalyse in <i>C. elegans</i> mittels DCLA	76
3.2 Expressionsstudien der Ufm1-Kaskade und potentieller Interaktionspartner in <i>C. elegans</i>	78
3.3 Phänotypanalyse der <i>uba5(ok3364)</i> -Deletionsmutante	87
3.3.1 <i>uba5(ok3364)</i> – Reproduktion	88
3.3.2 <i>uba5(ok3364)</i> – adulte Lebensdauer	89
3.3.3 <i>uba5(ok3364)</i> - larvale Entwicklung	90
3.3.4 <i>uba5(ok3364)</i> – Stress-Resistenz	91
3.4 Reportergen-Analyse zu ER-Stress	93
3.4.1 Analyse der <i>hsp4</i> -GFP Expression unter ER-Stress nach <i>knock-down</i> von Komponenten der Ufm1-Kaskade	93
3.4.2 Analyse der <i>hsp4</i> -GFP Expression unter Stressbedingungen in <i>uba5(ok3364)</i>	95
3.5 Tunicamycin-Sensitivitäts- <i>assay</i> - <i>C. elegans</i> Entwicklung unter Tunicamycin-Stress	98
3.6 Microarray-Analyse der Deletionsmutante <i>uba5(ok3364)</i>	103
3.6.1 Analyse zur Genexpression der Ufm1-Kaskade und deren Partner in der Deletionsmutante <i>uba5(ok3364)</i>	105
3.6.2 Analyse zur verringerten Reproduktionsrate der Mutante <i>uba5(ok3364)</i> auf Transkriptomebene	106

3.6.3 Analyse zur Tunicamycin- und Hitze-Stress Resistenz der Mutante <i>uba5(ok3364)</i> auf Transkriptomenebene.....	107
3.6.4 Analyse zur oxidativen-Stress Resistenz der Mutante <i>uba5(ok3364)</i> auf Transkriptomenebene.....	109
3.6.5 Analyse zur verminderten Cadmium-Resistenz der Mutante <i>uba5(ok3364)</i> auf Transkriptomenebene.....	110
3.6.6 Analyse zur <i>Bacillus thuringiensis</i> -Stress Resistenz der Mutante <i>uba5(ok3364)</i> auf Transkriptomenebene.....	111
3.6.7 Analyse zur Regulation der Glykolyse der Mutante <i>uba5(ok3364)</i> auf Transkriptomenebene.....	112
3.7 Erste Proteom-Analyse der Deletionsmutante <i>uba5(ok3364)</i> mittels LC-MS.....	113
4 Diskussion	114
4.1 Charakterisierung der Ufm1-Kaskade anhand von Interaktionsstudien	114
4.2 Expressionsanalysen der Ufm1-Kaskade in <i>C. elegans</i>	123
4.3 Phänotypisierung der Deletionsmutante <i>uba5(ok3364)</i>	125
4.3.1 Morphologie & Reproduktionsrate	126
4.4 Stress-Untersuchungen zur Ufm1-Kaskade	126
4.4.1 ER-Stress.....	126
4.4.1.1 Identifizierung des UPR Signaltransduktors Pek-1.....	128
4.4.2 Oxidativer Stress	130
4.4.3 <i>B. thuringiensis</i> - Stressresistenz.....	131
4.4.4 Metall-Stress.....	132
4.4.5 Regulation der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs.....	133
5 Zusammenfassung.....	135
6 Anhang	136
6.1 Sequenzanalysen von Ufl1 und Ufbp1	136
6.2 Ergebnisse der LC-MS Analyse	138
7 Literaturverzeichnis.....	142

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lebenszyklus von *C. elegans*. 3

Abb. 2: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Konjugationsweg 4

Abb. 3: Darstellung der Ubiquitin-Struktur und der sieben Lysine mit ihrer bekannten Funktion. 8

Abb. 4: Tertiärstruktur von Ufm1 aus (A) *Homo sapiens* und (B) *C. elegans*. 11

Abb. 5: Aktivierung der drei Signaltransduktoren der UPR (*unfolded protein response*) unter ER-Stress 17

Abb. 6: Schematischer Verlauf der Ufm1-Konjugation..... 19

Abb. 7: DNA- und Protein-Größenstandards. 27

Abb. 8: Vektorkarten der Plasmide zur rekombinanten Expression in *E. coli*..... 28

Abb. 9: Schematische Darstellung der Hefe-Zwei-Hybrid Vektoren. 30

Abb. 10: Sequenzunterschiede von pPD95.77 zu pPD95.77N-Term. 34

Abb. 11: Vektoren für *in vivo* Untersuchung in *C. elegans*. 35

Abb. 12: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems..... 59

Abb. 13: Schematische Darstellung der DCLA-Analyse..... 62

Abb. 14: Aufreinigung der rekombinanten Expression von Uba5 (+/- DTT), Ufc1 und Ufm1 mit GST- bzw. His-tag. (1) 65

Abb. 15: *In vitro* Thioesterbildungs-assay von Ufm1 und Uba5. (1) 66

Abb. 16: Proteinidentifizierung der 100 kDa Proteinbande durch MS/MS Analyse. (1) 67

Abb. 17: Western-Blot Analyse des *in vitro* Thioesterbildungs-assay von Ufm1 durch Uba5. (1) 68

Abb. 18: His-tag *Pull-down* Analyse von Uba5 und Ufc1. (1)..... 69

Abb. 19: SDS-PAGE des Strep-tag *Pull-down assay*. (1) 70

Abb. 20: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen UfSP2-Ufm1 und Kel8-UfSP2. (4) 71

Abb. 21: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen Ufm1-Ufl1 und Ufbp1-Ufm1. (3, 5) 72

Abb. 22: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen Uba5-Ufc1 und CDK5Rap3-AAKB1. (2)..... 73

Abb. 23: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen Ufl1-Ufbp1, Ufl1-CDK5Rap3 und Ufbp1-CDK5Rap3. (3, 5)..... 75

Abb. 24: *In vivo* Interaktionsanalyse (DCLA) von *mUfm1*, Uba5 und Ufc1 in *C. elegans*. ... 78

Abb. 25: Promotorstudie des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-Pufsp2::GFP</i> in <i>C. elegans</i> (Stamm BC14232 [F38A5.1::GFP]). (4)	80
Abb. 26: Expressionsstudien des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-pro-ufm1::GFP</i> in <i>C. elegans</i> . (4)	81
Abb. 27: Expressionsmuster des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-mat-ufm1::GFP</i> in <i>C. elegans</i> . (4)	82
Abb. 28: Expressionsstudien des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-uba5::GFP</i> in <i>C. elegans</i> . (4)	83
Abb. 29: Expressionsmuster des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-ufc1::GFP</i> in <i>C. elegans</i> . (4)	84
Abb. 30: Promotorstudien des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-Puf11::GFP</i> in <i>C. elegans</i> . (5)	84
Abb. 31: Promotorstudien des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-Pufpb1::GFP</i> in <i>C. elegans</i> . (3)	85
Abb. 32: Promotorstudien des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-Pkel8::GFP</i> in <i>C. elegans</i> . (4)	85
Abb. 33: Promotorstudien des Reporter-gen-Konstrukts <i>ce-Pcdk5::GFP</i> in <i>C. elegans</i> . (3)	86
Abb. 34: Schematische Darstellung der <i>uba5</i> -Deletion im <i>C. elegans</i> -Stamm <i>uba5(ok3364)</i>	88
Abb. 35: Vergleich der Reproduktionsrate von <i>uba5(ok3364)</i> gegenüber dem Wt. (4)	88
Abb. 36: Vergleich der adulten Lebensdauer von <i>uba5(ok3364)</i> und Wt (N2) bei 20°C. (4)	89
Abb. 37: Vergleichende mikroskopische Dokumentation der Entwicklung von <i>uba5(ok3364)</i> und Wt. (4)	90
Abb. 38: Vergleich der Überlebensraten zwischen Wt und <i>uba5(ok3364)</i> nach Exposition verschiedener Stressoren. (4)	92
Abb. 39: Vergleich der Überlebensraten von Wt und den transgenen <i>pha-1(e2123)</i> Wurmlinien <i>Uba5(ÜE)</i> , <i>Ufc1(ÜE)</i> und <i>Ufc1(P)</i> bei oxidativem Stress. (4)	93
Abb. 40: Analyse der <i>hsp4</i> -GFP Expression nach <i>knock-down</i> von Komponenten der Ufm1-Kaskade unter Tunicamycin-Stress. (3)	94
Abb. 41: Auswirkung des <i>uba5 knock-outs</i> auf das <i>hsp4</i> -GFP Expressionsmuster unter Standardbedingungen und ER-Stressbedingungen. (3)	96
Abb. 42: Vergleich der Überlebensrate zwischen <i>hsp4</i> -GFP (Kontrolle) und <i>uba5(ok3364)::hsp4</i> -GFP (Kreuzung) unter ER-Stress. (3)	97
Abb. 43: Auswirkung des <i>uba5 knock-outs</i> auf das <i>hsp4</i> -GFP Expressionsmuster unter oxidativem Stress. (3)	97
Abb. 44: Auswirkung des <i>uba5 knock-outs</i> auf das <i>hsp4</i> -GFP Expressionsmuster unter Hitze-, Osmo- und UV-Stress. (3)	98
Abb. 45: Tunicamycin-Sensitivitäts- <i>assay</i> im Wildtyp (N2). (3, 4, 5)	100
Abb. 46: Tunicamycin-Sensitivitäts- <i>assay</i> in der Deletionsmutante <i>ire-1(v33)</i> . (3, 4, 5)	101
Abb. 47: Tunicamycin-Sensitivitäts- <i>assay</i> in der Deletionsmutante <i>atf-6(ok551)</i> . (3, 4, 5)	102
Abb. 48: Tunicamycin-Sensitivitäts- <i>assay</i> in der Deletionsmutante <i>pek-1(ok275)</i> . (3, 4, 5)	103
Abb. 49: Genexpressionsunterschiede zwischen Wt und <i>uba5(ok3364)</i> . (4)	105

Abb. 50: Expressionsanalyse von Komponenten der Ufm1-Kaskade. (4).....	106
Abb. 51: Expressionsanalyse der UPR-Komponenten und <i>hsps</i> . (4).....	108
Abb. 52: Expressionsanalyse des Daf-2 Signalwegs. (4).....	109
Abb. 53: Expressionsanalyse der Cadmium-Stressantwort. (4).....	111
Abb. 54: Expressionsanalyse von Enzymen der Glykolyse. (4)	112
Abb. 55: Darstellung aller ermittelten Interaktionen dieser Dissertation	114
Abb. 56: Hypothetisches Modell zur ER-Komplexbildung und möglichen Regulation durch Ufm1.....	122
Abb. 57: Ufm1-Sequenzvergleich der homologen Proteine aus <i>C. elegans</i> (C06G3.9) und <i>R. norvegicus</i>	136
Abb. 58: Multiples Sequenzalignment ausgewählter homologer Ufbp1-Proteine.....	137

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung in pGEX-4T2, pJC40 und pASK-IBA3plus.	29
Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung in pGAD.GH und pGBT9.BS.	31
Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung in den Vektor L4440.	31
Tab. 4: Oligonukleotide zur Klonierung in den Vektor pPD122.36.	32
Tab. 5: Oligonukleotide zur Klonierung in den Vektor pPD95.77.	33
Tab. 6: Oligonukleotide zur Generierung von pPD95.77N-Term und Ufm1-Klonierung.....	34
Tab. 7: Verwendete <i>C. elegans</i> -Stämme.	36
Tab. 8: Verwendete Bakterien- und Hefe-Stämme.	36
Tab. 9: Verwendete Antikörper zur Immunodetektion.	37
Tab. 10: Expressionslokalisationen aller Reporter-genkonstrukte.	87
Tab. 11: Genvergleich zwischen <i>Wt</i> und <i>uba5(ok3364)</i> bei 20°C. (4).....	104
Tab. 12: Expressionsänderung der Vitellogenin Gene <i>vit-1</i> , <i>-3</i> und <i>-4</i> . (4).....	107
Tab. 13: Expressionsänderung der <i>abu</i> -Gene <i>1</i> , <i>3</i> , <i>5</i> , <i>6</i> , <i>7</i> , <i>8</i> und <i>11</i> . (4).....	108
Tab. 14: Expressionsänderungen des Daf-2 Signalwegs und der <i>dao</i> -Gene. (4).....	110
Tab. 15: Ergebnisse der LC-MS Analyse. (4).....	138

Abkürzungsverzeichnis

#

3-AT 3-Aminotriazol

A

AAKB-1 *AMP-activated kinase beta subunit-1*
 Abb. Abbildung
 ABU *activated by blocked UPR*
 AD Aktivierungsdomäne
 AMP Ampicillin
 AMPAR *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*
 ampR Resistenz gegen Ampicillin
 AP alkalische Phosphatase
 Apg-8/ Apg-12 *autophagy-related protein-8/ -12*
 As Aminosäure(n)
 ATF6 *activating transcription factor 6*
 ATF4 *activating transcription factor 4*
 ATP Adenosintriphosphat
 AKT1 Protein Kinase B

B

BACK *BTB and C-terminal Kelch*
 BD Bindungsdomäne
 BiP *binding immunoglobulin protein*
 BTB *broad-complex, tamtrack and bric-a-brac*

C

C-Terminal Carboxy-terminal
 CBL1 *Calcineurin B-like 1*
 CDK5Rap3 *cyclin dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 3*
 cDNA copy DNA
 CIPK1 CBL-interagierende Protein-Kinase 1
 CLSM *Confocal Laser Scanning Microscope*
 CUL Cullin
 Cys Cystein

D

Daf *Dauer formation*
 DCLA *Different Cyto-localization Assay*
 dH₂O destilliertes Wasser
 dNTP Desoxynukleotidtriphosphat
 DUB *Deubiquitinating enzyme*

E

E1 Ubiquitin-aktivierendes Enzym
 E2 Ubiquitin-konjugierendes Enzym
 E3 Ubiquitin-ligierendes Enzym
 eIF2 α *translation initiation factor 2 α*
 eIF3 *translation initiation factor 3*
 ER Endoplasmatisches Reticulum

ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation</i>
F	
FAT10	<i>F-Adjacent Transcript 10</i>
FUB1	<i>Fau Ubiquitin-Like Protein 1</i>
G	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLR-1	AMPA-Untereinheit
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
H	
HECT	<i>Homologous to the E6-AP Carboxyl terminus</i>
His	Histidin
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
I	
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im Lebendigen
ISG15	<i>Interferon-Stimulated Gene 15</i>
Ire-1	<i>Inositol-requiring enzyme-1</i>
K	
Kel-8	<i>Kelch-like protein-8</i>
L	
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<i>matUfm1</i>	prozessiertes Ufm1 (<i>mature</i>)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MTLS	<i>Membrane Tether Localization Signal</i>
MW	Molekulargewicht
N	
N-Terminal	Amino-terminal
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NEDD8	<i>Neuronal Precursor Cell-Expressed Developmentally Downregulated8</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NFkB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
Ni	Nickel
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NTA	Nitriloessigsäure (<i>nitriltriacetic acid</i>)

O

OD Optische Dichte

P

PCI *proteasome-COP9-initiation factor*
 Pek-1 *PKR-like ER protein kinase/pancreatic eIF2 α kinase-1*
proUfm1 Ufm1-Vorstufe

R

RelA *v-Rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*
 RING *Really Interesting New Gene*
 ROS *Reactive Oxygen Species*
 rpm *rounds per minute*
 RPY-1 *Rapsyn Homolog in C. elegans*
 RT Raumtemperatur

S

SD synthetisch definiertes Medium
 ssDNA einzelsträngige DNA
 SUMO *Small Ubiquitin-Related Modifier*

T

Tab. Tabelle
 TPI Triosephosphat Isomerase
 Trp Tryptophan

U

Ub Ubiquitin
 Uba5 *Ubiquitin-activating enzyme 5*
 UBD *Ubiquitin Binding Domain*
 UBL *Ubiquitin-like protein*
 UBL5 *Ubiquitin-like Protein 5*
 UDP *Ubiquitin Domain Protein*
 Ufbp1 *Ufm1-binding protein 1*
 Ufc1 *Ufm1-conjugating enzyme 1*
 Ufl1 *Ufm1-ligating enzyme 1*
 Ufm1 *Ubiquitin-fold modifier 1*
 UfSP1/UfSP2 *Ufm1-specific protease 1/2*
 ÜK Übernachtkultur
 ÜN über Nacht
 UPR *Unfolded Protein Response*
 UPS *Ubiquitin Proteasome System*
 Urm1 *Ubiquitin-related modifier-1*
 UV Ultraviolett

V

v/v Volumen pro Volumen

W

w/v

Gewicht pro Volumen

w/w

Gewicht pro Gewicht

X

x g

Vielfaches der Erdbeschleunigung

Xbp-1

X-box-binding protein 1

1 Einleitung

1.1 *Caenorhabditis elegans*-Anatomie, Vorkommen und taxonomische Einordnung

C. elegans gehört zum Stamm der Nematoden (Fadenwürmer) und wird zur Gruppe der Ecydsozoa (Häutungstiere) gezählt (Blaxter 1998, Kiontke und Sudhaus 2006).

Der etwa 1 mm lange freilebende Nematode kommt in Kompost und feuchten Böden vor. Er bevorzugt eine niedrige Sauerstoffkonzentration (6 %) sowie eine Temperatur von 15 – 25°C.

C. elegans weist einen unsegmentierten, bilateral symmetrisch aufgebauten Körper auf, der von einer Cuticula geschützt wird (Barriere und Felix 2005, Corsi 2006, Kiontke und Sudhaus 2006). Die Körperhöhle von *C. elegans* ist ein enges Pseudocoel und ersetzt das in Nematoden nicht vorhandene Blutssystem zur Nährstoffverteilung. Die starke Cuticula und der hohe Innendruck der Pseudocoelflüssigkeit bilden ein so genanntes Hydroskelett. Pharynx, Darm und After formen den Intestinaltrakt, wobei der Darm die Funktionen einer Leber und Niere in sich vereinigt. Die Cuticula, das Ektoderm und die Längsmuskulatur stellen den Hautmuskelschlauch dar, der die sinusoidale Fortbewegung hauptsächlich durch die Längsmuskulatur ermöglicht. Das Zentralnervensystem von *C. elegans* besteht aus einem circumoesophagealen Ring und einem ventralen Markstrang (Corsi 2006).

C. elegans besitzt einen diploiden Chromosomensatz mit fünf Autosomen und einem Geschlechtschromosom und kommt meist als Hermaphrodit mit zwei X-Chromosomen vor (Gems *et al.* 1998). Bei einer *Non-Disjunction* in der Meiose, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,05 % auftritt und durch Stressbedingungen induziert werden kann, entstehen Männchen (XO). Die im Vergleich zu Hermaphroditen etwas kleineren Männchen lassen sich anatomisch unter anderem durch ein Kopulationshilfsorgan (Spicula) an der Schwanzspitze erkennen (Barriere und Felix 2005). Hermaphroditen produzieren durch Selbstbefruchtung bis zu 300 Nachkommen, wobei die Spermienanzahl der Hermaphroditen hier den limitierenden Faktor darstellt. So können nach Verpaarung mit einem Männchen bis zu 1000 Nachkommen entstehen (Gems und Riddle 2000). Eine Besonderheit von *C. elegans* stellt die Eutelie (Zellkonstanz) dar, wobei man das Schicksal einer jeden Zelle vom L1-Stadium bis zum adulten Organismus kennt. Die somatische Zellzahl beträgt bei adulten Hermaphroditen 959 und bei Männchen 1031 (Kaletta und Hengartner 2006).

1.2 *C. elegans* als Modellorganismus

Sydney Brenner führte *C. elegans* als Modellorganismus 1965 ein, weil zur Beantwortung neurologischer Fragen die überschaubare Anatomie vorteilhaft erschien (Brenner 1974). 1998 wurde das Erbgut von *C. elegans* als erstes tierisches Genom vollständig sequenziert. Es

besteht aus ca. 19.000 Genen und umfasst 100 Millionen Basenpaare (*C. elegans Sequencing Consortium* 1998). Die einfache Kultivierung und auch Charakteristika des Organismus selbst haben *C. elegans* zu einem Modellorganismus werden lassen. Innerhalb von 3,5 Tagen durchläuft *C. elegans* 4 Larvalstadien (Abb. 1) mit anschließender Geschlechtsreife und zeigt somit eine für die Forschung vorteilhafte kurze Generationszeit (Edgar und Wood 1977). Als Nahrungsquelle fungieren Bakterien, weshalb eine leichte Kultivierung auf Agarplatten sowie in Flüssigkulturen im Labor erfolgen kann. Durch die Erstellung von Glycerinstocks kann eine dauerhafte Lagerung der Würmer bei einer Einfrier-Temperatur von -80°C erfolgen. Die Transparenz von *C. elegans* ermöglicht die mikroskopische Beobachtung aller Entwicklungsstadien und ist vorteilhaft für die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen (Chalfie *et al.* 1994). Des Weiteren kann durch Reportergenkonstrukte die Expression und Lokalisation von *C. elegans* Proteinen *in vivo* dokumentiert werden (Gonzalez-Serricchio und Sternberg 2006). Die Haltung homozygoter *C. elegans*-Stämme wird durch das vorherrschende Vorkommen als Hermaphrodit enorm erleichtert, da eine Rekombination des Genoms nur durch die Verpaarung von Hermaphroditen mit spontan auftretenden Männchen erfolgen kann. Weiterhin eignet sich *C. elegans* zur genetischen Manipulation. So können durch Mikroinjektion stabile Transfektanten erstellt und der *knock-down* von Genen durch RNAi herbeigeführt werden. Zahlreiche *C. elegans* Mutantenstämme sowie eine RNAi-Bank mit vielen bereits generierten Konstrukten zu *knock-down* Untersuchungen sind bereits vorhanden (Gonczy *et al.* 2000, Maeda *et al.* 2001, Corsi 2006). In *C. elegans* gewonnene Erkenntnisse können auf Grund vieler konservierter Signalwege in diesem Modellorganismus zum Teil auf homologe Proteine des Menschen übertragen werden (Culetto und Sattelle 2000).

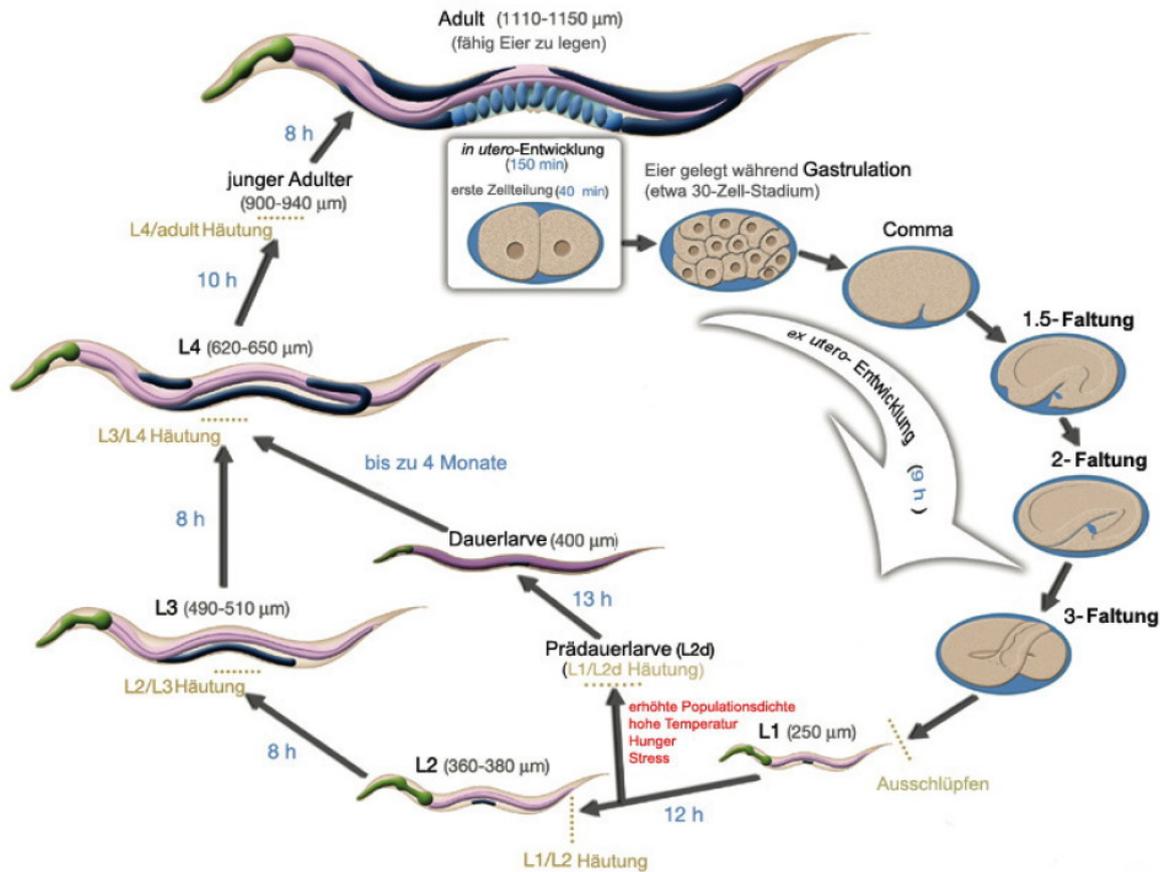


Abb. 1: Lebenszyklus von *C. elegans*.

Nach Beendigung der embryonalen Entwicklung, die in den Gonaden der Hermaphroditen beginnt, durchläuft *C. elegans* vier, durch Häutungen getrennte, Larvalstadien. Der Lebenszyklus endet mit dem geschlechtsreifen adulten Stadium, welches nach 72 h bei 20°C erreicht wird. Unter schlechten Umweltbedingungen, wie z.B. einer erhöhten Populationsdichte oder erhöhten Temperatur entwickelt sich *C. elegans* direkt vom L1-Stadium zu einem alternativen larvalen Stadium. Dieses Stadium wird als Dauerlarve bezeichnet und ist gekennzeichnet durch eine verdickte Cuticula und einen reduzierten Metabolismus. Bis zu 4 Monate kann *C. elegans* als Dauerlarve überleben und bei verbesserten Umweltbedingungen unmittelbar als L4-Larve wieder in den Lebenszyklus eintreten. Die Lebensdauer von *C. elegans* unter optimalen Umweltbedingungen bei 20°C beträgt ca. 3 Wochen (Abb. verändert nach <http://www.wormatlas.org>).

1.3 Posttranslationale Modifikationen

Veränderungen der Aktivität, Stabilität und intrazellulären Lokalisation von Proteinen sind für viele zelluläre und für den Organismus lebensnotwendige Prozesse erforderlich. Eine hohe Variabilität im Proteom wird durch gezielte Protein-Veränderungen nach der Translation, die als posttranslationale Modifikationen bezeichnet werden, gewährleistet (Kerscher *et al.* 2006). Diese umfassen das Anheften von Molekülen bzw. funktioneller Gruppen an spezifische Aminosäuren, wie beispielsweise Phosphat-Gruppen (Nixon *et al.* 1987, Cai *et al.* 2001), Kohlenhydraten (Zhao *et al.* 2008), Stickstoffmonoxid (Foster *et al.* 2009), Lipiden (Huang *et al.* 2009), Acetyl- und Methyl-Gruppen (Yang und Seto 2008) oder Peptiden wie Glutathion (Yamakura und Kawasaki 2010), Ubiquitin und Ubiquitin-verwandten Proteinen (Pickart

2001). Im Gegensatz zu niedermolekularen Modifikationen kommt es beim Anheften von kleinen Proteinen auf Grund ihrer Polypeptidstruktur zu einer höheren chemischen Variation der konjugierten Proteine. Somit werden trotz gleicher Aminosäure (As)-Sequenzen funktionelle Unterschiede der Proteine durch posttranslationale Modifikationen ermöglicht (Schwartz und Hochstrasser 2003).

1.4 Das Ubiquitin-System

Ubiquitin, welches ein Molekulargewicht von 8,5 kDa besitzt, stellt den bekanntesten Vertreter der proteinbasierenden Modifikation anderer Proteine dar. Ubiquitin ist in Eukaryoten hochkonserviert und wird in nahezu allen lebenden Zellen exprimiert (Vijay-Kumar *et al.* 1987, Hershko und Ciechanover 1998). Die Ubiquitin-Bildung erfolgt als Vorläuferprotein, welches am C-terminalen Ende zunächst durch spezifische Proteasen (DUBs; *deubiquitinating proteins*) prozessiert werden muß. Hierbei erfolgt die Exposition eines hochkonservierten Di-Glycinmotifs, das zur späteren Konjugation an zelluläre Proteine verwendet wird (Wilkinson 1997, Pickart und Eddins 2004). Die Ubiquitinierung beschreibt die Konjugation eines Ubiquitin-Moleküls an ein Zielprotein durch eine sequentielle katalytische Reaktion multipler Enzyme, bestehend aus aktivierendem Enzym (E1), konjugierendem Enzym (E2) und ligierendem Enzym (E3) (Hurley *et al.* 2006). Am Ende dieses Signalwegs entsteht eine Amidbindung zwischen der Lysin ϵ -Amino-Gruppe des Zielsubstrats und dem α -Carboxyl-Glycin von Ubiquitin (Pickart und Eddins 2004) (Abb. 2).

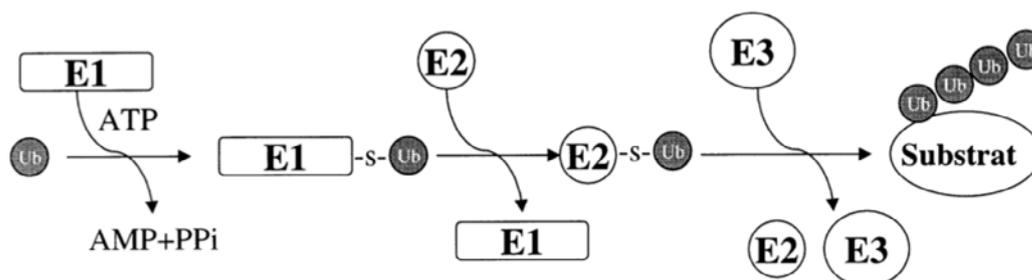


Abb. 2: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Konjugationsweg.

Die Ubiquitinierung erfolgt in drei enzymatischen Schritten. Hierbei wird Ubiquitin (Ub) durch ein E1-Enzym aktiviert, anschließend auf ein E2-konjugierendes Enzym übertragen und mit Hilfe einer E3-Ligase an ein Zielprotein konjugiert.

Der zu Grunde liegende Mechanismus zur Ubiquitin-Konjugation wird im Folgenden aufgeschlüsselt. Zunächst wird das zuvor prozessierte Ubiquitin in einem ATP-abhängigen Prozess durch das E1-Enzym aktiviert. Dies führt zu der Ausbildung einer Thioesterbindung zwischen dem Cystein im aktiven Zentrum des E1-Enzyms und dem C-terminalen Glycin-

Rest von Ubiquitin. Die anschließende Ubiquitin-Aktivierung erfolgt über die Bildung zweier Intermediate. Zuerst katalysiert das E1-Enzym unter ATP-Verbrauch die C-terminale Adenylierung des Ubiquitins. Dies führt zu einer nicht-kovalenten Komplex-Bildung des adenylierten Ubiquitins mit dem E1-Enzym (*A-site binding*). Anschließend greift das katalytisch aktive Cystein des E1-Enzyms die Ubiquitin-Adenylat Bindung an und bildet dadurch eine kovalente Bindung via Thioester zwischen Ubiquitin und E1-Enzym aus (*T-site binding*). Daraufhin erfolgt die erneute Adenylierung eines Ubiquitin-Moleküls, welches wiederum die *A-site* besetzt. Das Thioester-gebundene Ubiquitin wird unmittelbar vom E1-Enzym auf das Cystein im aktiven Zentrum des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2), durch erneute Ausbildung einer Thioesterbindung, übertragen. Diesem Mechanismus liegt eine Konformationsänderung des E1-Enzyms nach Ubiquitin-Bindung zu Grunde, welche die E2-Bindungsstelle freilegt und die Bindung damit erst ermöglicht. Im Allgemeinen bindet ein E2-Enzym erst das E1-Enzym mit erhöhter Affinität, wenn das E1-Enzym den Modifizierer trägt (Pickart 2001, Hochstrasser 2004, Schulman und Harper 2009, Ye und Rape 2009).

Allen E2-Enzymen ist eine hochkonservierte Kerndomäne mit einer Länge von ca. 150 As gemein, welche das katalytische Zentrum bildende Cystein umfasst. Auf Grund dieser hochkonservierten Kerndomäne wird ein sehr ähnlicher Mechanismus der Interaktion zwischen Ubiquitin und anderen E2-Enzymen angenommen (Cook *et al.* 1994, Huang *et al.* 1999, Jiang und Basavappa 1999). Variierende N- oder C-terminale Erweiterungen sind in vielen E2-Enzymen zu finden und vermitteln vermutlich die Spezifität und Varianz in der Interaktion zu E1- und E3-Enzymen (Pickart 2001).

E2-Enzyme wurden häufig lediglich als Ubiquitin-Träger gesehen. Aktuelle Studien hingegen zeigen, dass sie eine aktive Rolle bei der Entscheidung bezüglich Länge und Topologie der Ubiquitin-Ketten während der Polyubiquitinierung einnehmen (Ye und Rape 2009). Der abschließende Transfer des Ubiquitin gebundenen E2-Intermediats auf das Zielprotein wird durch ein Ubiquitin-ligierendes E3-Enzym katalysiert. Es kommt daraufhin zur Ausbildung der bereits beschriebenen Amidbindung zwischen Ubiquitin und dem Zielprotein (Pickart 2001, Hochstrasser 2004).

Freie E3-Enzyme binden innerhalb des Ubiquitin-Signalwegs sofort E2-Enzyme, wenn diese mit Ubiquitin gebunden vorliegen. Eine deutlich geringere Affinität besitzen sie zu freien E2-Enzymen. Die auftretenden Unterschiede in der relativen Affinität zueinander unterstützen den Ubiquitin-Transfer entlang der enzymatischen Kaskade (Ye und Rape 2009). Da E1- und E3-Enzyme eine überlappende Bindungsdomäne zu E2-Enzymen besitzen, kann ein E2-

Enzym nicht durch ein E1-Enzym erneut mit Ubiquitin beladen werden, solange es das E3-Enzym gebunden hat (Eletr *et al.* 2005, Huang *et al.* 2005).

Die Ubiquitin-Ligasen selbst bilden eine große Proteinfamilie, wobei deren Familiengröße je nach Organismus zwischen mehreren hundert bis zu über tausend Mitgliedern variieren kann. Grund für diese enorme Anzahl von E3-Ligasen ist die Funktion dieser Proteine bei der Zielsubstraterkennung. Hierdurch wird die Regulation von verschiedenen Zellprozessen ermöglicht (Hershko und Ciechanover 1998, Pickart und Eddins 2004, Schulman und Harper 2009). E3-Enzyme binden ihr Zielprotein auf der Grundlage von verschiedenen Erkennungsmustern. Hierbei zählen die „destabilisierenden“ N-terminalen As (sogenannte *N-end-rule*) zu den wichtigsten Mustern (Herrmann *et al.* 2007).

E3-Ligasen werden nach ihren charakteristischen Domänen in zwei Hauptklassen unterteilt: HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*)- und RING (*Really Interesting New Gene*)-Ligasen. Im Menschen zählen 95% aller identifizierten E3-Ligasen zu der Gruppe der RING-Ligasen, während lediglich 28 E3-Ligasen der HECT-Familie angehören (Robinson und Ardley 2004, Rotin und Kumar 2009).

HECT-Ligasen katalysieren die Ubiquitin-Konjugation in zwei aufeinander folgenden Schritten. Zunächst wird ein Ubiquitin-E3-Intermediat am katalytischen Cystein der 350 As langen C-terminalen HECT-Domäne gebildet. Anschließend erfolgt die Übertragung des E3 gebundenen Ubiquitins auf das entsprechende Zielprotein. Der N-Terminus der HECT-Ligasen ist hierbei für die E2-Bindung verantwortlich (Huibregtse *et al.* 1995, Pickart 2001, Rotin und Kumar 2009).

RING-Ligasen besitzen eine RING *finger* Domäne, welche im Gegensatz zur HECT-Domäne keine katalytische Aktivität besitzt. Das E2-gebundene Ubiquitin wird auf das Zielprotein übertragen, ohne dabei eine kovalente Bindung mit dem E3-Enzym einzugehen. Zum Ubiquitin-Transfer ist eine simultane Bindung des Ubiquitin gebundenen E2-Enzyms und dem Zielprotein absolut notwendig. RING-Ligasen können als Monomer (z.B. CBL) oder als multimere Komplexe (z.B. Cullin-E3) vorkommen (Kipreos 2005, Rotin und Kumar 2009).

Die globuläre Struktur der E3-Ligasen fungiert generell als Gerüst für die Interaktion zwischen Zielprotein und Ubiquitin. Dabei wird das zu modifizierende Lysin des Zielproteins so positioniert, dass ein nukleophiler Angriff durch As des aktiven Zentrums des konjugierenden E2-Enzyms bei RING-Ligasen oder am Cystein von HECT-Ligasen erfolgt und eine Isopeptidbindung gebildet werden kann (Zheng *et al.* 2002, Orlicky *et al.* 2003, Petroski 2008). Die Regulation der Aktivität und Stabilität von E3-Ligasen kann unter anderem durch Phosphorylierung und Auto-Ubiquitinierung erfolgen (Hunter 2007).

Innerhalb der Kontroll- und Regulationsmechanismen der Zelle weist Ubiquitin vielseitige Funktionen auf, welche die Stabilität, Aktivität und Lokalisation von Proteinen beeinflussen können (Hochstrasser 1996). Im Menschen sind bisher 2 E1-, mindestens 38 E2-, 600 - 1000 E3-Enzyme und diversen Hilfsfaktoren bekannt. Bedingt durch den hierarchischen Ablauf der Ubiquitin-Konjugation ergeben sich somit eine Vielzahl verschiedener Kombinationsmöglichkeiten, weshalb das Ubiquitin-System einen enzymatischen Reaktionsweg mit hoher Variabilität darstellt (Ye und Rape 2009). Die zuerst entdeckte und wahrscheinlich auch bekannteste durch Ubiquitin vermittelte Funktion stellt der Proteasom-abhängige Abbau von denaturierten oder fehlgefalteten Proteinen dar (Coux *et al.* 1996, Bonifacino und Weissman 1998). Die verschiedenen Abbausignale intrazellulärer Proteine werden mit hoher Substratspezifität durch E3-Ligasen erkannt. Signale sind meist an der Proteinoberfläche präsentierte hydrophobe Aminosäuren oder untypische Konformationsmotive (Ross und Pickart 2004). Auch kann es zu einer unbeabsichtigten Degradation von neu synthetisierten Proteinen kommen, da diese vorübergehend Abbausignale auf ihrer Oberfläche exponieren (Ross und Poirier 2005).

Mittlerweile sind viele weitere bedeutende Funktionen des Ubiquitinsystems aufgeklärt worden. Diese reichen von der Steuerung des Zell-Zyklus durch die periodische Proteolyse von Cyclinen und der Genregulation durch die proteasomale Degradation von Transkriptionsfaktoren bis hin zur Regulation einer Vielzahl essentieller Prozesse bei der DNA-Reparatur, Immunantwort, Endocytose, Stressantwort und Wachstumsfaktor-Signalwege (Hershko und Ciechanover 1998, Reed 2003, Kerscher *et al.* 2006, Huen und Chen 2008).

Eine Ubiquitin-Konjugation auf ein Zielprotein kann sowohl als einzelnes Molekül (Monoubiquitinierung) als auch als lineare oder verzweigte Kette (Polyubiquitinierung) erfolgen. Bei der Polyubiquitinierung erfolgt die Verknüpfung der Moleküle miteinander durch eines der sieben verschiedenen Lysine des Ubiquitin. Die Wahl der Lysine innerhalb dieser Kettenbildung kann variieren und Einfluss auf die posttranslationale Modifikation durch die Struktur der Ubiquitin-Kette (linear oder verzweigt) nehmen. Beispielsweise kommt es bei einer linearen Polyubiquitinierung an Lys⁴⁸ ab vier Ubiquitinmolekülen zum proteasomalen Abbau des markierten Proteins vermittelt durch spezifische Rezeptoren des 26S Proteasoms (Abb. 3) (Ye und Rape 2009). Je nach Auswahl der sieben Ubiquitin-Lysine zur Polyubiquitinierung kann also ein anderer regulatorischer Mechanismus ablaufen.

Zur Verknüpfung mehrerer Ubiquitin-Moleküle miteinander ist teilweise ein als E4 bezeichneter Konjugationsfaktor notwendig (Kogel *et al.* 1999). Da E4-Enzyme weder die

E3-Ligase ersetzen noch mit dem E2-Enzym interagieren können wird angenommen, dass es sich hierbei nicht um eine Sonderform der E3-Ligasen handelt, sondern um eine eigenständige Enzymklasse (Hoppe 2005). E4-Enzyme teilen eine modifizierte RING *finger* ähnliche Domäne, die als U-Box Domäne bezeichnet wird und der die Metall-Chelat-Region fehlt (Hatakeyama *et al.* 2001).

Des Weiteren gibt es die Ubiquitin-Konjugationsform der Multiubiquitinierung, wobei ein Substrat mehrfach an verschiedene Lysine mit mehreren Ubiquitin-Molekülen konjugiert wird. Sowohl bei einer Poly- als auch einer Multiubiquitinierung verbleibt das Substrat am E3-Enzym und durchläuft mehrmals den Konjugationsweg (Young *et al.* 1998, Pickart 2001, Adhikari und Chen 2009). Die Verbindungsart und Länge einer Modifikation durch Ubiquitin ist daher von entscheidender Bedeutung für die Regulation eines Proteins. In Abb. 3 ist die Struktur von Ubiquitin sowie dessen einzelne Lysin-Reste mit ihrer bisher bekannten Funktionen nach einer Polyubiquitinierung dargestellt (Komander 2009).

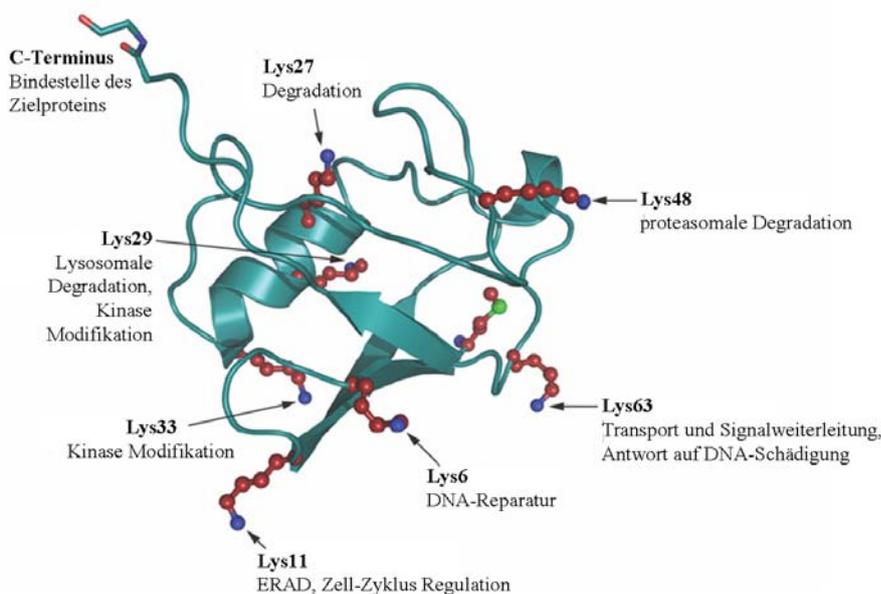


Abb. 3: Darstellung der Ubiquitin-Struktur und der sieben Lysine mit ihrer bekannten Funktion.

α -Helices sind spiralförmig und β -Faltblätter als Pfeile dargestellt. Die Sauerstoff- und Stickstoffatome des Di-Glycin Motivs am C-Terminus sind rot bzw. blau dargestellt. In rot visualisiert sind alle sieben Lysin-Reste mit ihrer bekannten Funktion bei einer Polyubiquitinierung. Die Stickstoffgruppen der Lysine sind blau markiert (verändert nach Komander 2009).

Wie beschrieben handelt es sich bei der Ubiquitinierung um einen hochregulierten, reversiblen Prozess. Wichtige Regulatoren bei der Ubiquitinierung sind die DUBs (Thiolproteasen; Säuger ca. 100 DUBs). DUBs hydrolysieren spezifisch die Isopeptidbindung des konjugierten Ubiquitins und können somit die kovalente Modifizierung aufheben. Neben der Katalyse, der Prozessierung und der Dekonjugation weisen DUBs, zumindest im Fall von

Ubiquitin, ebenfalls eine *proof reading* Funktion bei der Polyubiquitinierung auf. Dieser reversible Regulationsmechanismus erlaubt eine schnelle und effiziente Anpassung auf sich ändernde Bedingungen in der Zelle (Wilkinson 1997, Komander 2009).

Die Ursache vieler neurodegenerativer Erkrankungen, wie Parkinson oder Angelman-Syndrom, aber auch Krebs, lässt sich auf eine Dysfunktion des Ubiquitin-Systems oder konkreter auf Mutationen in der Gensequenz von Ubiquitin-Ligasen zurückführen (Robinson und Ardley 2004, Ross und Poirier 2005, Petroski 2008).

1.5 Ubiquitin-like proteins und Ubiquitin-domain proteins (UBLs und UDPs)

Seit der Entdeckung des Ubiquitins 1974 konnten viele Proteine identifiziert werden, die strukturell dem Ubiquitin ähnlich sind oder eine vergleichbare Funktion einnehmen. Diese Ubiquitin-verwandten Proteine werden anhand ihrer Wirkungsweise in zwei Klassen gruppiert (Jentsch und Pyrowolakis 2000, Ciechanover 2005).

Proteine der Klasse 1 werden als *Ubiquitin-like proteins* (UBLs) bezeichnet. Die Verwandtschaft zu Ubiquitin wird weniger durch eine hohe Sequenzhomologie als vielmehr durch eine ähnliche Tertiärstruktur bedingt. Die β -*grasp* Faltung und ein C-terminaler Glycin-Rest sind Grundvoraussetzungen zur Klassifizierung als UBL. Analog zur Ubiquitin-Kaskade wird die Carboxyl-Gruppe der UBLs zur Isopeptidbindung an Lysin-Reste von Zielproteinen verwendet. Somit fungieren UBLs auf eine Ubiquitin-ähnliche Weise und werden an Zielproteine konjugiert. Im Gegensatz zu Ubiquitin werden die meisten UBLs als Monomer an ihr entsprechendes Zielprotein übertragen.

Ähnlich zu Ubiquitin führt die UBL-Konjugation zu einer veränderten Oberflächentopographie, die sich zumindest lokal sehr von der Topographie der unmodifizierten Proteine unterscheidet. Dadurch werden die Bindungseigenschaften, die Enzymaktivität oder subzelluläre Lokalisation und somit folglich auch die Halbwertszeit eines Proteins bestimmt.

Wie auch Ubiquitin werden die meisten UBLs als Vorstufen synthetisiert welche zunächst durch entsprechende Proteasen prozessiert werden müssen. Diese UBL-Proteasen sind nicht wie Ubiquitin-Proteasen monospezifisch, sondern weisen häufig neben einer C-terminalen Hydrolase-Aktivität auch eine Isopeptidase-Funktion auf. Somit kann die UBL-Konjugation des Zielproteins schnell aufgehoben werden und stellt eine sehr dynamische und reversible Modifizierung dar.

Zumindest neun verschiedene UBL-Klassen konnten in Säugern identifiziert werden. UBLs der Klasse 1 sind, neben Ubiquitin selbst, ISG15, FUB1, NEDD8, FAT10, SUMO-1/-2/-3,

Apg-8/-12, Urm1, UBL5 und Ufm1 (Jentsch und Pyrowolakis 2000, Schwartz und Hochstrasser 2003, Herrmann *et al.* 2007, Bedford *et al.* 2011).

Die zweite Klasse der Ubiquitin verwandten Proteine wird als *Ubiquitin-domain proteins* (UDPs) bezeichnet und stellt eine sehr heterogene Gruppe dar. UDPs weisen lediglich eine strukturelle Ähnlichkeit zu Ubiquitin auf. Kennzeichnend ist ein Ubiquitin-ähnliches Faltungsmotiv, welches in verschiedenen Proteinen eingebettet vorliegt.

Generell weisen UDPs andere Funktionen im Vergleich zu Ubiquitin auf und werden nicht an Proteine konjugiert. Stattdessen nehmen UDPs eine Adapterfunktion ein und binden Ubiquitin oder UBLs und ihre Partner durch ein *ubiquitin interaction motif* direkt und nicht kovalent. Bekannte UDP-Proteine sind beispielsweise Parkin, ElonginB, Rad23, Dsk2 und Ddi1 (Jentsch und Pyrowolakis 2000, Herrmann *et al.* 2007). Eine Beteiligung von UDPs an Prozessen wie der Deubiquitinierung, proteasomalen Degradation und der Vermittlung bei der Erkennung von DNA-Schäden konnte gezeigt werden. Jedoch sind für den Großteil vieler UDPs bisher keine Funktionen beschrieben worden (Wyndham *et al.* 1999, Dantuma *et al.* 2009).

Die Bedeutung der UBL-Kaskaden für den Organismus konnte in den letzten Jahren häufiger gezeigt werden. So werden diverse menschliche Erkrankungen mit einer Fehlregulation der Substratmodifikation durch die UBL-Konjugationsmaschinerie in Zusammenhang gebracht (Bayer *et al.* 1998, Osaka *et al.* 1998, Ha *et al.* 2011, Watson *et al.* 2011).

Das zuletzt identifizierte UBL, Ufm1, ist Zentrum dieser Arbeit und wird im Folgenden detailliert beschrieben.

1.6 Ufm1-Kaskade

1.6.1 *Ubiquitin-fold modifier 1* (Ufm1)

Die Ufm1-Kaskade wurde 2004 identifiziert und liegt hochkonserviert in Metazoa und Pflanzen, jedoch nicht in der Hefe vor. In Gehirn, Herz, Leber, Lunge und Niere von Mäusen konnte eine starke Expression ermittelt werden. Eine biologische Funktion konnte der Ufm1-Kaskade bisher nicht eindeutig zugeordnet werden (Komatsu *et al.* 2004, Tatsumi *et al.* 2010). Trotz geringer Sequenzähnlichkeit (16 %) weist Ufm1 eine sehr ähnliche Tertiärstruktur zu Ubiquitin auf. Analog zu Ubiquitin wird Ufm1 durch katalytisch-wirkende Enzyme posttranslational auf ein Zielprotein übertragen (Abb. 6). Dieser Prozess wird als *ufmylation* bezeichnet.

Die für eine Klassifizierung als UBL typische β -*grasp* Faltung konnte in Ufm1 identifiziert werden (Abb. 4). Bei Ufm1 handelt es sich um ein Typ 1 UBL mit einem Molekulargewicht

von 9,1 kDa, welches hauptsächlich im Cytosol exprimiert wird. Im Gegensatz zu Ubiquitin oder NEDD8 weist Ufm1 eine ungeladene Proteinoberfläche auf, was wiederum auf unterschiedliche Interaktionspartner hindeutet (Cort *et al.* 2002, Komatsu *et al.* 2004, Sasakawa *et al.* 2006). Eine mögliche Polymerisation mehrerer Ufm1-Moleküle unter Bildung einer Ufm1-Kette konnte bisher nicht ermittelt werden (Komatsu *et al.* 2004, Tatsumi *et al.* 2010).

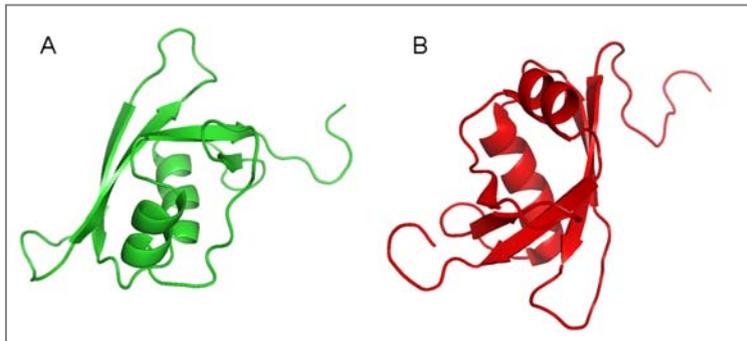


Abb. 4: Tertiärstruktur von Ufm1 aus (A) *Homo sapiens* und (B) *C. elegans*.

α -Helices sind als Spirale und β -Faltblätter als Pfeile dargestellt. Erstellt mit PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net/>).

1.6.2 *Ufm1-specific proteases 1/2 (UfSP1 & UfSP2)*

Die Ufm1-Bildung erfolgt wie bei vielen anderen UBLs als Vorstufe und wird posttranslational durch die Ufm1-spezifischen Cystein-Proteasen UfSP1 und UfSP2 prozessiert. Dieser Reifungsprozess ist essentiell für die anschließende Aktivierung von Ufm1 durch das E1-Enzym (Kang *et al.* 2007, Mizushima *et al.* 2007, Ha *et al.* 2008). Die Aminosäuren des C-Terminus werden bei der Prozessierung abgespalten und das für die spätere Isopeptidbindung essentielle Glycin wird exponiert. Während im Menschen und in der Maus ein Dipeptid (Serin-Cystein) abgespalten werden muss, liegt in *C. elegans* nur ein Histidin vor. Ubiquitin und andere UBLs kennzeichnen sich häufig durch ein C-terminales Di-Glycinmotiv aus, wohingegen Ufm1 ein einzelnes Glycin nach der Prozessierung exponiert (Komatsu *et al.* 2004, Kang *et al.* 2007, Ha *et al.* 2008, Liu *et al.* 2009).

Die katalytische Aktivität der Cystein-Proteasen wird durch eine Aminosäuretriade, bestehend aus Cystein, Histidin und Asparaginsäure, definiert und konnte in beiden UfSPs ermittelt werden (Kang *et al.* 2007). UfSP1 kommt bei allen Metazoa bis auf Nematoden und Pflanzen vor, wohingegen UfSP2 auch in *C. elegans* und *Arabidopsis* zu finden ist. Wie erst kürzlich entdeckt wurde, dient die erweiterte N-terminale Region von UfSP2 der Interaktion mit dem in der ER-Membran gebundenen Protein Ufbp1 (*Ufm1-binding protein 1*). Dies ist das bisher einzige bekannte Zielprotein der Ufm1-Kaskade. Auf Grund dieser Interaktion erfolgt die

Rekrutierung der Protease zur ER-Membran (Kang *et al.* 2007, Ha *et al.* 2008, Ha *et al.* 2011). Neben der Prozessierung der Ufm1-Vorstufe, welche vermutlich einen zellulären Kontrollmechanismus der Modifikation darstellt, wurde des Weiteren die Ufm1-Dekonzugation des Zielproteins Ufbp1 durch die beiden Proteasen ermittelt. Es zeigte sich, dass ebenso wie bei der Prozessierung, die katalytische Aktivität zur Dekonzugation von UfSP1 weit über der von UfSP2 liegt. Eine ähnliche Funktion von Proteasen, die neben der Prozessierung auch die Dekonzugation katalysieren, konnte in den Signalwegen um NEDD8 und SUMO beobachtet werden. Folglich handelt es sich bei der Ufm1-Konzugation um einen reversiblen Prozess (Kang *et al.* 2007, Ye und Rape 2009, Tatsumi *et al.* 2010).

1.6.3 Ubiquitin-activating enzyme 5 (Uba5)

Uba5 ist das einzig bekannte E1-Enzym der Ufm1-Kaskade und gehört zu der Gruppe der Ubiquitin-aktivierenden Proteine (UBAs), welche die Thioesterausbildung bzw. die Aktivierung des UBLs katalysieren und somit den Beginn der Kaskade einleiten. So erfolgt nach der Ufm1-Prozessierung des C-Terminus die Ausbildung einer energiereichen Thioesterbindung unter ATP-Verbrauch durch Uba5 (Cys²⁵⁰) am exponierten Glycin von Ufm1 (Komatsu *et al.* 2004).

Typische Bestandteile von UBAs sind zwei katalytische Halbdomänen, FCCH (*first catalytic cysteine domain*) und SCCH (*second catalytic cysteine domain*), welche die Bindung des E2-Enzyms und den anschließenden Thioester-Transfer des UBL vermitteln (Lake *et al.* 2001, Szczepanowski *et al.* 2005, Bacik *et al.* 2010). Allerdings ergaben Sequenzanalysen, dass weder eine SCCH- noch eine FCCH-Domäne in Uba5 vorliegt. Es konnte jedoch eine C-terminale Domäne (CTD) identifiziert werden, die sowohl für die E2-Bindung (Ufc1) als auch für den Thioester-Transfer von Ufm1 entscheidend ist. Da Uba5 über keine FCCH-Domäne verfügt, die auch für die Substratspezifität bzw. Substratstabilität verantwortlich ist, wird diese Aufgabe vermutlich von einem hochkonservierten Prolin an Position 293 erfüllt (Bacik *et al.* 2010).

Uba5 ist mit nur 404 As deutlich kleiner als typische UBAs (etwa 1000 As) besitzt aber dennoch eine Adenylierungsdomäne, ein Metall-Bindemotiv als auch ein aktives Zentrum bildendes Cystein (Komatsu *et al.* 2004, Dou *et al.* 2005). Die geringe Größe ist auf einen kompakteren und anders strukturierten Aufbau zurückzuführen. So befindet sich bei bekannten E1-Enzymen das aktive Zentrum in einer Domäne, die relativ flexibel zur Adenylierungsdomäne liegt. Bei Uba5 hingegen ist das Cys²⁵⁰ des aktiven Zentrums neben einem Metall-Bindemotiv positioniert und ist Teil einer α -Helix innerhalb der

Adenylierungsdomäne. Durch diese Positionierung in der langen α -Helix ragt das aktive Zentrum weit über den Rest des Moleküls heraus, so dass eine simultane Bindung zur Aktivierung von zwei Ufm1-Molekülen an *A*- und *T-site* ermöglicht wird. Die ATP-Bindung verursacht dabei eine Konformationsänderung, welche die Grundlage zur katalytischen Reaktion darstellt (Bacik *et al.* 2010).

Inwieweit eine für viele E1-Enzyme typische Dimerisierung im Fall von Uba5 vorliegt, lässt sich nicht zweifelsfrei sagen. So konnte gezeigt werden, dass ein Uba5-Monomer *in vitro* seine Funktion als Ufm1 aktivierendes Enzym erfüllt (Komatsu *et al.* 2004), zum anderen lassen aktuelle Kristallisationsuntersuchungen die Bildung eines Uba5 Homodimer unter ATP-Bindung erkennen (Schulman und Harper 2009, Bacik *et al.* 2010).

Neben der Aktivierung von Ufm1 durch Uba5 konnte ebenfalls eine Uba5-abhängige Aktivierung von SUMO2 ermittelt werden, obwohl diese beiden UBLs keine signifikanten Strukturähnlichkeiten aufweisen. Hierbei wird Ufm1 im Cytoplasma aktiviert, während die Aktivierung von SUMO2 im Nukleus erfolgt (Zheng *et al.* 2008). Generell wurde lange angenommen, dass jedes UBL spezifische Enzyme benötigt und dass eine Überlappung verschiedener Kaskaden zur UBL-Konjugation nicht vorliegt. Allerdings sind mittlerweile für Ubiquitin und ISG15 diverse Enzyme identifiziert worden, die in beiden Kaskaden wirken können. Apg7 stellte jedoch das bisher einzige Beispiel für ein E1-Enzym dar, welches zwei Arten von UBLs, Apg8 und Apg12, aktivieren kann (Komatsu *et al.* 2004, Herrmann *et al.* 2007).

Die Möglichkeit der Aktivierung zweier verschiedener UBLs durch Uba5 ist im Hinblick auf den erst kürzlich beschriebenen funktionellen Effekt der *uba5*-Deletion während der Embryonalentwicklung in Mäusen besonders interessant. So konnte eine Beteiligung von Uba5 an der Regulation der Hämatopoese zur Erythrozyten-Differenzierung festgestellt werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde jedoch keine Aktivierung von SUMO2 durch Uba5 ermittelt (Zheng *et al.* 2008, Tatsumi *et al.* 2010, Tatsumi *et al.* 2011). Da SUMO2 in Nematoden nicht vorkommt (Ye und Rape 2009), lassen die Uba5-Untersuchungen in *C. elegans* direkte Rückschlüsse auf die Ufm1-Kaskade zu.

1.6.4 Ufm1-conjugating enzyme 1 (Ufc1)

Die Übertragung des aktivierten Ufm1 von Uba5 erfolgt durch das spezifische E2-Enzym Ufc1 unter erneuter Ausbildung einer Thioesterbindung. Hierbei interagiert die C-terminale Domäne (CTD) von Uba5 mit der α 2-Helix von Ufc1 und überträgt das aktivierte Ufm1 auf Cys¹¹⁶ im aktiven Zentrum (Komatsu *et al.* 2004, Mizushima *et al.* 2007, Bacik *et al.* 2010).

Trotz geringer Sequenzhomologien zu anderen E2-ähnlichen Enzymen konnte eine ca. 10 Å große Domäne, welche in allen E2-Enzymen das katalytische Zentrum bildet, ermittelt werden. Bedingt durch die Ähnlichkeit dieser Struktur wird angenommen, dass die Übertragung bzw. Interaktion zwischen Uba5 und Ufc1 nach bekannten Mechanismen abläuft (Liu *et al.* 2005, Mizushima *et al.* 2007, Liu *et al.* 2009). E2-Strukturanalysen haben auch ermittelt, dass häufig die α 1-Helix, die *loop*-Region zwischen β 1- und β 2-Faltblatt sowie das distale Ende der *loop*-Region des aktiven Zentrums die Bindung zwischen E2- und E3-Enzym vermittelt (Madura *et al.* 1993, Xie und Varshavsky 1999). Inwieweit ein ähnlicher Mechanismus der Bindung von Ufc1 an das E3-Enzym zu Grunde liegt, ist bislang nicht bekannt.

1.7 UPR (*unfolded protein response*)

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist verantwortlich für Synthese und Faltung von sekretorischen- sowie Membran-Proteinen. Korrekt gefaltete Proteine verlassen das ER und werden durch den Golgi Apparat zu ihren entsprechenden Bestimmungsorten transportiert (Rasheva und Domingos 2009). Allgemein ist die Protein-Konzentration im ER-Lumen mit ungefähr 100 mg/ml äußerst hoch (Stevens und Argon 1999). Allerdings liegt eine weit höhere Protein-Syntheserate in speziellen sekretorischen Zellen vor. So wird geschätzt, dass Hepatozyten 13 bzw. exokrine Zellen des Pankreas ungefähr 2,6 Millionen sekretorische Proteine pro Minute synthetisieren (Shen *et al.* 2005). Treten bei dieser enorm hohen Syntheseleistung des ER vermehrt fehlgefaltete Proteine auf, verbleiben diese im ER und bewirken durch ihre Anhäufung den so genannten ER-Stress. Dieser Zustand kann sowohl durch natürliche Veränderungen des physiologischen Status der Zelle, beispielsweise während der Entwicklung, auftreten oder aber durch externe Stressoren, die zur Beschädigung von Proteinen führen, induziert werden (Darom *et al.* 2010).

Zur Bewältigung dieser Akkumulierung von ungefalteten Proteinen im ER erfolgen verschiedene Anpassungen, die kollektiv als *Unfolded Protein Response* (UPR) bezeichnet werden. So wird die allgemeine Translation gestoppt, die Expression von ER-Chaperonen und *folding* Enzymen wird induziert, das ER proliferiert, und die ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation*) wird aktiviert, um fehlgefaltete Proteine abzubauen.

Mehrere ERAD-Signalwege sind bekannt, wobei die einzelnen Komponenten der ERAD während dem UPR hochreguliert werden (Wu und Kaufman 2006, Rasheva und Domingos 2009). Die Komponenten des ERAD dienen der Retranslokation fehlgefalteter Proteine vom ER-Lumen ins Cytosol und der Ubiquitinierung dieser Proteine bereits während des

Transportprozesses (Nakatsukasa und Brodsky 2008). Die Erkennung fehlgefalteter Proteine erfolgt hierbei spezifisch durch E3-Ubiquitin Ligasen. Das polyubiquitinierte Protein wird anschließend beispielsweise durch den CD48/p97 ATPase Komplex gebunden und für seinen Abbau zum Proteasom transportiert. Sollten alle Bemühungen den ER-Stress zu bewältigen fehlschlagen, wird die ER-Stress-abhängige Apoptose eingeleitet (Wu und Kaufman 2006, Rasheva und Domingos 2009, Darom *et al.* 2010).

Zur Koordinierung der ER-Stressantwort werden drei membrangebundene Signaltransduktoren genutzt (Abb. 5). Ire-1 (*Inositol-requiring enzyme-1*) ist eine ER-Membran gebundene Typ I Endoribonuklease, welche unter ER-Stress dimerisiert. Daraufhin wird der Transkriptionsfaktor Xbp-1 *gespliced* und führt nach Kerntranslokation zur Transkription von Chaperonen und *folding* Enzymen (Rasheva und Domingos 2009). Pek-1 (*PKR-like ER protein kinase/pancreatic eIF2 α (eucaryotic translation initiation factor 2, α subunit) kinase-1*) ist eine Typ I ER-Membran-gebundene Proteinkinase und bedingt den Translationsstopp durch die Phosphorylierung der eIF2 α -Untereinheit. Weiterführend kommt es durch den Pek-1 Signalweg zur Synthese und Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors ATF4, welcher nachfolgend die Expression von CHOP (*C/EBP homologous protein*), GADD34 (*growth arrest and DNA-damage inducible protein-34*), ATF3 und von Genen, die die Glutathion-Biosynthese und die Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöhen, initiiert (Harding *et al.* 2000, Ma *et al.* 2002, Harding *et al.* 2003, Jiang *et al.* 2004). Ein weiterer Signaltransduktor des ER ist der Typ II ER-Membran gebundene Transkriptionsfaktor ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*). Unter ER-Stressbedingungen wird ATF6 vom ER zum cis-Golgi Netzwerk mittels COP II Vesikeln transportiert. Hier erfolgt die Abspaltung des N-Terminus von ATF6 durch zwei Proteasen (*Site-1* und *Site-2*). Der nun frei gewordene cytosolische N-Terminus transloziert in den Zellkern, um dort als Transkriptionsfaktor zu wirken und u. a. die Expression von ER-Chaperonen zu induzieren (Nadanaka *et al.* 2004, Rasheva und Domingos 2009).

In *C. elegans* sind alle drei Signaltransduktoren vorhanden, jedoch liegt der Schwerpunkt bei der ER-Stressantwort bei Ire-1 und Pek-1, während ATF6 nur eine untergeordnete Rolle und keine offensichtliche Funktion bei der ER-Stressantwort einnimmt (Mori 2009).

Die Regulation der drei Signaltransduktoren im ER-Lumen konnte anhand von BiP/GRP78 Studien beschrieben werden. BiP stellt eines der am stärksten exprimierten Chaperone im ER dar und bindet hydrophobe Regionen ungefalteter oder nicht komplett gefalteter Proteine. Die notwendige Konformationsänderung dieser Proteine wird durch die ATP Hydrolyse Aktivität dieser Chaperone katalysiert (Munro und Pelham 1986, Hendershot *et al.* 1996). Unter

normalen physiologischen Bedingungen liegen alle drei Signaltransduktoren in ihrem inaktiven Zustand mit BiP assoziiert vor. Auf Grund einer höheren Affinität von BiP zu ungefalteten oder falsch gefalteten Proteine führt eine Akkumulierung dieser Proteine im ER-Lumen bei einer Störung der ER Homöostase zur BiP-Dissoziation. Erst diese Dissoziation ermöglicht die Aktivierung der UPR Signaltransduktoren. Beispielsweise inhibiert eine BiP-Überexpression alle drei Signaltransduktoren und stellt die Funktion von BiP als negativer Regulator in der UPR erneut heraus (Dorner *et al.* 1992, Bertolotti *et al.* 2000). So erfolgt der Transport von ATF6 zum Golgi erst nach BiP-Dissoziation, welches zuvor die Golgi Lokalisationssignale von ATF6 maskierte (Shen *et al.* 2002). Des Weiteren verhindert die BiP-Bindung von Pek-1 dessen Dimerisierung und dadurch dessen Autophosphorylierung bzw. Aktivierung (Wu und Kaufman 2006).

Lange wurde angenommen, dass BiP auch für Ire-1 als negativer Regulator wirkt und die Dimerisierung und somit die Aktivierung inhibiert (Bertolotti *et al.* 2000, Okamura *et al.* 2000). Aktuelle Studien hingegen konnten eine unabhängige Ire-1 Aktivierung unter ER-Stress zeigen. Ire-1 und ATF6 sind selbst aktiv an der Dissoziation von BiP beteiligt und regulieren somit die eigene Aktivierung (Kimata *et al.* 2004, Shen *et al.* 2005, Oikawa *et al.* 2007). In einem alternativen Modell erkennt Ire-1 fehlgefaltete Proteine direkt durch eine Furche, die sich bei der Oligomerisierung der luminalen Domäne von Ire-1 bildet (Credle *et al.* 2005).

Der ABU-Signalweg (*Activated by Blocked UPR*) wird bei einer gestörten UPR aktiviert und wirkt schützend gegen ER-Stress. Es wird vermutet, dass eine Funktion der neun *abu* Gene entweder parallel zur UPR oder zum ERAD eingenommen wird (Urano *et al.* 2002). Die Aktivierung des ABU-Wegs kann durch *ced-1* (*cell death abnormality*) vermittelt werden, wobei die Regulation der UPR durch *ced-1* auch eine Beteiligung im *C. elegans* Immunsystem aufweist (Haskins *et al.* 2008).

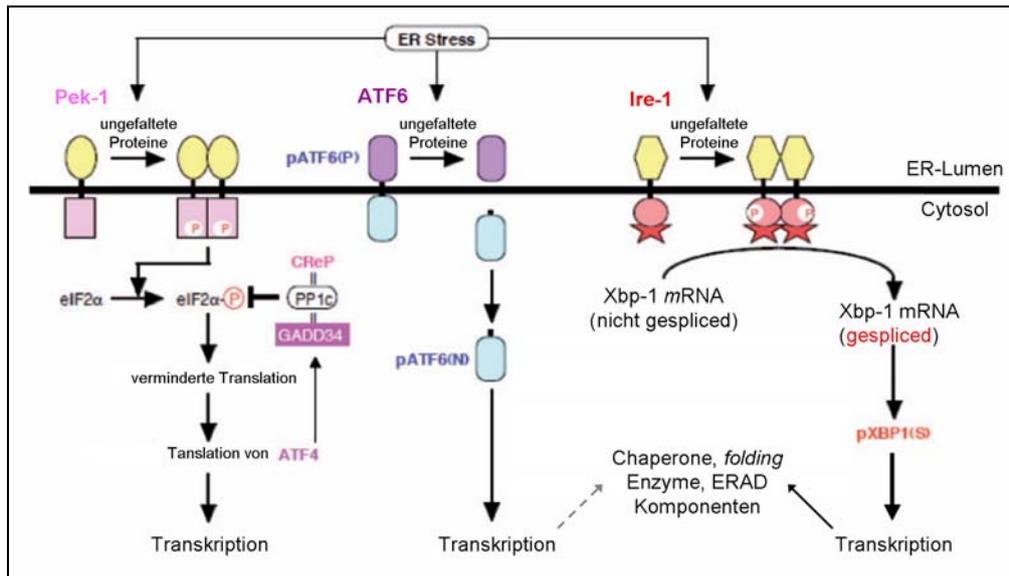


Abb. 5: Aktivierung der drei Signaltransduktoren der UPR (*unfolded protein response*) unter ER-Stress.

Falsch oder fehlgefaltete Proteine werden im ER-Lumen durch die drei Signaltransduktoren Pek-1, ATF6 und Ire-1 detektiert und entsprechende Signale werden an den Nukleus weitergeleitet. Die cytosolische Domäne von Pek-1 dimerisiert unter Stressbedingungen und rekrutiert sowie phosphoryliert eIF2 α . Damit wird eIF2 α inaktiviert und die Translation gestoppt.

Neben der Reduktion der Proteinlast im ER, bedingt die Phosphorylierung von eIF2 α die Expression des Transkriptionsfaktors ATF4. Die Transkription einer Vielzahl von Genen wird nach der ATF4-Translokation in den Zellkern induziert, wobei unter anderem die Expression von GADD34 die Phosphorylierung von eIF2 α aufhebt und dadurch als negativer *feedback loop* wirkt. ATF6 ist ein Typ II ER-membrangebundener Transkriptionsfaktor und wird unter ER-Stress durch zwei Proteasen prozessiert. Der anschließend freie N-Terminus transloziert in den Zellkern, um dort seine Funktion als Transkriptionsfaktor einzunehmen.

Ire-1 ist eine ER-Membran gebundene Typ I Endoribonuklease und dimerisiert unter ER-Stress durch Autophosphorylierung. Dadurch wird die Endoribonuklease Domäne von Ire-1 aktiviert, welche den Transkriptionsfaktor Xbp-1 *spliced*. Das nun aktivierte Xbp-1 transloziert daraufhin in den Nukleus. Sowohl der N-Terminus von ATF6 als auch der durch Ire-1 aktivierte Transkriptionsfaktor Xbp-1 führen zur Transkription von Chaperonen, *folding* Enzymen und ERAD Komponenten (verändert nach Mori 2009).

1.8 Ufm1-Kaskade (Fortsetzung)

1.8.1 *Ufm1-ligating enzyme 1* (Ufl1, KIAA0776, MAXER, RCAD, NLBP)

Die erst kürzlich identifizierte E3-Ligase der Ufm1-Kaskade Ufl1 weist die grundlegenden Charakteristika von E3-ähnlichen Enzymen auf. So bindet der N-Terminus von Ufl1 sowohl Ufc1 als auch an das kürzlich identifizierte erste Zielprotein C20orf116 (Ufbp1; *Ufm1-binding protein 1*) der Ufm1-Kaskade. Des Weiteren stimuliert Ufl1 den Transfer des UBLs auf das Zielprotein durch Bildung einer ϵ -Amidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin von Ufm1 und dem Lys²⁶⁷ von Ufbp1 (Tatsumi *et al.* 2010).

Bisherige Untersuchungen lassen keine Zuordnung von Ufl1 in eine bekannte Klasse innerhalb der E3-Ligasen zu (Rotin und Kumar 2009, Tatsumi *et al.* 2010). Es konnte weder eine HECT-typische katalytische C-terminale Domäne noch eine RING *finger* Domäne

identifiziert werden. Des Weiteren konnte Ufl1 kürzlich als Komponente eines ER-Membran gebundenen Komplexes ermittelt werden. Hierbei wird Ufl1 durch die C-terminale Transmembrandomäne in der ER-Membran verankert und beeinflusst die Stabilität von CDK5Rap3, einem Zell-Zyklus Regulator (siehe 1.9.2). Zusätzlich wurden zwei Phosphorylierungsstellen identifiziert, die eine Möglichkeit zur Regulation der E3-Ligase darstellen (Shiwaku *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010).

1.8.2 Ufm1-binding protein 1 (Ufbp1, C20orf116, DDRGK, Dashurin)

Ufbp1 stellt das erste identifizierte Zielprotein der Ufm1-Kaskade dar und liegt hochkonserviert in multizellulären Organismen vor (Tatsumi *et al.* 2010). Ähnlich wie alle Komponenten der Ufm1-Kaskade wird Ufbp1 ubiquitär exprimiert. Eine besonders hohe Expression des Ufm1-Zielproteins wurde in Leber, Lunge, Niere und Hoden von Mäusen festgestellt (Komatsu *et al.* 2004, Tatsumi *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Ufbp1-Interaktionsstudien ermittelten Bindungen zu Ufm1, Ufc1, Ufl1 und aktuell zum N-Terminus der Ufm1-spezifischen Protease UfSP2 (Tatsumi *et al.* 2010, Ha *et al.* 2011). Eine Funktion von Ufbp1 wurde bislang noch nicht beschrieben. Vergleichende Strukturanalysen ermittelten neben einem hydrophoben N-Terminus, der als Signalanker fungiert, eine C-terminale PCI (*proteasome-COP9-initiation factor*)-Domäne (Neziri *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Innerhalb dieser PCI-Domäne erfolgt die Ufm1-Konjugation an Ufbp1 (Lys²⁶⁷) (Tatsumi *et al.* 2010). Proteine mit einer PCI-Domäne sind häufig an der Bildung von großen Proteinkomplexen wie dem Proteasom, dem COP9-Signalosom oder dem eIF3-Translationsinitiationskomplex beteiligt (Mayeur *et al.* 2003, Wei und Deng 2003, Pick *et al.* 2009, Neziri *et al.* 2010). Der bereits erwähnte N-Terminus von Ufbp1 wird nach aktuellen Veröffentlichungen zur Verankerung an der cytosolischen Seite der ER-Membran genutzt. Ufbp1 colokalisiert mit Ufl1 und CDK5Rap3 am ER und stimuliert vermutlich die Komplexbildung dieser Proteine (Kwon *et al.* 2010, Neziri *et al.* 2010, Shiwaku *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Eine erhöhte ER-Proliferation um den Nukleus herum konnte bei einer Ufbp1-Überexpression beobachtet werden. Somit ist eine potentielle regulatorische Funktion von Ufbp1 in der ER-Biogenese anzunehmen (Wu *et al.* 2010).

Vergleichende Sequenzanalysen mit dem *C. elegans* Homolog ZK1236.7 konnten ebenfalls eine PCI-Domäne, einen Signalanker und ein bisher nicht beschriebenes NLS (*nuclear localization signal*)-Motiv identifizieren (Abb. 58 siehe Anhang). Inwieweit die in *C. elegans* ermittelte NLS-Sequenz hierbei Einfluss auf die Lokalisation nimmt, lässt sich momentan

nicht sagen. Allerdings konnten Ufbp1-Lokalisationsstudien einen Wechsel zwischen Cytosol und Nukleus in menschlichen Zellen aufzeigen (Neziri *et al.* 2010).

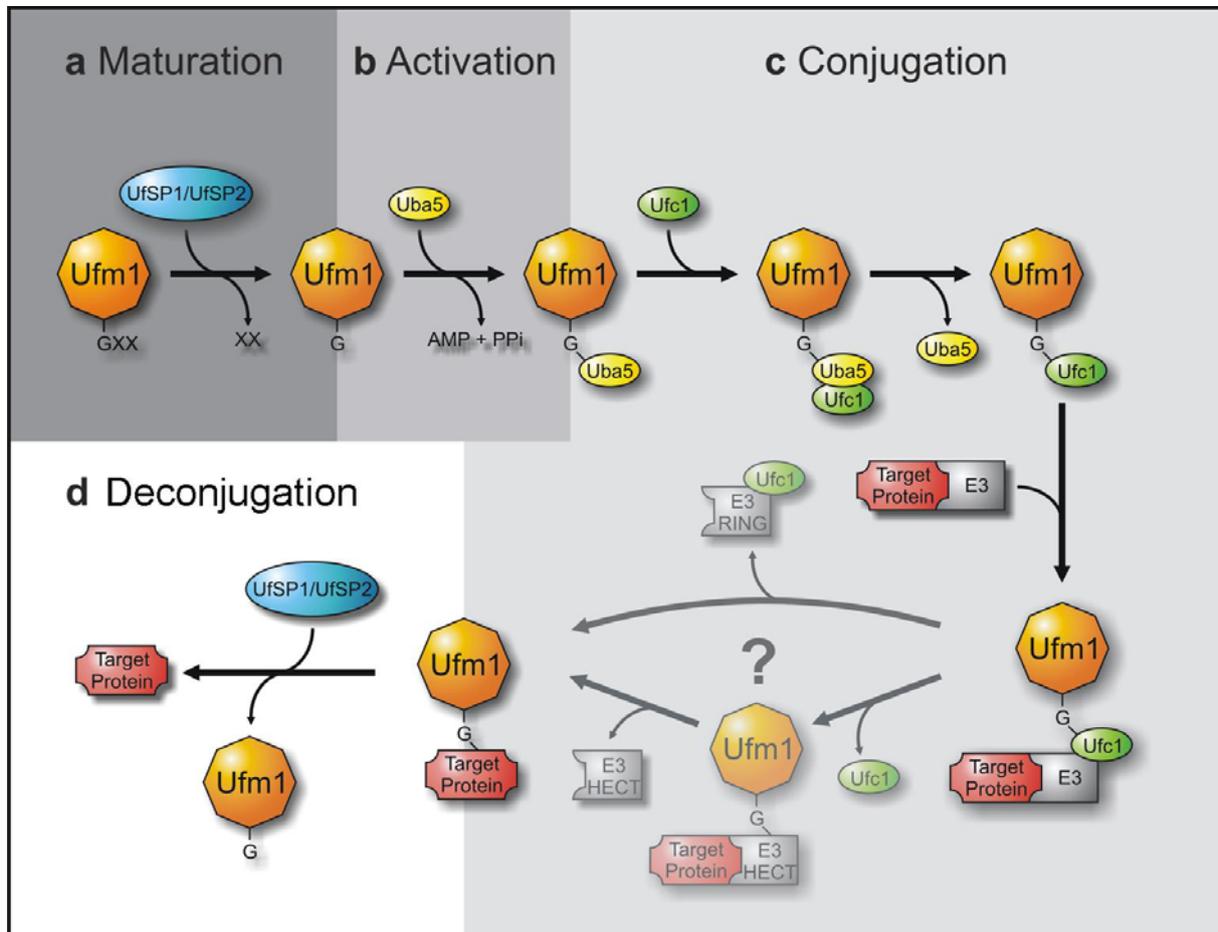


Abb. 6: Schematischer Verlauf der Ufm1-Konjugation.

Maturation (Reifung): Die Reifung von Ufm1 erfolgt aus einer Vorstufe. Sie wird durch die beiden Cystein-Proteasen UfSP1 und UfSP2 prozessiert, um einen Glycin-Rest am C-Terminus zu exponieren. Hierbei werden zwei variable As (XX) von der Ufm1-Vorstufe abgespalten. **Activation**: Ufm1 wird ATP-abhängig durch Uba5 aktiviert. Es erfolgt die Ausbildung einer Thioesterbindung zwischen dem C-terminalem Glycin von Ufm1 und dem Cystein von Uba5. **Conjugation**: Unter Ausbildung einer erneuten Thioesterbindung wird Ufm1 von Uba5 auf Ufc1 übertragen. Mit Hilfe der E3-Ligase Ufl1, erfolgt die Ausbildung einer Isopetidbindung zwischen Ufm1 und dem Zielprotein. **Deconjugation**: Die Ufm1-Konjugation ist ein reversibler Prozess und kann durch die Proteasen UfSP1 und UfSP2 aufgehoben werden. Sowohl Ufm1 als auch das Zielprotein sind anschließend wieder verfügbar für erneute posttranslationale Modifikationen (verändert nach Tatsumi *et al.* 2010).

Eine Assoziation der Ufm1-Kaskade zum ER konnte mehrfach identifiziert werden. So liegt eine Verankerung in der ER-Membran von sowohl Ufl1 als auch dem Zielprotein der Ufm1-Kaskade Ufbp1 vor (Kwon *et al.* 2010, Neziri *et al.* 2010, Shiwaku *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Zusätzlich erfolgt die Rekrutierung der Ufm1-spezifischen Protease UfSP2 zum ER anhand der Bindung an Ufbp1 (Ha *et al.* 2011). Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression von Uba5 unter ER-Stress beobachtet werden (Harding *et al.* 2003).

ER-Stress ist mit neurodegenerativen Krankheiten und auch mit Diabetes mellitus verknüpft. So kommt es während der Entwicklung einer Typ-2 Diabetes zu einer starken Expression von Komponenten des UPR aber auch zu einer stark erhöhten Expression von Ufm1 (Lu *et al.* 2008). Auch während der Entwicklung der ischämischen Herzerkrankung kommt es zu einer verstärkten Transkription von Genen, die in der UPR fungieren, neben diesen wurde auch eine erhöhte Expression von Ufm1 ermittelt (Azfer *et al.* 2006).

Außerdem konnte während der ER-assoziierten Degradation (ERAD) kürzlich eine direkte Verbindung zur UPR-Regulation durch ein UBL gezeigt werden. So wird die Aktivität des UPR-Transkriptionsfaktors Xbp-1 durch SUMO negativ reguliert (Chen und Qi 2010).

1.9 Potentielle Interaktionspartner der Ufm1-Kaskade

1.9.1 *Kelch-like Protein-8 (Kel-8)*

Kel-8 ist ein neuronales Protein, welches zur BTB (*Broad-complex, Tamtrack and Bric-a-Brac*)-Kelch Familie von *C. elegans* gehört (Prag und Adams 2003, Schaefer und Rongo 2006). In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screening von *C. elegans* wurde eine Interaktion von Kel-8 zu Ufc1 ermittelt (Li *et al.* 2004).

Im Rahmen der Ubiquitinierung wirkt Kel-8 als regulierendes Verbindungsprotein zwischen Cul3-E3-Ubiquitin Ligasen und Substraten. Dabei bindet Kel-8 über die C-terminale BTB-Domäne an die E3-Ligase und führt so beispielsweise zum Abbau der GLR-1 (*Glutamate Receptor-1*) Untereinheit des Glutamaterezeptors AMPAR (*AMPA-type glutamate receptor*) und RPY-1 (*Rapsyn homolog*) in Postsynapsen von *C. elegans* (Schaefer und Rongo 2006, Nam *et al.* 2009). In ihrer Tertiärstruktur bilden BTB-Domänen ein großes Areal für Interaktionen und treten meist mit einem weiteren Motiv, wie z.B. *kelch repeats*, am N-Terminus auf. Zwischen der BTB-Domäne und den *kelch repeats* liegt die BACK-Domäne, welche vermutlich eine Funktion bei der Orientierung des Substrats im Cul3-E3-Ligase Komplex einnimmt. Kel-8 besitzt sechs *kelch repeats*, die einen β -Propeller formen, der ebenfalls Protein-Protein Interaktionen ermöglicht (Adams *et al.* 2000, Prag und Adams 2003, Stogios und Prive 2004).

BTB-Domänen enthaltende Proteine treten in allen eukaryotischen Organismen auf und übernehmen vielfältige Funktionen die von der Aktin-Dynamik bis hin zur Zell-Zykluskontrolle reichen (Perez-Torrado *et al.* 2006). So sind regulatorische Funktionen von BTB-Kelch Proteinen in *C. elegans* bekannt, die beispielsweise die larvale Entwicklung (Kel-1) oder die zelluläre Organisation der Spermatozyten (*spe-26*) umfassen (Varkey *et al.* 1995,

Ohmachi *et al.* 1999). Auch konnte ein schützender Einfluss von Kel-8 gegenüber der toxikologischen Wirkung von Cadmium gezeigt werden (Cui *et al.* 2007).

1.9.2 Cyclin Dependent Kinase 5 Regulatory subunit-associated protein 3 (CDK5Rap3, C53, LZAP)

CDK5Rap3 ist ubiquitär in multizellulären Organismen vertreten (*C. elegans* Y113G7B.16) (Kwon *et al.* 2010). Massenspektrometrische Untersuchungen durch Ewing *et al.* (2007) postulierten eine Interaktion von CDK5Rap3 mit den Ufm1-Kaskaden Komponenten Ufm1, Ufc1, Ufl1 und Ufbp1. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage näherer Untersuchungen in *C. elegans* (Kwon *et al.* 2010, Shiwaku *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010).

CDK5Rap3 nimmt wichtige Funktionen in vielen Zellsignalwegen ein. So konnte die reduzierte CDK5Rap3-Expression in verschiedenen Tumorgeweben beobachtet werden, wobei CDK5Rap3 eine Aktivität als Tumorsuppressor zugeschrieben wird. Die Aktivierung des Tumor-Suppressors p53 durch CDK5Rap3 führt zur Induktion der Apoptose nach dem Einwirken genotoxischer Agenzien und inhibiert somit das Wachstum von Tumorzellen. Weiterführend konnte nach einem *cdk5rap3 knock-down* eine NF- κ B abhängige MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*) Expression ermittelt werden, die eine erhöhte Schädigung von Zellen bedingt. CDK5Rap3 wirkt somit als Tumorsuppressor inhibierend auf den NF- κ B Signalweg ein (Jiang *et al.* 2009, Kwon *et al.* 2010).

Bei der Regulation der Homöostase vaskulärer Endothelzellen vermittelt CDK5Rap3 die Zell-Proliferation (Zhuo *et al.* 2009). Einer CDK5Rap3-Überexpression führt zu einer Erhöhung des durch DNA-Schäden hervorgerufenen Zelltods, wobei CDK5Rap3 antagonistisch auf die *Checkpoint kinase 1* (Chk1) wirkt und so zu einer Aktivitätsmodulierung der Cyclin abhängigen Kinase 1 (Cdk1) führt. Folglich kann CDK5Rap3 durch die Modulation des G2/M *checkpoint* regulierend den Zell-Zyklus beeinflussen (Jiang *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2009).

Des Weiteren bindet CDK5Rap3 auch die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5), welche nicht wie andere CDKs an der Zellteilung beteiligt ist, sondern in der neuronalen Differenzierung und der cytoskelettären Dynamik von Neuronen mitwirkt (Ching *et al.* 2002). Eine regulatorische Funktion in der neuronalen Differenzierung erfolgt ebenfalls durch die Bindung von CDK5Rap3 an p25NCK5A, der aktivierenden Untereinheit der neuronalen CDC-2 ähnlichen Kinase (Ching *et al.* 2000).

Aktuell konnte eine CDK5Rap3-Komplexbildung mit Ufl1 und Ufbp1 an der ER-Membran identifiziert werden. Hierbei beeinflusst CDK5Rap3 während der Mitose die Regulation am Übergang von G2 zur M-Phase (Kwon *et al.* 2010, Shiwaku *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010).

1.10 Zielsetzung

Der *Ubiquitin-fold modifier 1* (Ufm1) stellt den zuletzt identifizierten Vertreter der Gruppe der UBLs dar. Die physiologische Funktion der Ufm1-Kaskade ist bislang nur unzureichend aufgeklärt (Komatsu *et al.* 2004, Tatsumi *et al.* 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Ufm1-Kaskade des Modellorganismus *C. elegans* hinsichtlich ihrer Funktion und ihres Aufbaus näher charakterisiert werden. Interaktionsanalysen sollen eine postulierte Beteiligung des Zell-Zyklusregulators CDK5Rap3 und dem BTB-Kelch Protein Kel-8 als Bindungspartner der Ufm1-Kaskade bestätigen.

Um das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten der Ufm1-Kaskade aufzuklären, sollen Reporteranalysen das räumliche und zeitliche Auftreten der Proteine der Ufm1-Kaskade verfolgen. Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen in Mäusen (Tatsumi *et al.* 2010) erweist sich der Verlust von Uba5 in der *C. elegans* Deletionsmutante *uba5(ok3364)* als nicht letal.

Die phänotypische Charakterisierung dieser Mutante soll die Morphologie, adulte Lebensdauer, Reproduktionsrate, larvale Entwicklung und Stress-Toleranz umfassen. Des Weiteren sollen Unterschiede auf Transkriptom- bzw. Proteom-Ebene mittels Microarray- bzw. LC-MS-Untersuchungen detektiert werden um so phänotypische Veränderungen der Mutante auf der Ebene der Gen- bzw. Proteinexpression aufklären zu können.

Eine Assoziation der Ufm1-Kaskade zum ER wurde in verschiedenen Veröffentlichungen postuliert (Azfer *et al.* 2006, Shiwaku *et al.* 2010, Tatsumi *et al.* 2010) und soll auch im Rahmen dieser Arbeit in *C. elegans* im Fokus stehen. So soll der Einfluss verschiedener Stressoren anhand von ER-Stress Reporter-Gen-Analysen erfolgen, wobei der Zusammenhang zur Ufm1-Kaskade durch *knock-down* einzelner Ufm1-Kaskade Komponenten bzw. dem Einkreuzen in die Deletionmutante *uba5(ok3364)* hergestellt werden soll. Eine mögliche Einflussnahme der Ufm1-Kaskade auf die drei Signaltransduktoren der UPR (*unfolded protein response*) soll mittels Tunicamycin-Sensitivitäts-*assays* (Darom *et al.* 2010) der Deletionsmutanten *ire-1(v33)*, *pek-1(ok275)*, *atf-6(ok551)* durchgeführt werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	H+P Labortechnik (München)
Binokular	Wild Heerbrugg (Gais, Schweiz)
Blottingkammer	BioRad (München)
Brutschrank (37°C)	Heraeus (München)
Brutschrank (20°C)	Heraeus (München)
Brutschrank (15°C)	Melag (Berlin)
Digitalkamera EOS 350 D	Canon (Japan)
Elektrophoresekammer Agarose-Gele	BioRad (München)
Elektrophoresekammer SDS-PAGE	BioRad (München)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus (Japan)
Gelgießkammer	BioRad (München)
Kamerasystem IX-TVAD	Olympus (Japan)
Kühltruhe (-20°C)	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühltruhe (-80°C)	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) TCS SP2	Leica (Solms)
Magnetrührer	IKA (Staufen)
Milli-Q-Plus-Reinstwasseranlage	Millipore (Eschborn)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Plan-Neofluar-Objektive	Zeiss (Oberkochen)
Schüttelinkubator	HT Infors (Einsbach)
SemiDry Blotgerät	Amersham Biotech (München)
Sonifizierer	Branson (Dietzenbach)
Spektralphotometer	Perkin Elmer (Wiesbaden)
Sterilbank	Heraeus (München)
Stratalinker (LJV)	Stratagene (Amsterdam)
Thermocycler	Eppendorf (Hanau)
UV-Transilluminator	Herolab (Wiesloch)
Waage	Scaltec (Göttingen)
<u>Zentrifugen</u>	
- Biofuge pico	Heraeus (München)

- Biofuge fresco	Heraeus (München)
- Centrifuge 5804R	Eppendorf (Hanau)
- RC 5C Plus	Sorvall (Wien)
- Varifuge 3.OR	Heraeus (München)

2.1.2 Chemikalien und Fertiglösungen

Herstellernachweis:

(1) AppliChem (Darmstadt), (2) BD Biosciences (Heidelberg), (3) Biomol (Hamburg), (4) Fermentas (St. Leon-Rot), (5) Fluka (Neu-Ulm), (6) IBA BioTagnology (Göttingen), (7) Merck (Darmstadt), (8) MP Biomedicals (Illkirch), (9) Qiagen (Hilden), (10) Roth (Karlsruhe), (11) Serva (Heidelberg), (12) Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

3-Aminotriazol (12)	Aceton (1)
Acrylamid (10)	Agar (1, 10)
Agarose (1)	Ammoniumsulfat (1)
Ampicillin-Salz (1)	APS (Ammoniumperoxidsulfat) (1)
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) (1)	Bis-Tris (12)
Bisacrylamid (10)	BSA (Bovine-Serum-Albumin) (1)
Bromphenolblau (1)	Cadmium (12)
Calciumchlorid (1)	Cholesterol (7)
Coomassie-Brilliant-Blue G-250 (1)	Di-Kaliumhydrogenphosphat (1)
Di-Methylformamid (DMF) (11)	Di-Natriumhydrogenphosphat (1)
dNTP- Mix (4)	DTT (Dithiothreitol) (12)
Eisensulfat (1)	Essigsäure (1)
Ethanol (100 %) (1)	Ethidiumbromid (12)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat) (3)	FuDR (Fluorodeoxyuridin) (12)
Gelatine (1)	Glukose (1)
Glutathion (reduziert) (12)	Glutathion-Agarose (12)
Glycerin (1)	Glycin (1)
Hefe-Extrakt (1)	Imidazol (1)
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) (1)	Isopropanol (1)
Juglon (5)	Kaliumchlorid (1)
Kaliumdihydrogenphosphat (1)	Lachssperma (ssDNA) (1)
Levamisol (12)	Lithiumacetat (1)
Magnesiumchlorid (1)	Magnesiumsulfat (1)

Methanol (1)	Natriumchlorid (1)
Natriumdihydrogenphosphat (1)	Natriumhydrogenphosphat (1)
Natriumhydroxid (1)	Natriumhypochlorid (12)
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) (1)	Ni-NTA-Agarose (9)
Paraquat (Methylviologen) (12)	Pepton aus Soja (1)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (1)	Phosphorsäure (1)
PEG (Polyethylenglycol) (12)	Salzsäure (1)
SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) (5)	SD-Medium minus Lysin (8)
SD-Zusatz (CSM Leu-Trp) (8)	SD-Zusatz (CSM-Leu-Trp-His) (8)
Strep-Tactin Sepharose (6)	t-BOOH (t-Butylhydroperoxid) (12)
Tetrazyklin (1)	Tetramethylethylendiamin (TEMED) (1)
Trichloressigsäure (1)	Triton X-100 (1)
Trypton (Pepton aus Casein) (1)	Tunicamycin (1)
Tween-20 (1)	Uracil (1)
X-Gal (1)	<i>Yeast Nitrogen Base</i> (YNB) (2)
Zinksulfat (1)	

2.1.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Segenetic (Borken)
Dream- <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Expand Long Template</i> PCR System	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>FastDigest</i> ® Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot)
M-MLV-Reverse-Transkriptase	AppliChem (Darmstadt)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Segenetic (Borken)
Proteinase K	AppliChem (Darmstadt)
Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon-Rot) & Segenetic (Borken)
RNase	Segenetic (Borken)
T4 DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot) & Segenetic (Borken)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot) & Segenetic (Borken)

2.1.4 Kitsysteme

First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent Technologies (Böblingen)
mi-Gel Extraction Kit	metaBion (Martinsried)
mi-PCR Purification Kit	metaBion (Martinsried)
mi-Plasmid Miniprep Kit	metaBion (Martinsried)
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega (Mannheim)
Quick Amt Labeling Kit, One-Color	Agilent Technologies (Böblingen)
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Amsterdam)

2.1.5 Größenstandards

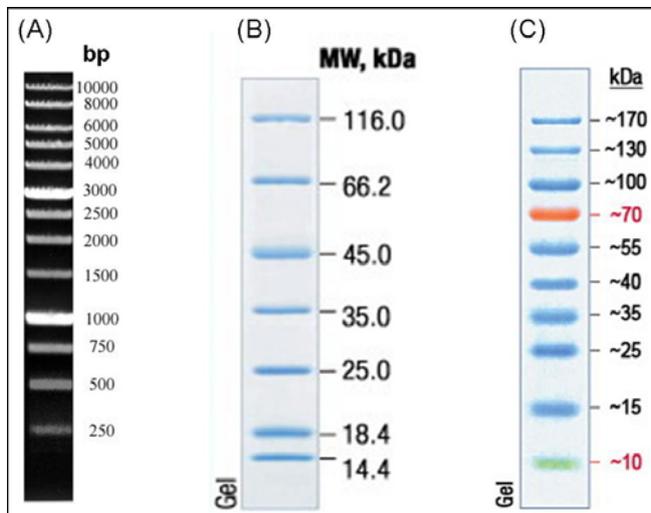


Abb. 7: DNA- und Protein-Größenstandards.

(A) Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde der *1 kb BLUE DNA Marker* verwendet (SM012-BLUE, Segenetic). Als Proteingrößenstandard nach Coomassie-Färbung diente der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (SM0431, Fermentas) (B), während der *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (SM0671, Fermentas) (C) zur Western-Blot Analyse genutzt wurde.

2.1.6 Plasmide & Oligonukleotide

2.1.6.1 Vektoren und Oligonukleotide zur rekombinanten Expression in *E. coli*

Die Vektoren pGEX-4T2, pJC40 (Clos und Brandau 1994) und pASK-IBA3plus wurden verwendet, um Proteine rekombinant in *E. coli* zu exprimieren (Abb. 8).

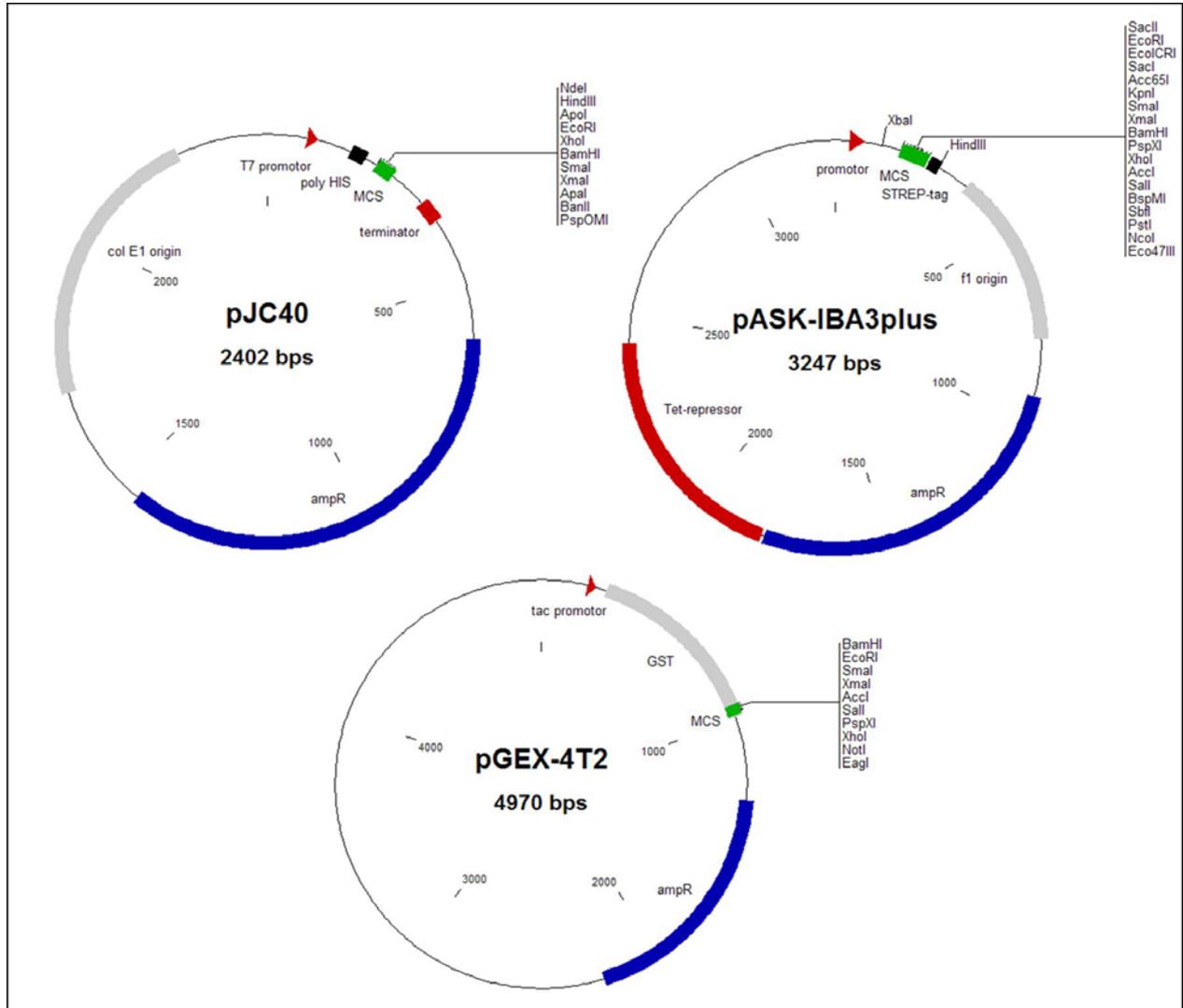


Abb. 8: Vektorkarten der Plasmide zur rekombinanten Expression in *E. coli*.

Die Vektoren pGEX-4T2 (GST-tag), pJC40 (His-tag) und pASK-IBA3plus (Strep-tag) ermöglichen eine N- bzw. C-terminale Fusion mit einem Protein-tag. Die Induktion der Proteinexpression kann durch IPTG (pGEX-4T2, pJC40) und Anhydrotetrazyklin (pASK-IBA3-plus) erfolgen. Restriktionsenzyme zum Einbringen von DNA-Sequenzen sind der jeweiligen MCS beigefügt.

Die hier aufgeführten Plasmide besitzen alle jeweils einen Protein-tag, der C-terminal (pASK-IBA3plus) bzw. N-terminal (pGEX-4T2, pJC40) mit den entsprechenden, über die MCS eingebrachten DNA-Sequenzen fusioniert werden kann. Dadurch wird die Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine durch entsprechende Affinitätschromatographie-Verfahren, sowie der immunologische Nachweis mit den jeweiligen Antikörpern, ermöglicht. Hierbei konnte zwischen einem His6- (pJC40), GST- (pGEX-4T2) oder Strep-tag (pASK-

IBA3plus) gewählt werden. Zur Induktion der Proteinexpression wurde das Lactose-Analogon IPTG für die Vektoren pGEX-4T2 (*tac*-Promotor) und pJC40 (*T7*-Promotor) verwendet, während Anhydrotetrazyklin die Expression im Plasmid pASK-IBA3plus (*tet*-Promotor) induzierte. Als Selektionsmarker ist allen hier aufgeführten Vektoren eine Ampicillin-Resistenz gegeben. Die zur Klonierung in die jeweiligen Vektoren verwendeten Oligonukleotide ist der Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung in pGEX-4T2, pJC40 und pASK-IBA3plus.

Bezeichnung	Sequenz 5' →3'
Ufm1-GEX-S(BamHI)	GCGC GGATCC TCGGGTGGAAACAGCAGCAACAACACTGCC
Ufm1-GEXglyAs(XhoI)	GCG CTCGAG TCAGCCGACGCGATCACGTGGAATCAGACGAAGTTCACT
Ufm1-GEXalaAs(XhoI)	GCGC CTCGAG TCATGCGACGCGATCACGTGGAATCAGACGAAGTTCACT
Uba5-GEX-S(EcoRI)	GCGC GAATTC TCAGTGATGAGCAAATCGATAAACTC
Uba5-GEX-As(XhoI)	GCGC CTCGAG TTATTCCTTCTGGGCTTCCTCGAC
MutUba5C260S-S	AAACGCGATGGAGTG TCT GCTGCGTCACTTCCA
MutUba5C260S-AS	TGGAAGTGACGCAGC AGA CACTCCATCGCGTTT
Uba5-IBA3-S(EcoRI)	GCGC GAATTC ATGAGTGATGAGCAAATCGAT
Uba5-IBA3-As(XhoI)	GCGC CTCGAG TTTTCCTTTGTTCTGGGCTTC
Ufc1-GEX-S(BamHI)	GC GGATCC GATGATGCCACGAAATCTAGT
Ufc1-GEX-As(XhoI)	GC CTCGAG GTCAGGCTTTTGGTTGAATTAA
Ufc1-40-S(NdeI)	GGAATTC CATATG GATGATGCCACGAAATCTAGT
Ufc1-40-S(XhoI)	CCG CTCGAG GGCTTTTGGTTGAATTAATCCTTTTTC

2.1.6.2 Vektoren und Oligonukleotide zur Hefe-Zwei-Hybrid Analyse

In den Hefe-Zwei-Hybrid Analysen wurden zwei unterschiedliche Vektoren zur Protein-Protein Interaktionsbestimmung verwendet. Auf Grund der speziellen Struktur des *Gal4* Transkriptionsfaktor kann dieser hierbei in seine DNA-aktivierende (AD)- und DNA-bindende (BD)-Domäne separiert werden. Die Funktionalität als isolierte Teilfragmente ist weiterführend gegeben. So liegt die Aktivierungsdomäne (Gal4ad) im Plasmid pGAD.GH und die DNA-Bindedomäne (Gal4bd) im Vektor pGBT9.BS vor (Abb. 9).

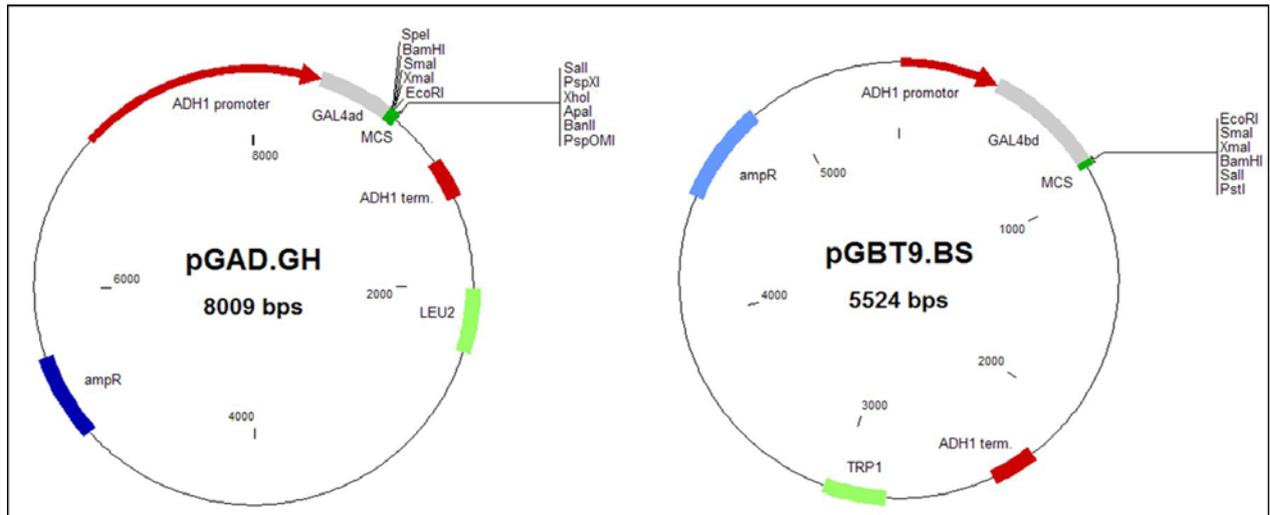


Abb. 9: Schematische Darstellung der Hefe-Zwei-Hybrid Vektoren.

Das Plasmid pGAD.GH weist die Aktivierungsdomäne und den Auxotrophiemarker Leu2 auf, während sich pGBT9.BS durch die DNA-Bindedomäne und den Selektionsmarker Trp1 auszeichnet. Die Expression beider Vektoren wird durch den *ADH1*-Promotor reguliert.

Diese beiden Domänen wurden N-terminal mit den durch die MCS eingebrachten Sequenzen fusioniert. Die Expressionsregulation der Fusionsproteine erfolgte durch den konstitutiv aktiven *ADH1*-Promotor. pGAD.GH und pGBT9.BS stellen *shuttle* Vektoren dar, die sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* autonom repliziert wurden. Die Transformation der Konstrukte erfolgte in die für Leucin, Tryptophan und Histidin auxotrophen Hefe-Stämme. Als Selektionsmarker wiesen beide Vektoren eine Ampicillin-Resistenz auf, sowie die Auxotrophiemarker Leu2 (pGAD.GH) und Trp1 (pGBT9.BS). Die Plasmide zur Hefe-Zwei-Hybrid Analyse wurden freundlicherweise von der AG Kudla zur Verfügung gestellt. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung in pGAD.GH und pGBT9.BS.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
UfSP2Y2HS(SpeI)	GCGC ACTAGT GACGAATTCTCAAAGTGTCTCA
UfSP2As(SmaI)	GCGC CCCGGG GGTCAAATAGCATCGCTAGGCGG
Ufm1Y2HAs(SalI)	GCGC GTCGAC TCAGCCGACGCGATCACGTGG
Ufm1Y2HS(BamHI)	GCGC GGATCC GATGTCGGGTGGAACAGCAGCA
Uba5Y2HS(SmaI)	GCG CCCGGG CATGAGTGATGAGCAAATCGATAAA
Uba5Y2HAs(EcoRV)	GCG GATATC TTATTTTCCTTTGTTCTGGGC
Ufc1Y2HS(BamHI)	GCGC GGATCC GATGGATGATGCCACGAAATCT
Ufc1Y2HAs(SalI)	GCGC GTCGAC TCAGGCTTTTGGTTGAATTAATCC
Ufl1Y2HS(SpeI)	GCGC ACTAGT GACTTCCTGGGCAGATATTCAG
Ufl1Y2HAs(SmaI)	GCGC CCCGGG GGTTATGGCATAATTGACTGTTT
Ufbp1Y2HS(SmaI)	GCGC CCCGGG GGATAATAATCAAGAGAAGTCT
Ufbp1Y2HAs(EcoRI)	GCGC GAATTC GGTTATTCGGCGGCCGATGGTGT
Kel8Y2HS(SmaI)	GC CCCGGG GATGCCAGTTTACGCAAAGCAATTTTT
Kel8Y2HAs(EcoRI)	GC GAATTC GTCAAATACAGTAGGATCCGCCTGA
Y113Y2HS(BamHI)	GCGC GGATCC GATGTCAGACGACTTGCCAATC
Y113Y2HAs(EcoRI)	GCGC GAATTC TCAATTTCTCCAGCGCCTG
F55Y2HS(SpeI)	GCGC ACTAGT GATGGGAAACAATCAGCCTGGT
F55Y2HAs(SmaI)	GCGC CCCGGG TTAGATAGGCTTGTAGAGTAG
Sequenzierungsprimer	
AD-forward	GCCTCCTCTAACGTTTCATGAT
AD-reverse	TTGAGATGGTGCACGATGCACAGT
BD-forward	TCATCGGAAGAGAGTAG
BD-reverse	TAATCATAAGAAATTCGCCCG

2.1.6.3 Vektoren und Oligonukleotide für Untersuchungen in *C. elegans*

Das Plasmid L4440 diente zur Expression der *dsRNA* in RNAi-Studien. Die zwei gegenläufigen *T7*-Promotoren flankieren die MCS, wobei nach Einfügen des entsprechenden Genabschnitts durch die MCS, die Expression mittels IPTG induzierbar ist. Als Selektionsmarker liegt eine Ampicillin-Resistenz vor (Abb. 11). Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide sind Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung in den Vektor L4440.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Ufm1-S-RNAi(PstI)	GCGC CTGCAG ATGTCGGGTGGAACAGCAGCA
Ufm1-As-RNAi(XhoI)	GCGC CTCGAG TCAATGGCCGACGCGATCACG
Uba5-S-RNAi(XbaI)	GCGC TCTAGA ATGAGTGATGAGCAAATCGATA
Uba5-As-RNAi(XhoI)	GCGC CTCGAG TTATTTTCCTTTGTTCTGGGC
Ufc1-S-RNAi(PstI)	GCGC CTGCAG ATGGATGATGCCACGAAATCT
Ufc1-As-RNAi(XhoI)	GCGC CTCGAG TCAGGCTTTTGGTTGAATTA
Y113-S-RNAi(XbaI)	GCGC TCTAGA ATGTCAGACGACTTGCCAATC
Y113-As-RNAi(HindIII)	GCGC AAGCTT TCAATTTCTCCAGCGCCTG

Zur *in vivo* Interaktionsstudie in *C. elegans* (DCLA; *Different Cyto-localization Assay*) wurde das Plasmid pPD122.36 verwendet (Abb. 11). Je nach Wahl der Restriktionsenzyme war eine N-terminale Fusion mit einer Ankerdomäne (pat3.MbLS) oder eine C-terminale GFP-Fusion möglich. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide sind in Tab. 4 aufgeführt. Die Expression wurde durch einen *myo3*-Promotor reguliert, wodurch nach Mikroinjektion in *C. elegans* eine starke Expression in den Muskelzellen des Hautmuskelschlauchs zu beobachten war. Als Selektionsmarker zur Klonierung liegt eine Ampicillin-Resistenz auf dem Plasmid kodiert vor.

Tab. 4: Oligonukleotide zur Klonierung in den Vektor pPD122.36.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
mUfm1S36(AgeI)	GCGC ACCGGT GTCGGGTGGAACAGCAGCAACA
mUfm1As36(NheI)	GCGC GCTAGC TCAGCCGACGCGATCACGTGG
Uba5S36(AgeI)	GCGC ACCGGT GAGTGATGAGCAAATCGATAAA
Uba5S36o(XbaI)	GCGC TCTAGA ATGAGTGATGAGCAAATCGAT
Uba5As36(NheI)	GCGC GCTAGC TTATTTTCCTTTGTTCTGGGC
Ufc1S36(BamHI)	GCGC GGATCC ATGGATGATGCCACGAAATCT
Ufc1As36(AgeI)	GCGC ACCGGT GGGGCTTTTGTTGAATTAATCC
Sequenzierungsprimer	
SeqpPD122.36MTLS	ACTTATAGCAATGTCTATAAC
SeqpPD122.36GFP	TCGCAATTGTGCTCGGAGTCA

In vivo Lokalisationsstudien erfolgten unter Verwendung des Reportergens GFP und konnten fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert werden. Hierzu wurde die jeweilige DNA-Sequenz in den Vektor pPD95.77 kloniert (Abb. 11). Entsprechend verwendete Oligonukleotide sind der Tab. 5 zu entnehmen. Da der Vektor keine Promotorsequenz beinhaltet, musste neben der gegebenenfalls einzubringenden Gen-Sequenz zusätzlich auch der putative native Promotor durch die MCS eingebracht werden. Als Selektionsmarker diente eine Ampicillin-Resistenz. Nach Mikroinjektion des Konstruktes in *C. elegans* wurde ein GFP-Fusionsprotein synthetisiert, welches die Lokalisationsanalyse erlaubt.

Tab. 5: Oligonukleotide zur Klonierung in den Vektor pPD95.77.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Überexpression	
Uba5S3kb(SmaI)	GCGC CCCGGG CTGGGGGTGAGTGGGAGCCAC
Uba5As(KpnI)P+G	CC GGTACC TTTTTCCTTTGTTCTGGGCTTCCTC
Ufc1S3kb(SmaI)	GCGC CCCGGG ATTCTTTGATCTCCATTATCA
Ufc1As(KpnI)P+G	CC GGTACC TTGGCTTTTGGTTGAATTAATCCTTT
C40h1.5SMut	CAAAAGAATTCAGA AAG AAGCTTATAATCCTT
C40h1.5AsMut	AAGGATTATAAGCTT CTT TCTGAAATTCTTTTG
Promotorstudie	
Ufc1As(KpnI) P+I	CC GGTACC TTAGCGATAATTGCCTCGTACTCTTC
Ufl1-S-2PKb(PstI)	GCGC CTGCAG CCCCATTCGGAAGAGGAAAAT
Ufl1-As-2kbP(XbaI)	GCGC TCTAGA CTGAAATATTTACCACTTTAA
Ufbp1-S-2PKb(HindIII)	GCGC AAGCTT GAACCGAAAACCACGATGAAT
Ufbp1-As-2kbP(PstI)	GCGC CTGCAG TTTCTAGAAATTAGATTAATT
Kel8-S-2PKb(HindIII)	GCGC AAGCTT AAAATTTTCATGTTTCGATTTT
Kel8-As-2kbP(PstI)	GCGC CTGCAG ATGAAGAGTTACTGTTGAAGT
Y113-S-2PKb(PstI)	GCCG CTGCAG GCTGCTAATTCGCTTTTGGA
Y113-As-2kbP(XbaI)	GCGC TCTAGA GATTTTTTATCTGAAAAATTA
Sequenzierungsprimer	
Fire5	GGACAACCTCCAGTGAAAAGTTCTTCTC
SeqC40h1.5S	GTAACATGTTGTTTTCTGAGAGC

2.1.6.3.1 Generierung des Plasmids pPD95.77N-Term

Da Ufm1 C-terminal durch die Cystein Proteasen UfSP1/2 prozessiert wird (Kang *et al.* 2007), war die N-terminale Fusion des Reportergens GFP zur Expressionsstudie in *C. elegans* notwendig. Der Vektor pPD95.77 eignet sich zwar zur GFP-Reportergenanalyse, allerdings ist eine Fusion hierbei ausschließlich C-terminal möglich. Auf Grund dessen wurden durch Mutagenesen zwei Restriktionschnittstellen (*EcoRV* und *BglII*) in den Vektor pPD95.77 eingefügt, so dass eine N-terminale GFP-Fusion ermöglicht wurde. Dieser Vektor wurde als pPD95.77N-Term bezeichnet (Abb. 11). In Abb. 10 dargestellt ist die ursprüngliche Sequenz des Vektors pPD95.77 sowie die durch PCR-Mutagenese veränderte Sequenz des Plasmids pPD95.77N-Term.

pPD95.77											
TAC	AAA	TAG	CAT	TCG	TAG	AAT	TCC	AAC	TGA	GCG	CCG
	Stop			Stop					Stop		
pPD95.77N-Term											
TAC	AGA	TAT	CAT	TCG	TAG	ATC	TCC	AAC	TGA	GCG	CCG
	<i>EcoRV</i>				<i>BglII</i>				Stop		

Abb. 10: Sequenzunterschiede von pPD95.77 zu pPD95.77N-Term.

Durch PCR-Mutagenese erzeugte Restriktionsschnittstellen (*EcoRV* und *BglII*) von pPD95.77N-Term im Vergleich zur Ausgangssequenz des Vektors pPD95.77.

Zur Mutagenese und anschließenden Klonierung verwendete Oligonukleotide der Ufm1-Vorstufe und gereiften Form von Ufm1 sind in Tab. 6 gelistet.

Tab. 6: Oligonukleotide zur Generierung von pPD95.77N-Term und Ufm1-Klonierung.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Mut95N-S-(<i>EcoRV</i>)	ATGGATGAACTATAACA GATATC ATTCGTAGAATTCC
Mut95N-As(<i>EcoRV</i>)	GGAATTCTACGAAT GATATC TGTATAGTTCATCCAT
Mut95N-S(<i>BglII</i>)	TACAGATATCATTCGT AGATCT CCAACTGAGCGCCG
Mut95N-As(<i>BglII</i>)	CGGCGCTCAGTTGG AGATCT ACGAATGATATCTGTA
Ufm1S3kb(<i>SmaI</i>)	GCGC CCCGGG GTGACAAAATAAACGAAACTT
Ufm1As(<i>KpnI</i>)P+I	GCGC GGTACC CTGAAAAATTAATGCATGACG
Ufm1S(<i>EcoRV</i>)G	GCGC GATATC GGTCGGGTGGAACAGCAGCAACA
Ufm1As(<i>BglII</i>)G	GCGC AGATCT GTCAATGGCCGACGCGATCACG
Ufm1matAsN(<i>BglII</i>)	GCGC AGATCT G TCAGCCGACGCGATCACGTGG
Sequenzierungsprimer	
Seq95N-TerSNeu	CAGACAACCATTACCTGTCCA

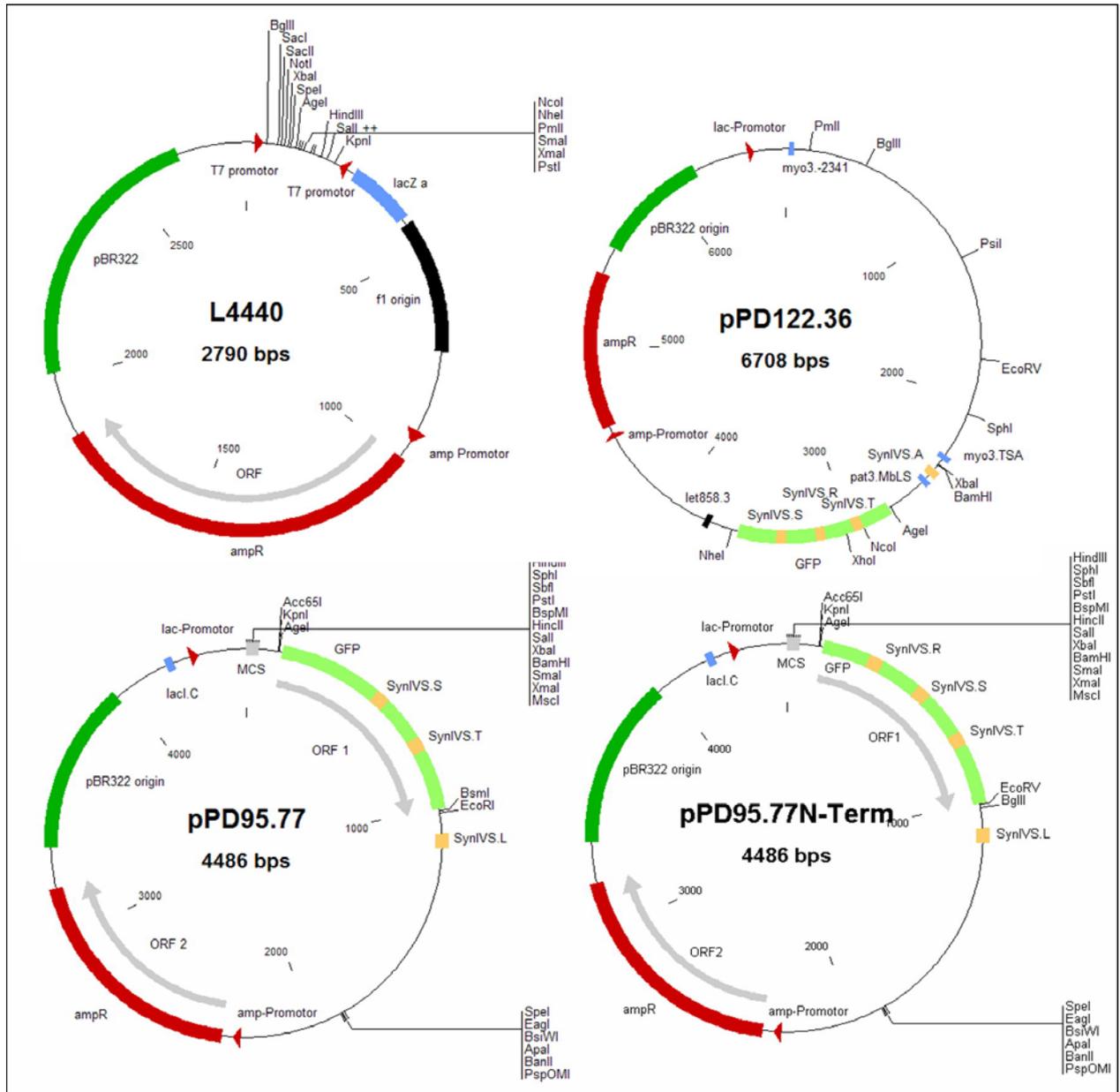


Abb. 11: Vektoren für *in vivo* Untersuchung in *C. elegans*.

Der RNAi vermittelte *knock-down* nach der *feeding* Methode erfolgte unter Verwendung des Plasmids L4440. Für *in vivo* Interaktionsstudien wurde das Plasmid pPD122.36 genutzt, während die GFP-Reportergenstudien durch die Vektoren pPD95.77 und pPD95.77N-Term erfolgten.

2.1.7 Verwendete Organismen

2.1.7.1 *C. elegans*-Stämme

Die verwendeten Würmer stammten von einem nahe Bristol (England) isolierten *C. elegans*-Stamm (N2 *var.* Bristol) (Nicholas *et al.* 2006) und werden im Folgenden als Wildtyp bezeichnet. Weitere verwendete *C. elegans*-Stämme wobei solche, die Mutationen im Genom trugen oder transgene Linien darstellen wurden freundlicherweise vom *Caenorhabditis Genetics Center* (Minnesota, MN, USA) und von Limor Borday (Israel) bereitgestellt und sind in Tab. 7 gelistet.

Tab. 7: Verwendete *C. elegans*-Stämme.

<i>C. elegans</i> -Stamm	Genotyp [<i>Gen</i> (Allel) Chromosom]
N2 var. Bristol	Wildtyp
RB2441	<i>uba5</i> (ok3364) I
RE666	<i>ire-1</i> (v33) II
RB545	<i>pek-1</i> (ok275) X
RB772	<i>atf-6</i> (ok551) X
GE24	<i>pha-1</i> (e2123) III
BC14232	<i>rCes F38A5.1::GFP + pCeh361; dpy-5</i> (e907) I
SJ6	<i>zIs4 V[hsp-4::GFP]; upr-1</i> (zc6) X
TJ356	<i>zIs356</i> IV; <i>DAF-16::GFP</i>

2.1.7.2 *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Stämme

In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme (Tab. 8) leiten sich von den Sicherheitsstämmen *E. coli* K12 oder *E. coli* B ab. Die Hefe-Stämme wurden freundlicherweise von der AG Prof. J. Kudla, WWU Münster zur Verfügung gestellt (Tab. 8).

Tab. 8: Verwendete Bakterien- und Hefe-Stämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMRmrr)173$ <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> <i>F'[proAB lac1 ΔM15Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB⁻ mB⁻) lacIq</i> <i>lambda lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>	Invitrogen
HT115	<i>F⁻ mcrA mcrB IN (rrnDrrnE)1 lambda-rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lavUV5 promotor-T7 polymerase)</i>	Olaf Bossinger, Düsseldorf
OP50	Uracil auxotrophes <i>E. coli</i> B-Derivat	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i> , Minnesota, USA
<i>S. cerevisiae</i>		
pJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200</i> <i>gal4Δ gal80Δ LYSZ::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2</i> <i>met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> 1996
SMY-3	Y190 <i>TORI-3 cnbl::ADE2</i>	Cardenas <i>et al.</i> 1994

2.1.8 Antikörper

Tab. 9: Verwendete Antikörper zur Immunodetektion.

Bezeichnung	Verdünnung	Beschreibung	Quelle
Anti-His	1:1000	monoklonal, aus Maus gegen His6 Epitop; Isotyp IgG	Dianova (Hamburg)
Amti-GST	1:5000	monoklonal, aus Ziege gegen GST; Isotyp IgG	Dianova (Hamburg)
Anti-Strep	1:1000	monoklonal, aus Ziege gegen Strep-tag; Isotyp IgG	IBA (Göttingen)
Anti-Ufm1	1:1000	polyklonal, aus Kaninchen gegen Ufm1; Isotyp IgG	<i>Academy of Science</i> Bulgarien
Anti-mouse AP	1:5000	monoklonal, aus Esel gegen Maus-IgG; konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Dianova (Hamburg)
Anti-goat AP	1:5000	monoklonal; aus Affe gegen Ziege-IgG; konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Dianova (Hamburg)
Anti-rabbit AP	1:10000	monoklonal, aus Ziege gegen Kaninchen-IgG; konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Dianova (Hamburg)

2.1.9 Puffer, Lösungen und Medien

Allgemeine Medien für das Arbeiten mit *E. coli*

LB-Medium (Luria-Bertani-Broth)	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 1 % NaCl in dH ₂ O
LB-Agar	1,5 % Agar in LB-Medium
LB-Amp-Medium/Agar	Zugabe von Ampicillin (50 mg/ml) auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml
SOC-Medium	2 M Glukoselösung (1 ml; sterilfiltriert), 1 M MgCl ₂ -Lösung (1 ml; sterilfiltriert) ad 100 ml LB-Medium
OP50-Medium	20 g/l Pepton, 5 g/l NaCl in H ₂ O, pH 7,4 → autoklavieren, 10 mg/ml Uracil

Allgemeine Puffer und Medien für das Arbeiten mit *C. elegans*

NGM-Medium	975 ml dH ₂ O, 3 g NaCl, 2,5 g Pepton aus Casein →autoklavieren 1 ml Cholesterin (5 mg/ml in Ethanol gelöst), 0,5 ml CaCl ₂ (1 M), 1 ml MgSO ₄ (1 M), 25 ml KH ₂ PO ₄ (1 M)
NGM-Agar	17 g/l Agar in NGM-Medium
RNAi-Agar	1 l NGM-Agar, 1 ml Ampicillin (50 mg/ml in dH ₂ O sterilfiltriert), 2,5 ml IPTG (1 M) (in dH ₂ O, sterilfiltriert)
M9-Puffer	3 g KH ₂ PO ₄ , 6 g Na ₂ HPO ₄ , 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O → autoklavieren, 1 ml MgSO ₄ (0,1 M) (autoklaviert)
Bleaching-Lösung	1300 µl dH ₂ O, 100 µl NaOH (10 M), 600 µl NaOCl (4% Cl)
Freezing solution	5,85 g NaCl, 6,8 g KH ₂ PO ₄ , 300 ml 100% Glycerin, 5,6 ml NaOH (1 M) ad 1 l dH ₂ O → autoklavieren, 3 ml MgSO ₄ (0,1 M)
Palmitinsäure	10 mg/ml Palmitinsäure in 100% Ethanol
Lyse-Puffer	10 mM Tris (pH 8,0), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl ₂ , 0,45 % Tween, 0,05 % Gelatine, 1 mg/ml Proteinase K

Allgemeine Medien für das Arbeiten mit *S. cerevisiae*

SD-Medium	6,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis, 2 % Glukose
SD-Agar	20 g/l Agar in SD-Medium
SD-Medium Leu-Trp	0,64 g/l CSM Leu-Trp in SD-Medium
SD-Medium Leu-Trp-His	0,64 g/l CSM Leu-Trp-His, 0,5 mM / 2,5 mM / 5 mM / 15 mM 3-Aminotriazol in SD-Medium
YPD-Medium	20 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefeextrakt → autoklavieren, 2 % Glukose (sterilfiltriert)
YPD-Agar	20 g/l Agar in YPD-Medium
PEG-Lösung	25 g PEG ad 50 ml dH ₂ O (steril filtrieren)

Medien zur Kultivierung von *Bacillus thuringiensis* und Sporenbildung

BT-Medium	7,5 g Pepton, 1 g Glukose, 3,4 g KH_2PO_4 , 4,35 g K_2HPO_4 ad 1 l dH_2O , pH 7,2 → autoklavieren
Salz-Lösung	2,46 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,04 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,28 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ad 100 ml dH_2O (steril filtrieren)
modifizierter PBS-Puffer	150 mM NaCl, 30 mM KCL, 5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0

Alle Lösungen sind frisch herzustellen und dürfen nicht älter als 2 Wochen sein.

Puffer und Lösungen für molekularbiologisches und biochemisches Arbeiten**Minipräparation von Plasmid-DNA**

GTE-Puffer (Lösung 1)	50 mM Glukose, 25 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA
NaOH/SDS (Lösung 2)	0,5 ml SDS (20 %), 1 ml NaOH (2 M) ad 10 ml dH_2O
KOAc/HOAc (Lösung 3)	60 ml KOAc (5 M), 11,5 ml Essigsäure (100 %) ad 100 ml dH_2O

Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer	2 M Tris (pH 8,3), 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA
DNA-Ladepuffer (6 x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 40 % (w/v) Glycerin in 1 x TAE-Puffer lösen
1 %iges Agarosegel	0,5 g Agarose in 50 ml 1x TAE-Puffer

Autoinduktion

Medium 1 (50x 5052-Puffer)	25 % Glycerin (autoklaviert), 2,5 % Glukose (sterilfiltriert), 10 % α -Laktosemonohydrat in dH_2O (sterilfiltriert)
Medium 2 (25x Puffer)	1,25 M Na_2HPO_4 , 1,25 M KH_2PO_4 , 2,5 M NH_4Cl , 0,25 M NH_4SO_4 in dH_2O → autoklavieren

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Acrylamid-Stammlösung (30%)	29,1 g Acrylamid, 0,9 g Bisacrylamid in 100 ml dH ₂ O lösen
Sammelgel-Puffer	5,7 g Tris/HCl in 100 ml dH ₂ O, pH 6,7
Trenngel-Puffer	36,3 g Tris/HCl in 100 ml dH ₂ O, pH 8,9
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,2 % SDS, pH 8,3
SDS-Probenpuffer (4 x)	100 mM Tris, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 200 mM DTE, 0,2 % Bromphenolblau, pH 6,8
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v) APS in dH ₂ O
Sammelgel (5 %)	1 ml Sammelgelpuffer, 2,3 ml dH ₂ O, 667 µl Acrylamid (30 %), 5 µl TEMED, 60 µl SDS (10 %), 30 µl APS (10 %)
Trenngel (12,5 %)	1,5 ml Trenngelpuffer, 2,0 ml dH ₂ O, 2,5 ml Acrylamid (30 %), 5 µl TEMED, 60 µl SDS (10 %), 30 µl APS (10 %)

Tricin-Disk-Elektrophorese

SDS- Ladepuffer	25 mM Tris/HCl (pH 6,8), 6 % Glycerin, 2 % SDS, 1 % Mercaptoethanol, 0,005 % Bromphenolblau
Gelpuffer	3 M Tris/HCl (pH 8,45), 0,3 % SDS
Anodenpuffer	0,2 M Tris/HCl, pH 8,9
Kathodenpuffer	0,2 M Tris/HCl (pH 8,25), 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS
Sammelgel (4 %)	540 µl Acrylamid (30 %), 1 ml Gelpuffer, 2,44 ml dH ₂ O, 5 µl TEMED, 20 µl APS (10 %)
Trenngel (16 %)	3,2 ml Acrylamid (30 %), 2 ml Gelpuffer, 0,8 ml Glycerin, 0,7 ml dH ₂ O, 5 µl TEMED, 25 µl APS (10 %)

Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbelösung	2 g Coomassie-Brilliant-Blue G-250, 400 ml Isopropanol, 70 ml Eisessig ad 1 l dH ₂ O
Entfärbelösung	200 ml Isopropanol, 75 ml Eisessig ad 1 l dH ₂ O
Kolloidale Coomassie-Färbelösung	0,12 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G-250 in 10 % (v/v) Phosphorsäure, 10 % APS, 20 % (v/v) Methanol
Kolloidaler Coomassie-Entfärber	20 % Methanol in H ₂ O

Western-Blot

Protein-Transfer-Puffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS, 20 % (v/v) Methanol
Blockierungslösung	3 % BSA in TBS-T

Immunodetektion

PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCL, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O, pH 7,4
TBS	20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 137 mM NaCl
TBS-T	0,1 % Tween in TBS
BCIP-Lösung	50 mg BCIP in 1 ml DMF (100 %)
NBT-Lösung	50 mg NBT in 1 ml DMF (70 %)
AP-Puffer	0,1 M Tris/HCl (pH 9,5), 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl ₂
AP-Entwicklungslösung	10 ml AP-Puffer, 66 µl NBT-Lösung, 33 µl BCIP-Lösung

Bradford-Test

Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G-250, 4,7 % (w/v) Ethanol, 8,5 % H ₃ PO ₄
-------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------

Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Agarose

Lysispuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 10 % Glycerol, 10 mM Imidazol, 0,1 % Triton
Waschpuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 10 % Glycerol, 20 mM Imidazol, 0,1 % Triton
Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 0,1% Triton

Proteinaufreinigung über GSH-Agarose

Lysispuffer	PBS
Waschpuffer	PBS und PBS-T (PBS + 0,1 % Tween)
Elutionspuffer (pH 8,0)	10 mM Glutathion (reduziert), 100 mM Tris/HCl

Proteinaufreinigung über Strep-Tactin Sepharose

Waschpuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Elutionspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin
Regenerationspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA

Puffer für Thioesterbildungs-assay

Thioester-assay-Puffer	50 mM Bis-Tris (pH 6,5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0,1 mM DTT
-------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Escherichia coli- Stammhaltung und Kultivierung

Vorkulturen bzw. Übernachtskulturen wurden aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte in Flüssigmedium angeimpft. Die Kultivierung erfolgte in Schüttelinkubatoren bei 120 rpm und 37°C ÜN. Zur längerfristigen Lagerung von Bakterienkulturen in Glycerinkulturen wurden 800 µl einer ÜN Flüssigkultur mit 200 µl autoklaviertem Glycerin (100 %) versetzt und bei -80°C gelagert. Als Maß für das Zellwachstum wurde die optische Dichte einer Flüssigkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) im Spektralphotometer bestimmt. Einmal-Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm wurden hierzu verwendet.

2.2.2 Saccharomyces cerevisiae - Kultivierung und Lagerung

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30°C in YPD-Medium. Transformierte Hefe-Zellen konnten außerdem in SD-Medium mit den jeweiligen Auxotrophie-Markern kultiviert werden. Die Lagerung der Hefe-Zellen auf YPD- oder SD-Agar-Platten war bis zu vier Monate bei 4°C möglich. Zur längerfristigen Lagerung bei -80°C wurden 0,8 ml ÜK (200 rpm; 30°C) mit 200 µl sterilem Glycerin (100 %) versetzt.

2.2.3 Caenorhabditis elegans

2.2.3.1 Stammhaltung und Kultivierung

C. elegans Kulturen wurden auf NGM-Agar in Petrischalen mit den *E.coli* Futterbakterien OP50 kultiviert. Die Kultivierungstemperatur betrug bei allen eingesetzten *C. elegans*-Stämmen 20°C (Tab. 7). Lediglich der zur Mikroinjektion verwendete *C. elegans*-Stamm *pha-1(e2123)III* musste bei einer Temperatur von 15°C kultiviert werden (Granato *et al.* 1994). Zur längerfristigen Lagerung der *C. elegans*-Stämme wurden Gefrierdauerkulturen angelegt. Hierzu wurde eine bewachsene *C. elegans* NGM-Platte (90 mm) mit 3 ml M9-Puffer abgespült. Es wurden 0,25 ml dieser *C. elegans* Suspension mit gleichem Volumen *Freezing Solution* versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2.3.2 Bleaching (Axenisieren): Synchronisation von C. elegans Kulturen

Zur Synchronisation und Befreiung von Kontamination durch Pilze und Bakterien wurden *C. elegans* Kulturen mit einer Na-Hypochlorid-Lösung behandelt. Na-Hypochlorid löst die Cuticula von adulten und larvalen Würmern auf und es bleibt eine keimfreie, synchrone aus Embryonen bestehende *C. elegans* Kultur zurück. Die Untersuchungen zur Entwicklung,

Lebensdauer und Reproduktion von *C. elegans* machten eine Synchronisation der Wurm-Kulturen notwendig. Auch waren keimfreie Kulturen für Stress- als auch RNAi-Untersuchungen essentiell, damit Kontaminationen nicht die Ergebnisse verfälschten.

Es wurden 3 ml dH₂O zum Abspülen der adulten Würmer von gut bewachsenen NGM-Platten (90 mm) verwendet. Die *C. elegans* Suspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, für 1 min bei 4.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Würmer für 6 min mit einer 0,5 M NaOH- und 1 %igen Na-Hypochlorid-Lösung unter Schwenken inkubiert. Daraufhin erfolgte die erneute Zentrifugation (4.000 x g, 1 min), und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde jeweils mit 2 ml dH₂O, 1 ml M9-Puffer gewaschen (4.000 x g, 1 min) und abschließend in 2 ml M9-Puffer resuspendiert. Die erhaltenen Embryonen wurden direkt auf NGM-Platten überführt.

2.2.3.3 Generierung von transgenen *C. elegans*-Stämmen durch Mikroinjektion

Die DNA-Konstrukte wurden durch Mikroinjektion in die Gonaden von jungen adulten Hermaphroditen des *C. elegans* WT (N2 Bristol) und der *pha-1(e2123)III*-Mutante eingebracht (Mello *et al.* 1991). Nur bei 15°C ist die *pha-1(e2123)III*-Mutante auf Grund eines genetischen *knock-outs* des *pha-1* Gens in der Lage einen funktionsfähigen Pharynx auszubilden (Granato *et al.* 1994). Nach Co-Injektion des DNA-Konstruktes und des Markerplasmids pBX, das das dominante *pha-1*-Gen trägt, konnten die *pha-1(e2123)III*-Würmer bei 25°C zur Selektion kultiviert werden. Die Co-Injektion des auf dem Plasmid pRF4 kodierten Marker *rol-6 (su1006)* wurde hingegen zur Selektion im Wt-Hintergrund verwendet, wobei der offensichtliche *rol-6* Phänotyp ab dem L3-Stadium zu beobachten war (Kramer *et al.* 1990, Mello *et al.* 1991). Die Keimbahntransformation erfolgte nach Co-Injektion des entsprechenden Konstruktes (80 ng/μl) und des jeweiligen Marker-Plasmids (50 ng/μl).

2.2.3.4 Mikroskopische Untersuchung von GFP *C. elegans*-Stämmen

Transgene *C. elegans* wurden durch 12,5 μl Levamisol (10 mM) auf einem Objektträger immobilisiert und mit einem Deckglas fixiert. Zur Mikroskopie wurde zum einen das inverse Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50 und zum anderen das Konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) Leica TCS SP2 verwendet. Durch die Methode der Nomarski-DIC-Mikroskopie (DIC: *differential interference contrast*) erfolgte die Beobachtung der transparenten Würmer. Die grüne GFP-Fluoreszenz konnte unter Blaulichtanregung bzw. Anregung mit UV-Licht dokumentiert werden. Die

photographische Dokumentation erfolgte durch das Olympus Kamerasystem IX-TVAD. Zur Bild-Bearbeitung wurden die Programme Adobe Photoshop CS2, Canon PhotoStitch und Windows I.C.E. genutzt.

2.2.3.5 Einzelwurmlyse

Zur Lyse der Nematoden wurden 2 - 3 Würmer in den Deckel eines PCR-Reaktionsgefäß mit 2,5 µl Lyse-Puffer & Proteinase K (95 µl Lyse-Puffer & 5 µl Proteinase K) überführt. Der Reaktionsansatz wurde herunterzentrifugiert und ÜN bei -80°C eingefroren. Anschließend erfolgte die Lyse der Würmer im Thermocycler (1 h 65°C, 15 min 95°C). 1 µl des Lysats wurde daraufhin als *template* in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.3.6 RNAinterference (RNAi)

RNAi beschreibt den spezifischen Abbau von RNA-Molekülen durch homologe doppelsträngige RNA (dsRNA) in der Zelle. Dieses Prinzip wurde verwendet, um den spezifischen Abbau von endogener mRNA (*knock-down*) durch Einbringen externer dsRNA zu induzieren. Die Applikation von dsRNA kann in *C. elegans* durch zwei Verfahren erfolgen. So wird entweder die *in vitro* hergestellte dsRNA durch Mikroinjektion in die Würmer eingebracht oder die dsRNA produzierenden *E. coli* werden als Futterquelle geboten. Zur phänotypischen Auswertung wurden die Nachkommen der behandelten Würmer betrachtet, da der RNAi-Effekt zumindest auf die F1-Generation übertragbar ist (Grishok *et al.* 2000).

RNAi vermittelt durch *feeding* wurde nach Kamath und Ahringer (2003) durchgeführt. Die Gen-Abschnitte, welche den *knock-down* bedingen, wurden in den Vektor L4440 kloniert und in die RNaseIII-defizienten *E. coli* HT115-Bakterien transformiert. Dieser Bakterien-Stamm besitzt neben einem Tetrazyklinresistenz-Gen auch einen IPTG induzierbaren Promotor für die T7-Polymerase. Es wurde ebenfalls die sogenannte RNAi Bank von MRC (*Medical Research Council*) verwendet in der sich etwa 16.000 Bakterien-Glycerinstocks mit bereits klonierten und transformierten Konstrukten befinden. Die transgenen *E. coli*-Stämme wurden kultiviert und anschließend als Futterquelle für *C. elegans* verwendet. Als Kontrolle diente in den Experimenten die mit dem „leeren“ L4440 Vektor transformierten *E. coli* HT115-Zellen. Eine ÜN-Kultur des jeweiligen transgenen *E. coli* HT115-Stammes wurde in LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) und Tetrazyklin (1 mM) angeimpft. Nach 18 h wurde die Bakterienkultur auf RNAi-Platten aufgebracht, wobei diese anschließend ÜN bei RT inkubiert wurden. In diesem Zeitraum wurde durch IPTG Induktion die dsRNA in den Bakterien auf

den Platten produziert. Frisch synchronisierte *C. elegans* Kulturen wurden auf diese RNAi-Platten überführt und für 3 Tage bis zum Erreichen des adulten Stadiums kultiviert. Anschließend wurden Eier der F1-Generation auf frische RNAi-Platten aufgebracht, und nach weiteren 3 Tagen wurde der *knock-down* Phänotyp überprüft.

2.2.3.7 Bestimmung der adulten Lebensdauer

Zur Bestimmung der adulten Lebensdauer bei 20°C wurden zunächst 10 L4-Larven des jeweiligen *C. elegans*-Stammes auf je 10 NGM-Platten mit Palmitin-Ring verteilt. Der prozentuale Anteil der überlebenden Würmer von der Gesamtzahl der Tiere wurde täglich dokumentiert. Ab dem adulten Wurmstadium ($t = 0$) begann die Eiablage und die Tiere wurden alle zwei Tage auf neue NGM-Platten umgesetzt, um eine Unterscheidung der parentalen von der F1-Generation zu gewährleisten. Als tot klassifiziert wurden Würmer, die nicht mehr auf taktile Reize reagierten und kein erkennbares Pharynxpumpen zeigten. In die weitere Statistik sind ausschließlich Tiere aufgenommen worden, die an einem natürlichen Tod verstorben waren. So wurden Würmer die am Rand der Petrischale vertrockneten, Probleme bei der Eiablage oder Eingraben in den Agar zeigten nicht mitgezählt.

2.2.3.8 Bestimmung der postembryonalen Entwicklung und der Reproduktionsrate

Adulte Hermaphroditen wurden zur Bestimmung der postembryonalen Entwicklung für 3 - 4 h auf NGM-Platten zur Eiablage gesetzt ($t = 0$) und anschließend wieder von den Platten genommen. Nachdem die F1-Generation das L3-Stadium erreicht hatte, wurde die Entwicklung täglich dokumentiert. Zusätzlich konnte die Anzahl der Nachkommen (Reproduktionsrate) der jeweils vereinzelt Würmer ermittelt werden. Bis die parentalen Würmer die Eiablage einstellten, wurden diese täglich auf neue NGM-Platten überführt und die Gesamtzahl der Nachkommen im L3 - L4 Stadium ermittelt.

2.2.3.9 Stress-Resistenz

Zur Analyse der Stress-Toleranz wurde der jeweilige Stressor im NGM-Agar gelöst und die Exposition adulter *C. elegans* erfolgte für einen entsprechenden Zeitraum. Die Stress-Toleranz wurde als prozentualer Anteil lebender Würmer von der Gesamtzahl eingesetzter Tiere berechnet. Die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der GFP-Reporterstudien unter Stressbedingungen erfolgte wie unter 2.2.3.4 beschrieben.

2.2.3.10 Tunicamycin Sensitivitäts-assay

Die postembryonale Entwicklung von *C. elegans* wurde unter dem Einfluss von Tunicamycin nach RNAi vermitteltem *knock-down* in verschiedenen *C. elegans*-Linien untersucht (Darom *et al.* 2010). Die hierbei verwendeten *C. elegans*-Stämme umfassten den Wildtyp (N2 Bristol) und die drei Deletionsmutanten der ER-Signaltransduktoren *ire-1(v33)*, *pek-1(ok275)* und *atf-6(ok551)*. Die Kultivierung unter RNAi vermitteltem *knock-down* erfolgte bis zu dem Zeitpunkt an dem die nachfolgende F1-Generation adult war. Daraufhin wurden die Würmer axenisiert und die Eier der F2-Generation auf Tunicamycin-Platten aufgebracht. Tunicamycin-Konzentrationen von 0 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml wurden verwendet. Nach einer Zeitspanne von 72 h bei 20°C wurde die Entwicklung der *C. elegans*-Stämme Wt, *pek-1(ok275)* und *atf-6(ok551)* dokumentiert. Da die *ire-1(v33)*-Mutante bereits eine verzögerte Entwicklung aufweist, erfolgte deren Dokumentation erst nach 106 h. Zu diesem Zeitpunkt waren mindestens 70 % der Kontrolltiere adult. Zur Entwicklungsbestimmung wurden wie nach Darom *et al.* (2010) die ausgezählten Würmer in zwei Kategorien unterteilt: Larval (L1 - L4 Larven) und adult. Tote Tiere, die entweder am Rand der Petrischale vertrockneten oder durch den Tunicamycin-Stress starben, wurden im Weiteren nicht berücksichtigt. Das Verhältnis der beiden Gruppen zueinander wurde zwischen Kontrolle (L4440) und dem *knock-down* Ansatz in den entsprechenden *C. elegans*-Stämmen verglichen. Ein Verhältnisunterschied von $\leq 5\%$ in der Entwicklung wurde als ein ausbleibender additiver Effekt im jeweiligen *C. elegans*-Stamm gewertet. Pro Tunicamycin-Konzentration und RNAi-Konstrukt wurden 10 NGM-Platten mit mindestens 20 Eiern verwendet und in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

2.2.4 Sporen und Toxinpräparation von *Bacillus thuringiensis*

Für Stressuntersuchungen wurden die infektiösen Stadien von *B. thuringiensis* verwendet. Diese sind durch *B. thuringiensis*-Sporen und deren assoziierte Toxine (kristalline Proteine; Cry-Proteine) gekennzeichnet. Die Herstellung der Sporen und Toxine dauerte eine Woche, wobei die Präparation bei -20°C über ein Jahr haltbar ist. Es wurden drei *B. thuringiensis*-Stämme im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Der Stamm DSM 350 produziert zwar kristalline Proteine, jedoch sind diese nicht toxisch für *C. elegans*. Er stellt damit die negative Kontrolle in den Untersuchungen dar. Die beiden anderen *B. thuringiensis*-Stämme produzieren für *C. elegans* pathogene Toxine und unterscheiden sich lediglich im Grad der Toxizität (B-18247 mittel-pathogen; B-18679 stark-pathogen). Zur Herstellung der Sporen und Toxine wurde ein Volumen von 200 ml in Erlenmeyerkolben mit Schikanen gewählt. 200

ml BT-Medium + 1 ml Salz-Lösung + 250 µl CaCl₂ (1 M) wurden mit einem der drei in dieser Arbeit verwendeten *B. thuringiensis*-Stämme angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 28°C und 150 rpm. Zur Verstärkung der Sporen und Toxinbildung wurden am vierten Tag erneut 1 ml Salz-Lösung und 250 µl CaCl₂ (1 M) der Kultur zugeben. Nach 7 Tagen wurde die Kultur geerntet und aufgereinigt. Die 200 ml Kultur wurde bei 3.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 6 ml modifiziertem PBS-Puffer resuspendiert. Die *B. thuringiensis*-Sporen und Toxine wurden zu je 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch den *student* t-Test. Der *p-Value* gibt hierbei die Wahrscheinlichkeit an, mit der ein Unterschied durch Zufall entsteht. Ein *p-Value* ≤ 0,05 wurde als signifikant (*) und ein *p-Value* ≤ 0,01 als hochsignifikant (***) gewertet.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden zur Präparation von Nukleinsäuren

2.2.6.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *C. elegans* und Synthese von cDNA

Zur RNA-Präparation wurde eine gut bewachsene Platte des *C. elegans*-Wildtyps mit mindestens 3 ml M9-Puffer abgespült. Die erhaltenen Würmer wurden in ein 15 ml Falcontube überführt, anschließend zentrifugiert (1.500 rpm, 1 min) und das entstandene Wurm-pellet mehrfach mit M9-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden die Würmer in ein Reaktionsgefäß überführt und in 500 µl TRIzol® mehrere Minuten homogenisiert. Je nach Pelletgröße (100 µl Wurm-pellet → 1000 µl TRIzol®) wurde die entsprechende Menge TRIzol® dem Ansatz zugegeben und dieser 10 min bei RT inkubiert. Wurmreste wurden abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min), der Überstand mit 1/5 Volumen Chloroform versetzt und 15 min schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (10.500 rpm, 15 min, 4°C), und die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol, einer Inkubation bei -20°C für mindestens 20 min und darauf folgender Zentrifugation (10.500 rpm, 10 min). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in kaltem Ethanol (70 % DEPC) gewaschen und zentrifugiert (8.000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet im Heizblock bei 37°C getrocknet, bis es transparent erschien. Das Pellet wurde anschließend in 20 µl H₂O (DEPC) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -80°C in absolutem Ethanol.

Die komplementäre cDNA wurde anschließend unter Verwendung der M-MLV-RT (*Moloney murine leukemia virus*-Reverse Transkriptase) aus der zuvor isolierten Gesamt-RNA nach Herstellerangaben der Firma AppliChem synthetisiert.

2.2.6.2 Präparation genomischer DNA von *C. elegans*

C. elegans Würmer wurden in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA und 2 % SDS homogenisiert und anschließend mit Proteinase K (100 µg/ml) für 2 h bei 55°C behandelt. Dem Ansatz wurde gesättigte NaCl-Lösung (1/4 des Endvolumens) zugegeben. Daraufhin folgte die Inkubation des Ansatzes für 5 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation (2.000 x g, 15 min). Der Überstand wurde mit RNase (100 µg/ml) für 30 min bei 37°C behandelt. Nachfolgend wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Natriumacetat Fällung durchgeführt und die DNA in dH₂O resuspendiert.

2.2.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Synthese von PCR-Fragmenten zur Klonierung bis 4 kb erfolgte in dieser Arbeit mit der *Taq* bzw. *Pfu* DNA-Polymerase. Größere PCR-Fragmente (> 4 kb) wurden mit dem *Expand Long Template* PCR System (Roche Diagnostics) synthetisiert. Nach Herstellerangaben wurden die Reaktionsbedingungen entsprechend gewählt.

2.2.6.4 PCR-Mutagenese

Die gerichtete PCR-Mutagenese wurde mit dem Kit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.6.5 Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen

Mit Hilfe des mi-PCR Purification Kit (metaBion) erfolgte die Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen nach Angaben des Herstellers.

2.2.6.6 Plasmidpräparation durch Fällung und über Säulenaufreinigung

Das Prinzip der alkalischen Lyse wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendet (Birnboim und Doly 1979), wobei die Zellen durch die Zugabe von SDS lysiert und die Zellbestandteile unter alkalischen Bedingungen denaturiert wurden. Die Renaturierung der Plasmid-DNA erlaubte anschließend die Trennung der Plasmid-DNA von den anderen Zellbestandteilen durch Zentrifugation.

Hierzu wurden 3 ml einer Bakterien-ÜK bei RT zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer (Lösung 1) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS (Lösung 2) wurde die Lösung mehrmals invertiert. Zur Neutralisation der Reaktion wurden 150 µl KOAc/HOAc (Lösung 3) zugegeben und mehrmals invertiert. Ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 15 min schloss sich an. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl eiskaltem Isopropanol versetzt und für 20 min bei -20°C inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz zentrifugiert (13.000 rpm, 20 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für 10 min bei 55°C getrocknet und in 50 ml dH₂O resuspendiert. Die Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Kitsysteme mi-Gel Extraction Kit & mi-Plasmid Miniprep Kit (metaBion) nach Angaben des Herstellers.

2.2.6.7 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion diente der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen. Hierzu wurde die Lösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1 (v/v/v)) versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren wurden die entstandenen Phasen durch Zentrifugation (13.000 x g, 1 min, 4°C) getrennt und die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Ethanol-Natriumacetat Fällung.

2.2.6.8 Ethanol-Natriumacetat Fällung

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus einer Lösung wurde ein 2,5 faches Volumen Ethanol (100 %) und 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M) zugegeben. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 10 min auf Eis. Anschließend erfolgte zur Pelletierung der Nukleinsäuren eine 15-minütige Zentrifugation (13.000 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert (13.000 x g, 4°C). Abschließend wurde das Pellet 10 min an der Luft getrocknet und in der entsprechenden Menge dH₂O aufgenommen.

2.2.6.9 Elektrophoretische Trennung von DNA in Agarose-Gelen

Zu analytischen und zu präparativen Zwecken erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von DNA. Die 1 %igen Agarose-Gele wurden mit 6 µl einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lösung versetzt und die Elektrophorese bei 100 V in horizontalen Flachgelapparaturen (PowerPac Basic™ BioRad) durchgeführt. Hierzu wurden die DNA-Proben mit 6 x

Probenpuffer beschwert und als Marker-DNA ein 1 kb Marker verwendet, der die Größenbestimmung der DNA-Fragmente zulässt.

2.2.6.10 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden aus Agarose-Gelen unter Verwendung des mi-Gel Extraction Kit (metaBion) isoliert. Nach erfolgreicher elektrophoretischer Auftrennung wurde das jeweilige DNA-Fragment durch Ausschneiden des entsprechenden Gelstücks isoliert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung wurde entsprechend der Angaben des Herstellers vollzogen.

2.2.6.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

DNA-Konzentrationen können photometrisch ermittelt werden, da diese in Lösungen proportional zu der von ihr absorbierten UV-Strahlung sind. Eine Absorption von 1,0 bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm entspricht hierbei einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Der Absorptions-Quotient bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) liegt bei reiner oder geringfügig verunreinigter DNA-Lösung zwischen 1,8 und 2,0. Ein niedrigerer Quotient ist ein Hinweis für Protein-Verunreinigungen. Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm wurden zur Absorptionsmessung verwendet. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe folgender Formel in $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ bestimmt.

$$\frac{\text{Extinktion} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor 50 (Faktor 40 bei RNA)}}{1.000}$$

Durch die Verwendung von Ethidiumbromid, welches zwischen die Basen doppelsträngiger DNA interkaliert, fluoreszierte die DNA in den Agarose-Gelen bei Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm). Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Konzentration der einzelnen DNA-Fragmente. Dadurch kann die DNA-Konzentration nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Vergleich mit DNA-Standards bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

2.2.6.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen von DNA-Proben erfolgte durch die Firma MWG/Eurofins (Ebersberg).

2.2.7 Molekularbiologische Klonierungsmethoden

2.2.7.1 Restriktion von DNA

Der DNA-Gehalt wurde in den Proben vor Beginn der Restriktion durch eine Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt. Die benötigten Restriktionsenzyme und zugehörigen Puffer wurden hinzugegeben und mit dH₂O auf entsprechend notwendige Pufferkonzentrationen eingestellt. Der Ansatz wurde für 2 h bei der jeweils benötigten Temperatur inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.2.7.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei späteren Ligationen eine Religation verdauter DNA mit sich selbst oder gleichen DNA-Fragmenten zu verhindern, wurden durch eine alkalische Phosphatase die 5'-Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten hydrolysiert. Die Dephosphorylierung erhöht die Effizienz im Rahmen der Klonierung. Die alkalische Phosphatase wurde nach der Restriktion des Vektors hinzugefügt (1/50 Volumen) und bei 37°C für 2 h inkubiert. Die anschließende Reinigung des Reaktionsansatzes ist essentiell für die nachfolgende Ligation, da andernfalls die Phosphatgruppen der *Insert*-DNA ebenfalls hydrolysiert werden und eine Ligation somit ausbleibt.

2.2.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch eine Restriktionsendonuklease geschnittene DNA-Fragmente können mittels DNA-Ligasen zusammengefügt werden. Dabei wird die hydrolytisch gespaltene Phosphodiesterbrücke zwischen 3'-OH und 5'-Phosphatgruppe wieder geschlossen. Ein Gesamtvolumen von 10 µl wurde für die Ligationsansätze gewählt. Die restringierte und gereinigte *Insert*-DNA und auch die Vektor-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 - 5:1 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 15°C nach Zugabe von 1 µl Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase.

2.2.7.4 Klonierung von PCR-Produkten

Zur gerichteten Klonierung von PCR-Produkten wurde an den 5'-Enden der Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen angefügt. Um ihre optimale Aktivität zu entwickeln, benötigen die meisten Restriktionsendonukleasen neben der spezifischen Erkennungssequenz an den 5'-Enden weitere Basen. Die PCR-Fragmente wurden gereinigt und mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Nach erneuter Reinigung konnten die PCR-Produkte mit

Plasmiden ligiert werden, die mit den gleichen Enzymen geschnitten wurden. Anschließend erfolgte die Transformation des Ligationsansatzes in kompetente *E. coli*-Zellen.

2.2.7.5 Zwischenklonierung in pGEM-T-Vektor

Die Zwischenklonierung von PCR-Produkten erfolgte durch eine *blunt-end* Ligation in den pGEM-T-Vektor. Der Ligationsansatz wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt. Zur Selektion wurde der Ligationsansatz anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert, auf LB-AMP-Platten mit X-Gal (70 µl, 20 ng/ml in Dimethylformamid) und IPTG (70 µl, 100 mM) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Hierbei führte die IPTG-Zugabe zur Expression der auf dem Plasmid kodierten β-Galaktosidase (*lacZ*), welche das Substrat X-Gal umsetzt und zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonie führt. Diese blau/weiß Selektion wurde ermöglicht, da die MCS des Vektors innerhalb des *lacZ* Gens vorliegt.

2.2.7.6 Transformation von Bakterien

2.2.7.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine ÜK 1:100 in 100 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Falcongefäßen zentrifugiert (4.000 rpm, 10 min, 4°C) und das Bakterienpellet vorsichtig in 50 ml kalter 80 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde das Pellet nach erneuter Zentrifugation (4.000 rpm, 10 min, 4°C) vorsichtig in 6 ml kalter 100 mM CaCl₂-Lösung + 20 % Glycerol resuspendiert. Nach dem Aliquotieren war die Lagerung bei -80°C möglich.

2.2.7.6.2 Plasmidtransformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden einem Hitzeschock ausgesetzt, um nach Aufnahme der Fremd-DNA ihre Kompetenz zu verlieren und somit eine Kontamination mit unerwünschter DNA zu unterbinden. 100 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock für 1 min bei 42°C und ein Kälteschock für 1 min auf Eis folgten. 700 µl SOC-Medium wurden dem Transformationsansatz zugegeben, woraufhin eine Inkubation von 1 - 2 h bei 37°C und 140 rpm folgte. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 x g für 1 min pelletiert und 700 µl des Überstands abgenommen. Das Zellpellet wurde in den verbliebenen 100 µl Medium

resuspendiert, auf Agar-Platten mit dem entsprechend benötigten Antibiotikum ausgestrichen und ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.8 Biochemische Methoden

2.2.8.1 Proteinexpression

Die rekombinante Expression in *E. coli* (BL21(DE3)) erfolgte sowohl durch IPTG-Induktion als auch nach dem Prinzip der Autoinduktion.

2.2.8.1.1 Standard-Proteinexpression (IPTG-Induktion)

Eine LB-Amp ÜK von 3 - 5 ml wurde mit den transformierten Bakterienzellen angeimpft und ÜN bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1:100 Verdünnung der ÜK in die entsprechenden benötigten Volumina an LB-Amp Medium. Die Expressionskultur wurde bei 37°C und 120 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 inkubiert und daraufhin mit IPTG (0,5 mM) ÜN (18 h) induziert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufarbeitung der induzierten Expressionskultur (6.000 x g, 20 min, 4°C). Es wurde 1 ml des Überstands abgenommen, während das Zellpellet in 5 – 10 ml Lysispuffer aufgenommen wurde. Zum Zellaufschluss wurde jede Probe sechsmal sonifiziert (12 x 5 s mit 30 W), wobei Druckänderungen zum Zerreißen der Zellmembran führten. Abschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (6.000 x g, 40 min, 4°C) und das Zell-Lysat (Überstand), welches die rekombinant exprimierten Proteine enthielt, einer SDS-PAGE unterzogen. Das Zellpellet wurde in 200 µl 8 M Urea gelöst und ebenfalls analysiert.

2.2.8.1.2 Proteinexpression durch Autoinduktion

Eine weitere Methode zur rekombinanten Proteinexpression von T7 Polymerase enthaltenden Plasmiden stellte die Autoinduktion dar. Hierbei wechselten die Bakterien von einer Wachstumsphase (5 h, 37°C) schonend zur Proteinexpression notwendigen Induktionsphase (18 h, 20°C). Kennzeichnend für diese Methode ist das reduzierte Auftreten von *inclusion bodies* (Studier 2005). 3 - 5 ml LB-Amp Medium wurden mit den transformierten Bakterienzellen angeimpft und ÜN (37°C, 120 rpm) inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1:100 Verdünnung der ÜK in die entsprechend benötigten Volumina an LB-Amp Medium + Autoinduktionsmedium 1 & 2. Die Expressionskultur wurde für 5 h (37°C, 120 rpm) und daraufhin ÜN (18 h) bei RT schüttelnd (120 rpm) inkubiert. Die Autoinduktionsmedien enthielten Laktose, Glukose und Glycerol. Glukose wurde von den Bakterien in der Wachstumsphase verstoffwechselt. Anschließend wurde die Laktose aufgenommen, welche

wiederum die Expression der T7 Polymerase, und damit die Proteinexpression induzierte. Die anschließende Aufarbeitung der Proteinexpression erfolgte analog zur Standard-Expression.

2.2.8.2 Protein-Aufreinigung (GST-tag / His-tag)

Das gewonnene Zell-Lysat wurde in 10 – 15 ml Lysispuffer gelöst und anschließend an zuvor mit Lysispuffer gewaschene GSH-Agarose bzw. Ni-NTA-Agarose für 1 - 2 h bei 4°C bzw. RT gebunden. Mehrere Waschschriffe folgten, um ungebundene Proteine zu beseitigen (2.500 rpm, 5 min). Abschließend wurden die gebundenen Proteine von der Agarose-Matrix mit dem jeweiligen Elutionspuffer 6-mal eluiert (2.500 rpm, 1 min) und einer SDS-PAGE Analyse unterzogen.

2.2.8.3 Strep-tag Aufreinigung

Das Strep-tag System basiert auf der hoch selektiven Bindung des künstlich veränderten Streptavidin (Strep-Tactin) zum Strep-tag der Fusions-Proteine. Auf Grund der geringen Größe des Strep-tags beeinflusst dieser grundsätzlich nicht die biologische Aktivität des Fusions-Partners. Die Strep-Tactin Sepharose wurde mit 2 Säulen-Volumen Waschpuffer äquilibriert. Das Zell-Lysat wurde der Strep-Tactin Sepharose zugegeben und für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Säule 5-mal mit einfachem Säulen-Volumen Waschpuffer gewaschen und daraufhin 6-mal mit Elutionspuffer eluiert.

2.2.8.4 Bradford-assay

Zur Konzentrationsbestimmung der Gesamt-Proteinmenge in einer Probe wurde der Bradford-assay verwendet (Bradford 1976). Unter Verwendung einer Eichgerade mit bekannter Proteinkonzentration konnte damit die Gesamtmenge an Protein in der jeweiligen Probe bestimmt werden. Hierzu wurden 90 µl des entsprechenden Puffers der Probe mit 10 µl Probe und 1 ml Bradford-Reagenz für 10 min inkubiert. Der Leerwert setzte sich aus 100 µl des jeweiligen Puffers und 1 ml Bradford-Lösung zusammen.

2.2.8.5 TCA-Präzipitation von Proteinen

Zur Fällung von Proteinen mittels Trichloressigsäure (TCA) erfolgte zunächst die Fraktionierung von 10 ml einer Expressionskultur (2.000 x g, 5 - 10 min). 9 ml des Überstandes wurden anschließend abgenommen und mit 1 ml 50 %iger TCA-Lösung versetzt. Es folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Um die gefällten Proteine zu pelletieren, schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4°C und 15.000 x g an. Zum Entfernen der Trichloressigsäure wurde das Pellet mit 1 ml 80 %igem Aceton gewaschen und wiederum bei

4°C für 15 min und 15.000 x g zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 50 – 200 µl 2 x Gel-Ladepuffer resuspendiert, wobei ca. 15 µl Probe für eine SDS-PAGE mit anschließender Immunodetektion durch einen Western-Blot verwendet wurde.

2.2.8.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE diente der Trennung von Proteingemischen und der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen in einem diskontinuierlichen Gelsystem (Laemmli 1970). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer vertikalen Kammer (BioRad), wobei ein 5 %iges Sammelgel und ein 12,5 %iges Trenngel verwendet wurden. Zur Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE wurden die Proteine durch Inkubation bei 95°C (5 min) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und DTT denaturiert und daraufhin zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min). Eine Spannung von 80 V wurde nach dem Auftragen der Proben in die Geltaschen angelegt. Beim Erreichen der Bromphenolblaufront in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Nachdem die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Als Molekulargewichtsstandard dienten Marker im Molekulargewichtsbereich 10 – 170 kDa (Fermentas). Die anschließende Färbung der Proteine erfolgte durch eine kolloidale- oder Coomassie-Färbung.

2.2.8.7 Tricin-Disk-Elektrophorese

Die Tricin-Disk-Elektrophorese wurde nach Schagger und von Jagow (1987) durchgeführt. Diese Methode dient, ebenfalls wie die SDS-PAGE, zur Proteinauftrennung ihrer Größe entsprechend. Allerdings ließen sich hierbei besonders gut kleine Proteine separieren.

2.2.8.8 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.2.8.8.1 Kolloidale Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Zur Färbung der in der SDS-PAGE separierten Proteine wurde das Gel ÜN in der kolloidalen-Färbelösung geschwenkt. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Gels mit 20 % Methanol so lange, bis die blaugefärbten Proteinbanden deutlich gegen den Hintergrund erkennbar waren.

2.2.8.8.2 Färbung von Proteinen mit Coomassie-Brilliant-Blue in Polyacrylamidgelen

Die Färbung der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine erfolgte für 1 h in Coomassie-Färbelösung. Hierbei färbte der enthaltene Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue

unspezifisch alle Proteine. Das gefärbte Gel wurde anschließend zur Reduzierung der Hintergrundfärbung 2-mal je 30 min in Entfärberlösung geschwenkt.

2.2.8.9 Western-Blot Analyse

Diese Technik überführte gelelektrophoretisch getrennte Proteine aus dem SDS-Gel auf proteinbindende Nitrozellulosemembranen (Burnette 1981). Die auf der Membranoberfläche exponierten Proteine konnten daraufhin durch spezifische Antikörper immunologisch nachgewiesen werden. Zunächst wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel sowie die zuvor durch Methanol aktivierte Nitrozellulose-Membran in Protein-Transfer-Puffer getränkt. Das Trenngel und die Nitrozellulose-Membran wurden zwischen je vier *Whatman paper*, die ebenfalls in Protein-Transfer-Puffer getränkt wurden, aufeinander gelegt. Der elektrophoretische Protein-Transfer erfolgte bei 300 mA für 45 min.

2.2.8.9.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen nach „Western-Blotting“

Proteine, die auf Nitrozellulosemembranen immobilisiert wurden, konnten mit spezifischen Primärantikörpern und Enzym-konjugierten Sekundärantikörpern nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgte über den Substratumsatz des konjugierten Enzyms. Nach dem Proteintransfer wurde zur Blockierung freier Proteinbindestellen die Nitrozellulose-Membran mit 3 % BSA in 10 ml PBS über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde mit dem in TBS-T (TBS + 0,1 % Tween) + 0,3 % BSA verdünnten Primärantikörper (Tab. 9) für 1,5 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit TBS-T und einmaliges Waschen mit TBS für je 10 min entfernt. Die Inkubation mit dem in TBS-T + 0,3 % BSA verdünnten Sekundärantikörper (Tab. 9) erfolgte für 45 min. Drei 10-minütige Waschschrte mit TBS-T (2x) und TBS (1x) schlossen sich an.

Zur Detektion der rekombinant exprimierten Proteine erfolgte die Verwendung eines AP (alkalische Phosphatase)-konjugierten sekundären Antikörpers. Nachdem die Membran mit AP-Entwicklungslösung für 5 – 10 min unter Schwenken gewaschen wurde, erfolgte die Färbereaktion. Die Dephosphorylierung des BCIP/NBT Substrates führte hierbei zu einem violetten, unlöslichen Produkt auf der Blot-Membran. Nachdem die Signale deutlich erkennbar waren, wurde die Reaktion durch Waschen der Membran in dH₂O beendet.

2.2.9 Protein-Protein Interaktionsanalysen

2.2.9.1 In vitro Thioesterbildungs-assay

Zur Bestimmung einer Interaktion und der Aktivierung von Komponenten der Ufm1-Kaskade wurde ein Thioesterbildungs-*assay* durchgeführt. Hierzu wurden die Fusionsproteine GST-Uba5, GST-Uba5^{C250S}, GST-Ufm1 und GST-Ufm1^{G83A} rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend gegen den Thioester-*assay*-Puffer dialysiert. Thioesterbildungs Reaktionen beinhalteten neben dem Thioester-*assay*-Puffer 5 µg GST-Ufm1 bzw. GST-Ufm1^{G83A} und folgende Komponenten: 5 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 100 mM GSH, 15 µg GST-Uba5 bzw. GST-Uba5^{C250S}. Anschließend erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes für 1 h bei 25°C. Durch Zugabe von reduzierendem (100 mM DTT) und nicht reduzierendem SDS-haltigem Ladepuffer wurde die Reaktion durch eine 10-minütige Inkubation bei 37°C gestoppt. Die Analyse der Reaktionsansätze erfolgte durch eine SDS-PAGE mit anschließender kolloidaler-Färbung bzw. durch Immunodetektion.

2.2.9.2 Pull-down assay

Die *Pull-down* Analyse ist eine *in vitro* Methode zur Interaktionsbestimmung zwischen zwei oder mehreren Proteinen und basiert auf einer affinitätschromatographischen Aufreinigung. Hierbei ist die minimale Voraussetzung für eine *Pull-down* Interaktionsstudie die Verfügbarkeit von aufgereinigtem und mit einem *tag* fusionierten Protein (*bait*), welches zum Ergreifen des jeweiligen Bindungspartners (*prey*) genutzt wird. Eine Interaktionsstudie zwischen Uba5-Ufc1 erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch *Pull-down* Analysen. Aufgereinigtes, rekombinant exprimiertes Protein (30 µg) wurde dem Fusions-*tag* entsprechend an die jeweilige Säule gebunden und mit dem Zell-Lysat (200 µl) des anderen Proteins für 2 h inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der gebundenen Proteine. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt und einer Western-Blot Analyse mit anschließender Immunodetektion unterzogen.

2.2.9.3 Hefe-Zwei-Hybrid System

Eine *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsanalyse stellt das von Fields und Song (1989) entwickelte Hefe-Zwei-Hybrid System dar. Hierbei macht man sich die spezielle Struktur des *Gal4* Transkriptionsaktivator zu Nutze, welcher eine spezifische DNA-Sequenz (*upstream activation domain*, UAS) bindet und die Transkription in Anwesenheit von Galaktose aktiviert. Der Transkriptionsfaktor kann in seine DNA-aktivierende (AD)- und DNA-

bindende (BD)-Domäne separiert werden. Die Funktionalität als isolierte Teilfragmente ist weiterführend gegeben (Abb. 9). So konnten zur Protein-Interaktionsstudie die beiden Proteine jeweils mit einer der beiden Domänen fusioniert und in Hefe-Zellen kotransformiert werden. Sollte es zu einer Interaktion der beiden Proteine kommen, werden die AD- und BD-Domäne in räumliche Nähe gebracht. Daraufhin führt der komplettierte Transkriptionsaktivator zur Synthese eines Reportergens (Abb. 12). Im Rahmen unserer Untersuchungen handelte es sich bei dem Reportergen um den Auxotrophiemarker HIS3. Die Voraussetzung zur erfolgreichen Durchführung war die Translokation beider Fusionsproteine in den Zellkern (James *et al.* 1996, Fields und Song 1989).

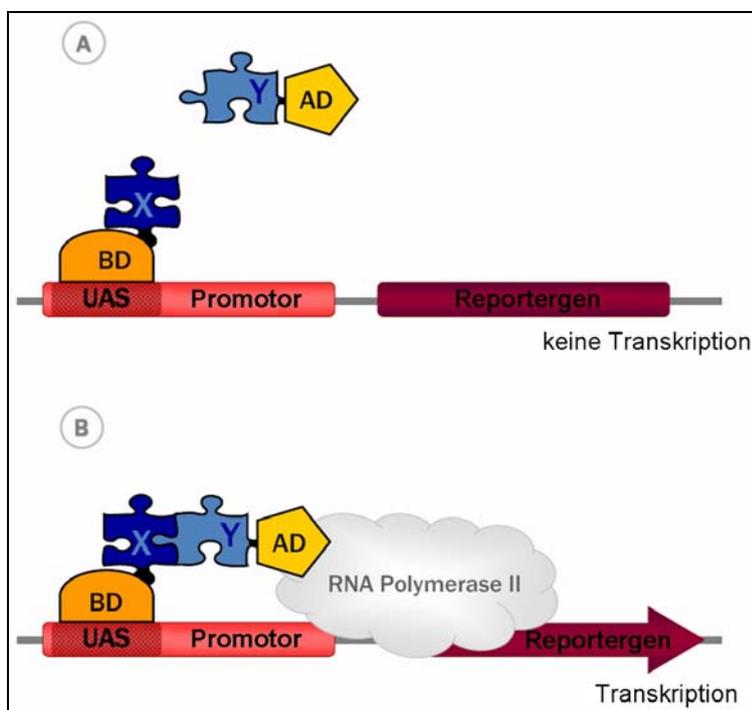


Abb. 12: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems.

(A) Zur Transkription wird eine Aktivierungsdomäne (AD) und DNA-Bindungsdomäne (BD) benötigt. Protein X wird mit BD fusioniert, während Protein Y mit AD gebunden vorliegt. Hierbei bindet das BD-Fusionsprotein an der *upstream activator sequence* (UAS) des Promotors. (B) Bei einer Interaktion von Protein X mit Protein Y wird der Transkriptionsfaktor vollständig wiederhergestellt, rekrutiert daraufhin die RNA Polymerase II und führt zur Transkription des Reportergens (Abb. verändert nach Bruckner *et al.* 2009).

2.2.9.3.1 Transformation von Hefen

Zur Interaktionsstudie wurden Protein X und Protein Y mit der jeweiligen AD oder BD Fusion in Hefe-Zellen des Stammes pJ69-4A oder SMY3 kotransformiert. Transformanten wurden auf Minimal-Medium ohne die As Tryptophan und Leucin selektiert (SD-LW).

Eine ÜK wurde in 4,5 ml YPD-Medium und 0,5 ml Glukose (20 %) angeimpft (200 rpm, 30°C). Die OD₆₀₀ wurde am folgenden Tag bestimmt und sollte zwischen 0,5 und 2 liegen.

Daraufhin wurden $2,5 \cdot 10^8$ Zellen in 50 ml warmes (30°C) YPD-Medium überführt und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,2 angezogen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (5.000 x g, 5 min, 10°C) der Zellsuspension, und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 20 ml Glukose (2 %) resuspendiert, zentrifugiert (5.000 x g, 5 min, 10°C) und der Überstand erneut verworfen. Die Resuspendierung der Zellen erfolgte in 1 ml 2 %iger Glukose-Lösung mit anschließender Zentrifugation (13.000 rpm, 30 s). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 0,5 ml LiAc (100 mM) aufgenommen. Zur Erholung wurde der Reaktionsansatz für mindestens 15 min im Wasserbad (30°C) inkubiert. Während dieser Erholungsphase wurde der Transformationsansatz vorbereitet. Dieser setzte sich aus 240 µl 50 %iger PEG-Lösung, 36 µl 10x LiAc (1 M), 50 µl ssDNA (1 mg/ml, 5 min, 95°C) und der jeweils zu berechnenden Menge an dH₂O und zu transformierender DNA zusammen. 600 ng wurden je DNA-Konstrukt eingesetzt und dem Transformationsansatz zugegeben. Die Zellsuspension wurde nach der 15-minütigen Erholungsphase im Wasserbad in 50 µl Schritten in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und zentrifugiert (13.000 rpm, 30 s). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit dem jeweiligen Transformationsansatz resuspendiert. Eine Inkubation von 30 min im Wasserbad (30°C) folgte. Anschließend wurde der Hitzeschock für 20 min bei 42°C im Wasserbad durchgeführt. Daraufhin wurde der Transformationsansatz abzentrifugiert (13.000 rpm, 30 s) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 150 µl Glukose-Lösung (2 %) resuspendiert, auf SD-LW Platten ausgestrichen und 3 – 4 Tage bei 25°C bzw. 30°C inkubiert.

2.2.9.3.2 Interaktionsstudie unter Verwendung des HIS3 Reportergens (Tropftest)

Cotransformierte Hefen wurden ÜN in SD-LW-Medium hochgezogen (200 rpm, 30°C), anschließend photometrisch (OD_{600}) bestimmt und mit steriler 2 %iger Glukose-Lösung auf 1 eingestellt. Daraufhin wurden 10 µl einer Verdünnungsreihe (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4}) auf SD-LW Platten und SD-LW Platten mit der entsprechenden 3-Aminotriazolkonzentration ausgetropft. Das Wachstum der cotransformierten Hefen kann auf diesen Mangelplatten nur bei einer Protein-Protein Interaktion erfolgen. Zur Einstufung der Interaktionsstärke wurde das Hefewachstum mit Positivkontrollen verglichen. Dabei dienten zum einen die schwache Interaktion zwischen CBL (*Calcineurin B-like*) und CIPK (CBL-interagierende Protein-Kinase), zum anderen die starke Interaktion zwischen AKT1 (Protein Kinase B) und CIPK als Positivkontrollen (Batistic und Kudla 2004, Li *et al.* 2006). Die Transformation der leeren Hefe-Zwei-Hybrid Vektoren AD und BD bildete die Negativkontrolle. Da das Hefe-Zwei-Hybrid System auf der Wiederherstellung eines funktionellen Transkriptionsfaktors basiert

und ungefähr 5% aller Proteine eine latente Aktivierungsaktivität zeigen (Van Crielinge und Beyaert 1999), müssen Transaktivierungskontrollen mitgeführt werden. Hierzu wurden die entsprechenden Konstrukte (AD bzw. BD) jeweils mit dem leeren AD- bzw. BD-Vektor cotransformiert. Ausbleibendes Wachstum auf SD-Leu-Trp-His + 3-AT Platten weist auf keine Transaktivierung hin. Die Inkubation der Hefepplatten erfolgte bei zwei verschiedenen Temperaturen (25°C & 30°C), um zum einen optimale Bedingungen für das Wachstum der Hefe, und zum anderen einen Kompromiss aus Kultivierungstemperatur von *C. elegans* und Hefewachstum zu schaffen. In diesem Fall sollte der Einfluss von Wärme auf mögliche hitzesensitive Fusionsproteine in den Interaktionsanalysen minimiert werden. Die Inkubationstemperatur zeigte keinen Einfluss auf die Resultate der Hefe-Zwei-Hybrid Analyse. Folglich sind lediglich die Untersuchungen bei einer Inkubationstemperatur von 30°C über einen Zeitraum von 3 – 5 Tagen dargestellt.

2.2.9.4 DCLA (Different Cytolocalization Assay)

Eine von Andrew Fire entwickelte Methode für *in vivo* Interaktionsstudien in *C. elegans* stellt der DCLA dar (Blanchard *et al.* 2006). Protein-Protein Interaktion können visuell im Cytosol auf Grund einer Relokalisierung des GFP markierten „prey“-Proteins durch ein Membran gebundenes (MTLS) „bait“-Protein charakterisiert werden. Hierzu erfolgt die Klonierung der entsprechenden Gene auf genomischer Ebene in den Vektor pPD122.36 (Abb. 11). Zur Interaktionsanalyse wurde Protein A mit GFP und Protein B mit einer Ankerdomäne (MTLS) fusioniert (Abb. 13). Als Grundvoraussetzung musste Protein A hierfür eine cytosolische Expressionslokalisierung aufweisen. Daher wurde Protein A-GFP als Kontrolle zunächst mikroinjiziert und das Expressionsmuster fluoreszenzmikroskopisch geprüft. Anschließend erfolgte die eigentliche Interaktionsstudie, indem Protein A und Protein B samt Fusions-tags in *C. elegans* co-injiziert wurden. Eine Interaktion wurde in der transgenen *C. elegans*-Linie auf Grund einer membrangebunden Lokalisationsänderung von Protein A durch Protein B dargestellt. Die starke Expression der Proteine erfolgte auf Grund des *myo3*-Promotors (pPD122.36) und war auf die Muskelzellen des Hautmuskelschlauchs von *C. elegans* begrenzt.

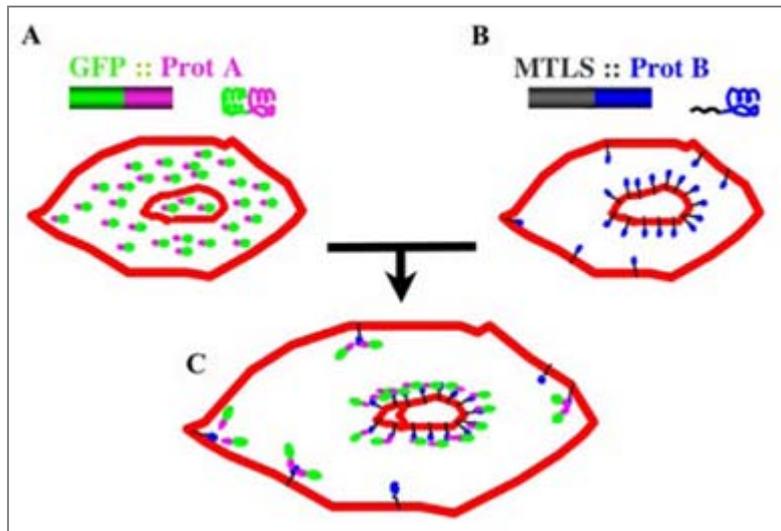


Abb. 13: Schematische Darstellung der DCLA-Analyse.

Die Regulation der Gen-Expression wird in diesem System durch den *myo3*-Promotor des Vektors pPD122.36 reguliert und weist damit eine Expression in den Muskelzellen des Hautmuskelschlauchs von *C. elegans* auf. (A) Protein A wird mit GFP fusioniert und muß eine cytosolische Lokalisation aufweisen. (B) Protein B wird mit einer Ankerdomäne (MTLS) fusioniert. (C) Die Fusionskonstrukte von Protein A und B werden durch Mikroinjektion in *C. elegans* eingebracht, wobei Protein A im Falle einer Protein-Protein Interaktion eine Relokalisierung an die Membran aufweist (Blanchard *et al.* 2006).

2.2.10 Probenvorbereitung für Transkriptom- und Proteom-Analysen

2.2.10.1 Microarray *C. elegans*

Expressionsunterschiede auf Transkriptomebene können durch Microarray-Analysen identifiziert werden. Hierzu werden auf einen Analyse Chip Gensonden (Oligonuklotidsequenzen) aufgebracht, die möglichst zu allen Genen des zu untersuchenden Organismus komplementär sind. Es wurde in dieser Arbeit der *C. elegans* (*V2*) *Gene Expression Microarray; 4x44K Microarrays* von Agilent verwendet und nach Herstellerangaben bei der Firma *Arrows Biomedical* durchgeführt. Diese Microarraychips deckten das gesamte *C. elegans* Genom durch 4 *slides* mit jeweils 44.000 Gensonden ab. Zur Probenvorbereitung wurden *C. elegans* Kulturen zunächst synchronisiert (*bleaching*) und unter Standardbedingungen bis zum Erreichen des adulten Stadiums kultiviert. Es erfolgte anschließend die Kultivierung unter Standardbedingungen bei leichtem Hitzestress (25°C) und unter ER-Stress (Tunicamycin 5 µg/ml). Daraufhin wurden die Würmer von den NGM-Platten gewaschen, lysiert und mittels Phenol/Chloroform-Extraktion die Gesamt-RNA isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA erfolgte durch ein Nanophotometer, während die Qualität der Gesamt-RNA unter Verwendung von *RNA Nano chips* durch den *Agilent 2100 Bioanalyzer* bestimmt wurde. Für die Untersuchungen wurde RNA mit einer RIN (*RNA Integrity Number*) > 9 verwendet. Die anschließende *cDNA* Synthese erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3) gelabelten Nukleotiden. Damit konnte der

Grad der *cDNA* Hybridisierung mit den Gensonden des Analyse Chips anhand der Fluoreszenzintensität quantifiziert werden. Eingesetzt wurden 1000 µg Gesamt-RNA, wobei die RNA nach Herstellerangaben (Agilent Technologies) mit dem *Quick Amt Labeling Kit, One-Color* fluoreszenz-markiert und mit dem *Gene Expression Hybridization Kit* hybridisiert wurde. Die Microarrays wurden nach Herstellerangaben gewaschen und mit dem *Array Scanner G250B* (Agilent Technologies) gescannt. Das Programm *Feature extraction* (Agilent Technologies) wurde zur Extraktion der Scan-Daten genutzt.

2.2.10.2 LC-MS Analyse von *uba5(ok3364)*

Expressionsunterschiede auf Proteinebene können durch die *liquid-chromatography* mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) quantifiziert werden. Zur Probenvorbereitung wurden *C. elegans* Kulturen zunächst synchronisiert (*bleaching*) und unter Standardbedingungen bis zum Erreichen des adulten Stadiums kultiviert. Anschließend wurden die Würmer mit M9-Puffer von den NGM-Platten gewaschen und durch Zentrifugation (4.500 x g, 1 min) von den Futterbakterien separiert. Der Überstand wurde verworfen, das Wurmpellet in 3 x Volumen Lyse-Puffer resuspendiert und mit einem Pistil 5 min homogenisiert. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation der lysierten Würmer bei 10.000 x g für 20 min bei 4°C. Die Proteine im Überstand wurden anschließend durch TCA-Fällung präzipitiert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz photometrisch bestimmt. Das aufgereinigte Proteingemisch wurde durch eine Agilent Kapillar C₁₈ Chromatographiesäule aufgetrennt und mittels Massenspektrometrie analysiert. Expressionsunterschiede mit dem Faktor von 1,2 konnten aus den Rohdaten ermittelt werden. Die Vorbereitung der Proben, der LC-MS Lauf und die Auswertung der Rohdaten wurden in der Proteomic AG des IFG (Integrierte Funktionelle Genomik) unter der Leitung von Dr. Simone König durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktionsanalysen

3.1.1 Rekombinante Expression von Ufm1, Uba5 und Ufc1 in *E. coli*

Zur *in vitro* Interaktionsanalyse wurden gereiftes Ufm1 (*matUfm1*, Glycin-Rest liegt C-terminal exponiert), Uba5 und Ufc1 in entsprechende Plasmide eingebracht und anschließend rekombinant in *E. coli* exprimiert. Hierzu wurden zunächst die kodierenden Sequenzen von Ufm1 und Uba5 in pGEX-4T2 kloniert und somit N-terminal mit einem GST-*tag* fusioniert. Die erfolgreiche Generierung der Konstrukte wurde sowohl über Restriktionsanalysen gelelektrophoretisch überprüft als auch durch Sequenzierung bestätigt. Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide und Vektorkarten sind Tab. 1 und Abb. 8 zu entnehmen. Die Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte mittels GSH-Agarose. Ufc1 wurde hingegen in pJC40 kloniert und damit N-terminal mit einem 6x His-*tag* fusioniert. Rekombinant exprimierte Proteine wurden anschließend durch Ni-NTA-Agarose aufgereinigt.

Die erzeugten Expressionskonstrukte wurden in *E. coli* XL1-Blue-Zellen generiert und anschließend in den *E. coli* Stamm BL21(DE3) transformiert. Zur rekombinanten Expression wurde die Methode der Auto-Induktion (Studier 2005) gewählt (siehe 2.2.8.1.2). Die exprimierten Proteine wurden über GSH-Agarose bzw. Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-Gel Analyse und anschließender Coomassie-Färbung überprüft (Abb. 14; A). Eine 70 kDa Protein-Bande in Spur 1 ist Uba5 + GST-*tag* (ca. 22 - 25 kDa) zuzuordnen. Des Weiteren wiesen die Elutionsfraktionen der Aufreinigung von Ufm1 + GST-*tag* (Abb. 14; A, Spur 2, 32 kDa) sowie Ufc1 + His-*tag* (Abb. 14; A, Spur 3, 24 kDa) das zu erwartende Molekulargewicht auf. Western-Blot Analysen konnten unter Verwendung von Anti-GST und Anti-His Antikörpern den Erfolg der Expression und Aufreinigung von Ufm1, Uba5 und Ufc1 bestätigen (Abb. 14; B).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine PCR-vermittelte Mutagenese der Expressionskonstrukte Ufm1-GST und Uba5-GST. Hierbei wurde zum einen der C-terminale Glycin Rest von Ufm1 gegen ein Alanin getauscht (Ufm1^{G83A}), während im aktiven Zentrum von Uba5 ein Cystein durch ein Serin ausgetauscht wurde (Uba5^{C250S}). Die rekombinante Expression sowie die Aufreinigung der beiden mutagenisierten Proteine wurde in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

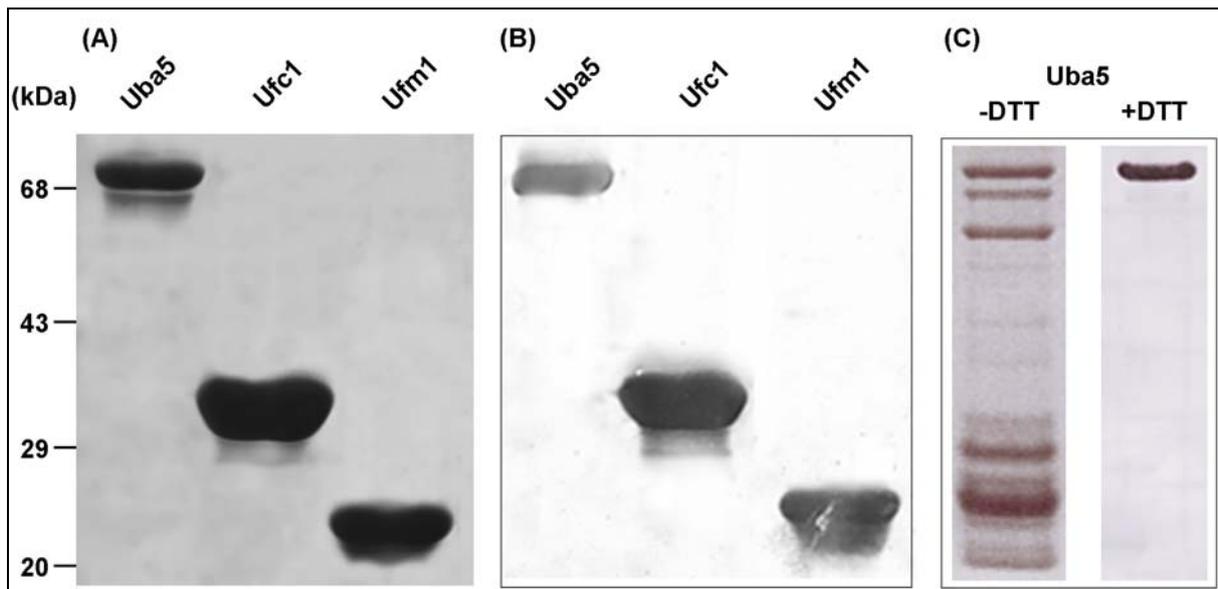


Abb. 14: Aufreinigung der rekombinanten Expression von Uba5 (+/- DTT), Ufc1 und Ufm1 mit GST- bzw. His-tag. (1)

(A) Coomassie-Färbung der Elutionsfraktionen von Uba5, Ufc1 und Ufm1. Es wurden 15 µl der Elutionsfraktionen mit 4 x Probenpuffer gemischt und anschließend auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen. (B) Western-Blot Analyse der Elutionsfraktion mit immunologischem Nachweis durch Verwendung von Anti-GST Antikörper für Uba5 und Ufm1 sowie Anti-His Antikörper für Ufc1. (C) Rekombinant exprimiertes Uba5 fusioniert mit GST-tag wurde in Lysispuffer ohne (-DTT) und mit DTT (Endkonzentration 5 mM) resuspendiert, an GSH-Agarose gebunden und nach mehreren Waschschritten eluiert.

Interessanterweise benötigte Uba5 die Zugabe von DTT im Lysis- und Waschpuffer, um zu einer distinkten Einzelbande mit einem MW von ca. 70 kDa zu führen (Abb. 14; C). Hingegen konnten ohne DTT-Zugabe viele Einzelbanden beobachtet werden, die Degradierungs- und Aggregationsprodukten zuzuordnen sind.

3.1.2 In vitro Interaktionsanalyse von Uba5 und Ufm1 mittels Thioesterbildungs-assay

Komatsu *et al.* (2004) identifizierte Uba5 als Ufm1-aktivierendes Enzym in HEK293 Zellen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte diese Aktivierung auch in *C. elegans* analysiert werden. *In vitro* Untersuchungen bezüglich der Aktivierung von Ufm1 durch Uba5 erfolgten durch einen Thioesterbildungs-assay (siehe 2.2.9.1). Mit GST-tag fusioniertes Uba5 und Ufm1 wurden hierfür rekombinant exprimiert, aufgereinigt und anschließend mit ATP, MgCl₂ und DTT inkubiert (Abb. 15). Diese Ansätze wurden unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen auf ein SDS-Gel geladen. Eine Proteinbande mit einer Größe von ca. 100 kDa konnte anschließend unter reduzierenden Bedingungen beobachtet werden (Abb. 15; Spur 3), welche dem berechneten MW des Intermediatkomplexes GST-Ufm1-Uba5-GST entspricht. Dieses Intermediat konnte nicht beobachtet werden, wenn das reduzierende Agens DTT fehlte (Abb. 15; Spur 4). Des Weiteren konnten die mutierten Proteine Uba5^{C250S}

(aktives Zentrum funktionslos) und Ufm1^{G83A} (C-terminaler Glycin Rest getauscht) kein Intermediat sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen bilden (Abb. 15; Spur 5 & 6).

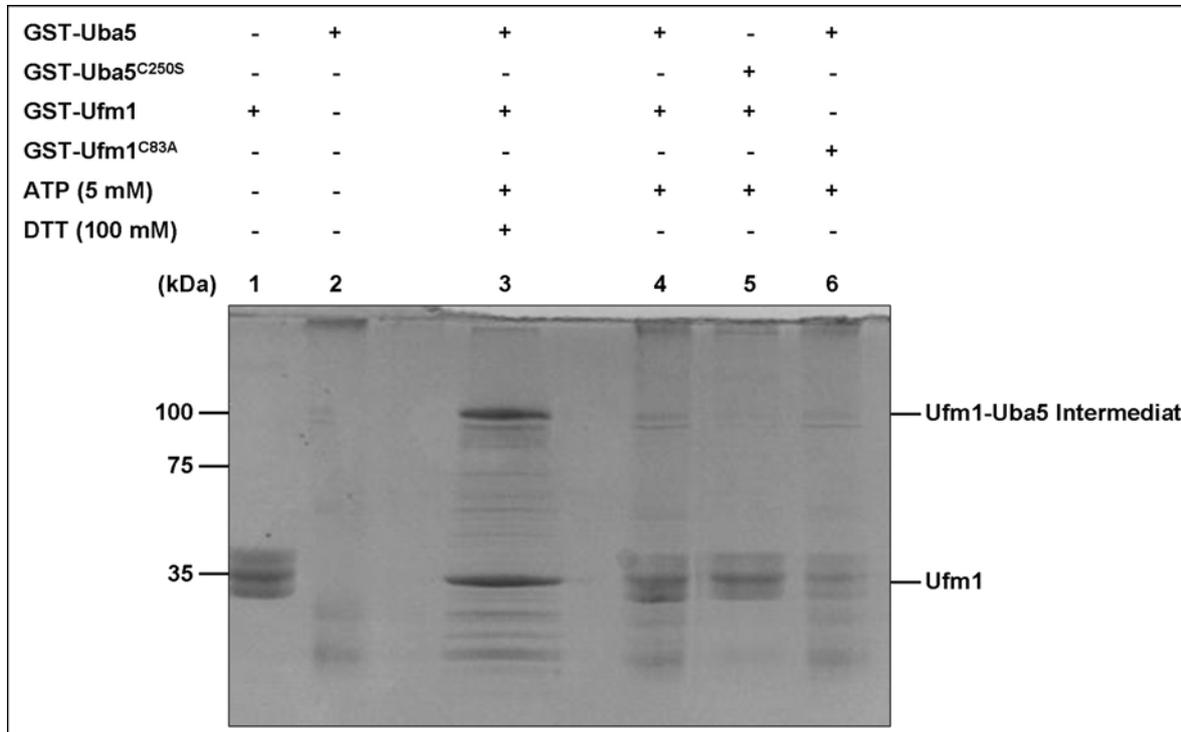


Abb. 15: *In vitro* Thioesterbildungs-assay von Ufm1 und Uba5. (1)

GST-Ufm1 (5 µg) (Spuren 1, 3, 4 und 5) wurde für 1 h bei 25°C mit folgenden Komponenten inkubiert: 15 µg GST-Uba5 (Spuren 2, 3, 4 und 6), 15 µg GST-Uba5^{C250S} (Spur 5) und 5 mM ATP (Spuren 3 - 6). Der Reaktionsansatz in Spur 6 wurde wie in Spur 4 angesetzt, wobei GST-Ufm1^{G83A} anstatt von GST-Ufm1 genutzt wurde. Die Reaktionsansätze wurden anschließend zum einen mit SDS-Probenpuffer ohne reduzierende Agenzien (Spuren 1 - 2 und 4 - 6), sowie mit 100 mM DTT (Spur 3), inkubiert. Die Zugabe bzw. das Fehlen der verschiedenen Komponenten ist oberhalb des SDS-Gels dargestellt. Die Proteinbanden, welche dem Intermediat GST-Uba5-Ufm1-GST und GST-Ufm1 zuzuordnen sind, wurden rechts markiert. Die Proben wurden auf ein 12,5 %iges SDS-Gel geladen und anschließend mit kolloidaler Färbelösung gefärbt.

Zur Bestätigung, dass es sich bei der 100 kDa Proteinbande tatsächlich um den Komplex Ufm1 und Uba5 handelt, wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und mittels MS/MS analysiert. Es konnten alle Komponenten identifiziert werden (Abb. 16).

```

>gi|121697|sp|P08515|GST26_SCHJA Glutathione S-transferase class-mu
26 kDa isozyme (GST 26) (Sj26 antigen) (SjGST)
MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQS
MAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDR
LCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQ
GWQATFGGGDHPPK

>gi|466160|sp|P34661|UFM1_CAEEL Probable ubiquitin-fold modifier 1
precursor
MSGGTAATTAGSKVTFKITLTSDPKLPFKVLSVPESTPFTAVLKFAAEFEKVPAAATSAIITNDGVGVN
PAQPAGNIFLKHGSELRLIPRDRVGH

>uba
MSDEQIDKLVSRDLGALNRLGNVKKDHPLESSSNSKPTHQPKSPAPYRQKIEKLSAEVVDSNPYSRLM
ALQRMGIVNEYERIREKTVAVVGVGGVGSVVAEMLTRCGIGKLI LFDYDKVEIANMNRLFYQPNQAGL
SKVEAARDTLIHVNPDVQIEVHNFNITMDNFDTFVNRIRKGSSLTDGKIDLVLSCVDNFEARMAVNMA
CNEENQIWMESGVSENAVSGHIQYIEPGKTACFACVPLVVASGIDERTLKRDGVCAASLPTTMAVVA
GFLVMNTLKYLLNFGEVSQYVGYNALSDFPFRDSIKPNPYCDDSHCLQRQKEYEEKVANQPVDLEVEV
PEEETVVHEDNEWGIELVNESEPSAEQSSSLNAGTGLKFAYEPIKRDAQTELSPAQAATHDFMKSIKD
KLVEEAQNKGK

```

Abb. 16: Proteinidentifizierung der 100 kDa Proteinbande durch MS/MS Analyse. (1)

Die Bande wurde aus dem Gel geschnitten mit Trypsin verdaut, und anschließend erfolgte die Analyse der resultierenden Peptide mittels eines MS/MS-Systems der AG Hippler (IBBP, Uni-Münster). Die unterstrichenen Peptide wurden durch MS/MS identifiziert.

Zur weiteren Intermediatsbestätigung erfolgte die Western-Blot Analyse eines erneut durchgeführten Thioesterbildungs-*assays* (Abb. 17) unter Verwendung des selbst hergestellten *C. elegans* Anti-Ufm1-Antikörpers (siehe Masterarbeit Sareetha Kailayangiri). Der Versuchsaufbau wurde wie bereits beschrieben mit GST-Uba5 und GST-Ufm1 durchgeführt. Eine Intermediatbildung (100 kDa) war erneut zu beobachten (Abb. 17). Die direkte Zugabe von DTT während der Inkubation (Spur 3) oder wenn DTT im SDS-Probenpuffer vorlag (Spur 4), führte ebenso zur Intermediatsbildung wie auch die Zugabe von GSH (Spur 5). Unter Verwendung der beiden Proteinmutanten Uba5^{C250S} und Ufm1^{G83A} konnte keine Komplexbildung ermittelt werden (Abb. 17; Spur 6 & 7).

Zusammengefasst ergeben die *in vitro* Analysen, dass die Komplexbildung zwischen Uba5 und Ufm1 durch das Cystein an Position 250 von Uba5 und dem C-terminalen Glycin-Rest von Ufm1 nur unter reduzierenden Bedingungen (DTT/GSH) erfolgt. Uba5 stellt somit das aktivierende Enzym von Ufm1 in *C. elegans* dar.

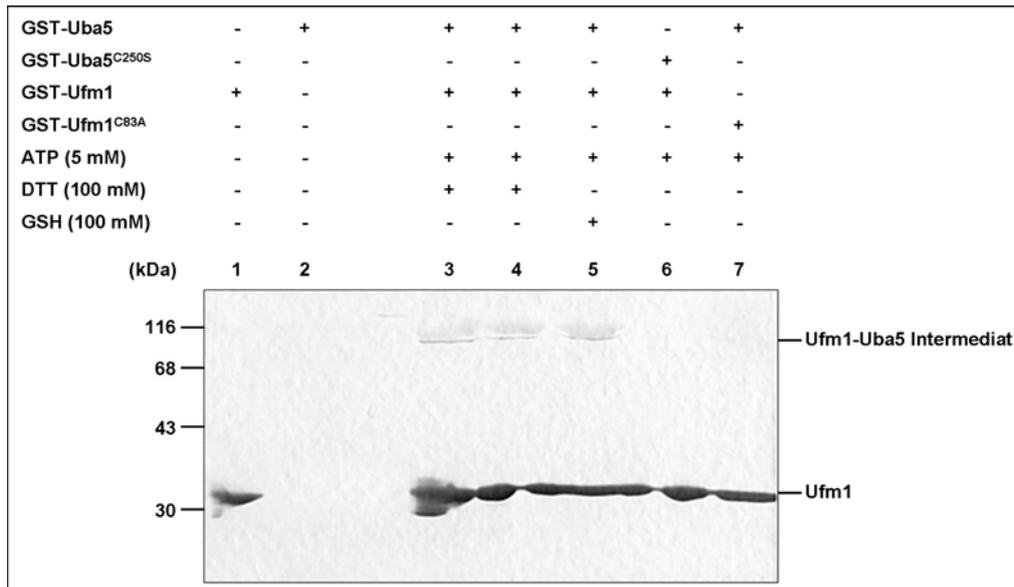


Abb. 17: Western-Blot Analyse des *in vitro* Thioesterbildungs-assay von Ufm1 durch Uba5. (1) GST-Ufm1 (5 µg) wurde mit 15 µg GST-Uba5 (Spuren 2, 3, 4, 5 und 7), 15 µg GST-Uba5^{C250S} (Spur 6), 5 µg GST-Ufm1^{G83A} (Spur 7), 5 mM ATP (Spuren 3 - 7), 100 mM DTT (Spur 3 und 4) und 100 mM GSH (Spur 5) für 1 h bei 25°C inkubiert. Die Zugabe von SDS-Probenpuffer ohne reduzierende Agenzien (Spuren 1 - 3 und 5 - 7) bzw. das Hinzufügen von 100 mM DTT (Spur 4) beendete die Reaktion. Die Proben wurden durch ein 12,5 %iges SDS-Gel separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mittels eines Anti-Ufm1 Antikörpers. Die Zugabe bzw. das Fehlen der verschiedenen Komponenten ist oberhalb des SDS-Gels dargestellt. Entsprechende Proteinbanden, welche dem Intermediat GST-Uba5-Ufm1-GST und GST-Ufm1 zuzuordnen sind, wurden rechts markiert.

3.1.3 *In vitro* Interaktionsstudien zwischen Uba5 und Ufc1 (Pull-down Analyse)

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Uba5 und Ufc1 wurde zunächst ein GST-tag *Pull-down assay* durchgeführt. Allerdings konnte dabei eine Bindung von Ufc1-His an die Negativkontrolle (GST-tag) ohne Uba5 ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Alternativ wurde daher zum GST-tag *Pull-down assay* ein His-tag *Pull-down assay* zur Interaktionsanalyse gewählt (Abb. 18). Rekombinant exprimiertes His-Ufc1 wurde zunächst auf Ni-NTA-Agarose geladen. In Spur 1 (Abb. 18; A) konnte kein Ufc1-Protein im Durchlauf nachgewiesen werden. Somit ist anzunehmen, dass Ufc1 an der Agarose gebunden vorliegt. Die Agarose wurde anschließend mehrfach gewaschen, wobei der Durchlauf wiederum gesammelt wurde (Abb. 18; A, Spur 2). Kein freies Ufc1 ist in der Waschfraktion zu sehen. Anschließend wurde Zell-Lysat (GST-Uba5) der mit Ufc1 beladenen Ni-NTA-Agarose zugegeben. Im Durchlauf (Abb. 18; A, Spur 3) konnte eine schwache Bande, welche GST-Uba5 entspricht, beobachtet werden. Waschschrte folgten und die an der Agarose gebundenen Proteine konnten eluiert werden. Die gesammelten Waschschrte zeigen wie zu erwarten kein freies Fusions-Protein (Abb. 18; A, Spur 4). Die Elutionsfraktion in Spur 6 (Abb. 18; A) weist nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf eine Interaktion zwischen

Uba5 (70 kDa) und Ufc1 (24 kDa) hin. Um auszuschließen, dass GST-Uba5 eine Affinität zur Ni-NTA-Agarose selbst besitzt, wurde GST-Uba5 an die Agarose geladen und anschließend eluiert (Abb. 18; A). Hierbei wurde keine Bindung von sowohl Uba5 als auch GST-Uba5 Fusionsprotein an die Ni-NTA-Agarose beobachtet. Western-Blot Analysen zeigten bei 70 kDa mit Anti-GST Antikörper (Abb. 18; B, Spur 6) und 24 kDa mit Anti-His Antikörper (Abb. 18; C, Spur 6) Banden und bestätigen somit die Interaktion zwischen Uba5 und Ufc1 *in vitro*.

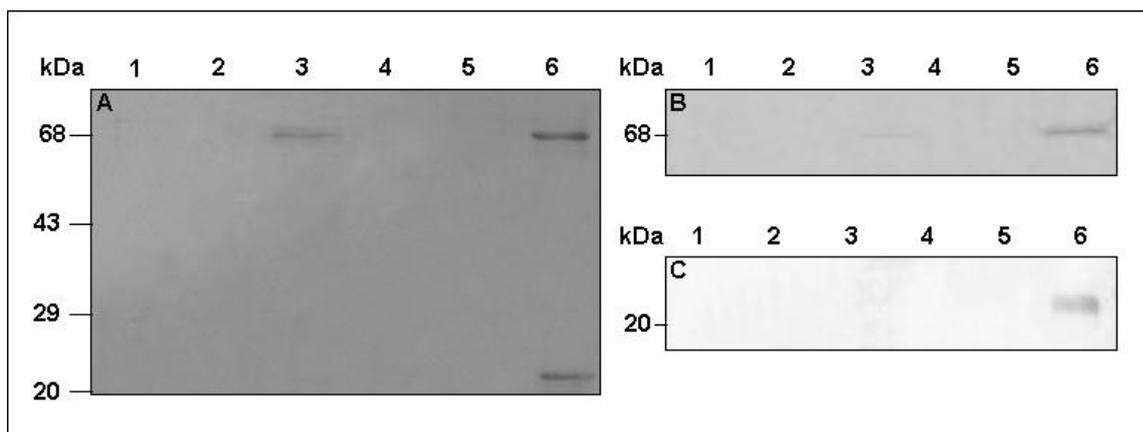


Abb. 18: His-tag Pull-down Analyse von Uba5 und Ufc1. (1)

His-Ufc1 wurde an Ni-NTA-Agarose immobilisiert und anschließend mit GST-Uba5 Zell-Lysat inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde der Komplex von der Matrix eluiert. **(A) SDS-PAGE Analyse.** Die Proben wurden auf einem 12,5 %igem SDS-Gel separiert und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt. Spur 1: Durchlauf von Ufc1 geladen auf Ni-NTA-Agarose. Spur 2: Durchlauf der Waschschritte. Spur 3: Durchlauf der Uba5 Beladung. Spur 4: Durchlauf der Waschschritte. Spur 5 (Kontrolle): Elution von Uba5 von der Ni-NTA-Agarose. Spur 6: Elution des Komplexes Uba5 und Ufc1. **(B/C) Western-Blot Analyse des His-tag Pull-down assay.** Nach der Auftrennung der Proben durch ein 12,5 %iges SDS-Gel wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. His-tag markierte Proteine wurden unter Verwendung eines Anti-His Antikörpers **(C)** identifiziert, während GST-tag markierte Proteine mittels Anti-GST Antikörper **(B)** detektiert wurden. Spur 1: Durchlauf von Ufc1 gebunden an Ni-NTA-Agarose. Spur 2: Probe der Waschfraktion. Spur 3: Durchlauf nach Bindung von Uba5 an Ni-NTA-Agarose. Spur 4: Waschfraktion. Spur 5 (Kontrolle): Elution von Uba5 geladen an Ni-NTA-Agarose. Spur 6: Elution des Komplexes.

Die zusätzliche Durchführung eines Strep-tag Pull-down assays mit den rekombinant exprimierten Proteinen Uba5 (Strep-tag; pASK-IBA3plus) und Ufc1 (His-tag; pJC40) bestätigten die Interaktionsergebnisse der His-tag Pull-down Analyse zwischen Uba5 und Ufc1 *in vitro*. Hierbei lässt das Coomassie-Brilliant-Blue gefärbte Gel (Abb. 19) zwei Banden in der Elutionsfraktion des Komplexes (Spur 6) mit ca. 50 kDa (Uba5) und 24 kDa (Ufc1) erkennen.

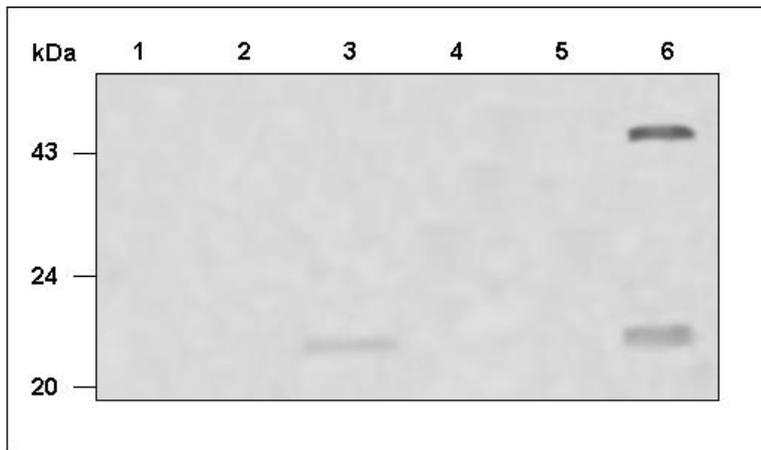


Abb. 19: SDS-PAGE des Strep-tag Pull-down assay. (1)

Uba5 wurde mit Strep-tag fusioniert, rekombinant exprimiert und auf Strep-Tactin Sepharose geladen, anschließend mehrmals gewaschen und mit Ufc1 Zell-Lysat inkubiert. Die Proben wurden auf ein 12,5 %iges SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Spur 1: Durchlauf von Uba5 geladen an Strep-Tactin Sepharose. Spur 2: Durchlauf der Waschschrte. Spur 3: Durchlauf nach Bindung von Ufc1 an Strep-Tactin Sepharose. Spur 4: Durchlauf der Waschfraktionen. Spur 5 (Kontrolle): Elution von Ufc1 beladen an Strep-Tacin Sepharose. Spur 6: Elution des Komplexes Uba5 und Ufc1.

Zusammenfassend bestätigen die *in vitro* Analysen die Interaktion von Uba5 und Ufc1 sowohl durch einen His-tag als auch durch einen Strep-tag Pull-down.

3.1.4 In vivo Interaktionsanalyse der Ufm1-Kaskade beteiligten Komponenten mittels Hefe-Zwei-Hybrid System

Zur *in vivo* Interaktionsanalyse der Ufm1-Kaskade und ihrer potentiellen Interaktionspartner erfolgte die Klonierung der kodierenden Sequenzen von UfSP2, Ufm1, Uba5, Ufc1, Ufl1, Ufbp1, CDK5Rap3, AAKB1 (*AMP-Activated Kinase Beta subunit 1*) und Kel-8 in die Vektoren pGAD.GH (AD) und pGBT9.BS (BD) des Hefe-Zwei-Hybrid Systems. Hierbei verwendete Oligonukleotide und Vektorkarten sind in Tab. 2 und Abb. 9 dargestellt. Restriktionsanalysen und Sequenzierungen der Firma MWG/Eurofins bestätigten die erfolgreiche Generierung der Konstrukte. Hefe-Zellen des Stammes pJ69-4A und SMY3 wurden zur anschließenden Cotransformation verwendet. Eine erfolgreiche Cotransformation wurde durch das Hefe-Wachstum auf Mangelplatten (SD-Platten ohne Leucin und Tryptophan; SD-Leu-Trp) geprüft.

3.1.4.1 UfSP2-Ufm1 & UfSP2- Kel8

AD-UfSP2::BD-Ufm1 und AD-Kel8::BD-UfSP2 wurden in den Hefestamm SMY3 cotransformiert und zeigten Wachstum auf SD-Leu-Trp-His + 3AT Platten. Kein Hefewachstum auf den Selektionsplatten konnte in umgekehrter Orientierung der

Interaktionsansätze, der Negativkontrolle wie auch in den entsprechenden Transaktivierungskontrollen beobachtet werden. Beide Positivkontrollen weisen ihrer Einstufung als schwache und starke Interaktionskontrolle entsprechendes Hefewachstum auf. Die Interaktionsanalyse von UfSP2-Ufm1 zeigt ein vergleichbares Hefewachstum zur starken Positivkontrolle, während der Ansatz Kel8-UfSP2 ein stärkeres Hefewachstum als die starke Positivkontrolle erkennen lässt (Abb. 20).

Die Ergebnisse deuten auf eine besonders starke Interaktion zwischen UfSP2-Ufm1 und Kel8-UfSP2 hin.

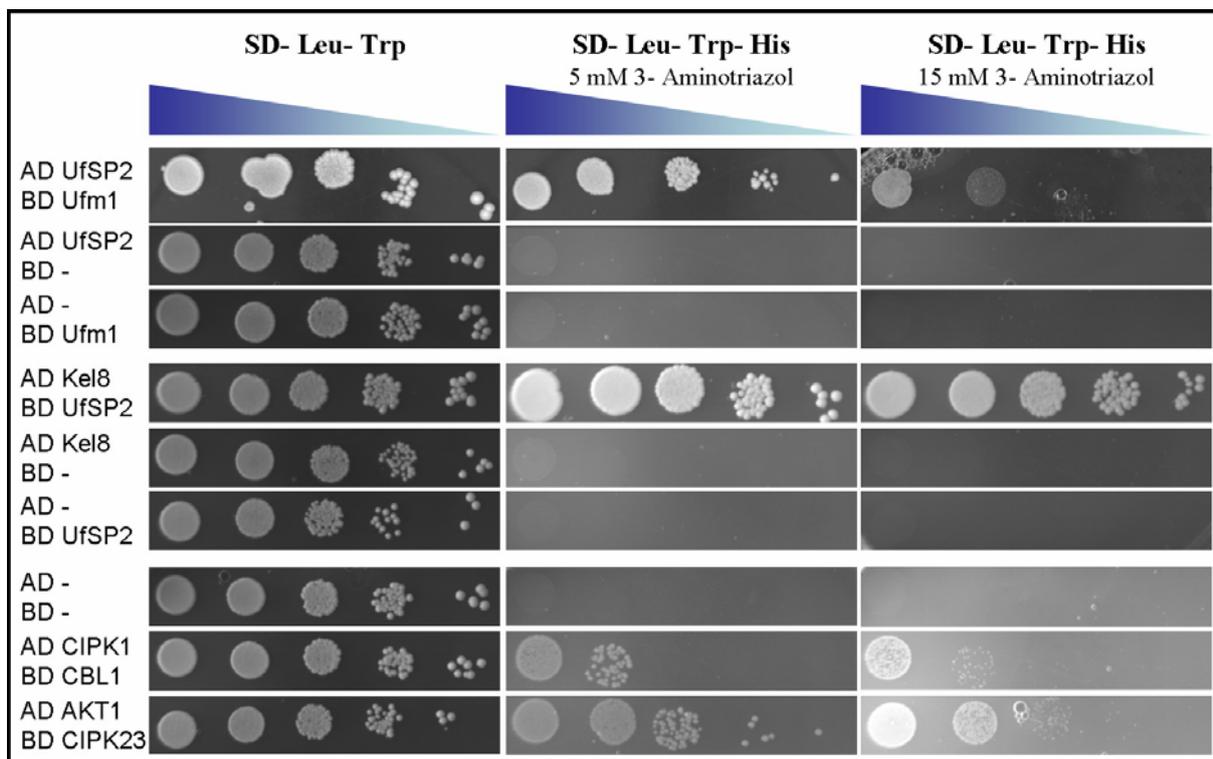


Abb. 20: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen UfSP2-Ufm1 und Kel8-UfSP2. (4) UfSP2, Ufm1 und Kel-8 wurden mit den entsprechenden Kontrollen in den Hefestamm SMY3 cotransformiert und in einer Verdünnungsreihe von links ($OD_{600} = 1$) nach rechts ($OD_{600} = 10^{-4}$) auf Selektionsplatten (5 – 15 mM 3-AT) ausplattiert. Bei einer Temperatur von 30°C erfolgte die Inkubation. Das Wachstum der Hefen auf Histidin-freiem Medium zeigt eine mögliche Protein-Protein-Interaktion an. Auf der linken Seite sind die Kombinationen der transformierten Konstrukte gelistet.

3.1.4.2 Ufm1-Ufl1 & Ufm1-Ufbp1

Nach Cotransformation der Hefen (SMY3) mit AD-Ufm1::BD-Ufl1 und AD-Ufbp1::BD-Ufm1 konnte Hefewachstum auf Selektionsplatten (SD-Leu-Trp-His + 3AT) beobachtet werden. Eine entgegengesetzte Orientierung der Interaktionsstudien wies kein Hefewachstum auf. Die Transaktivierungskontrollen zur Analyse der Interaktion zwischen Ufm1 und Ufl1 sowie die Negativ- als auch die schwache Positivkontrolle zeigten ein ähnliches

Hefewachstum untereinander auf Selektionsplatten. Hingegen verhält sich das Hefewachstum der starken Positivkontrolle (AD-AKT1::BD-CIPK23) vergleichbar zu der Interaktionsanalyse AD-Ufm1::BD-Ufl1. Weiterführend zeigten die Negativkontrolle wie auch die entsprechenden Transaktivierungskontrollen der Interaktionsanalyse zwischen BD-Ufm1 und AD-Ufbp1 kein Wachstum. Die verwendeten Positivkontrollen verhielten sich entsprechend ihrer Einstufung, während sich das Hefewachstum der starken Positivkontrolle zum Interaktionsansatz (AD-Ufbp1::BD-Ufm1) nahezu identisch verhielt (Abb. 21). Die Ergebnisse deuten auf eine starke Interaktion zwischen Ufm1-Ufl1 und Ufbp1-Ufm1 hin.

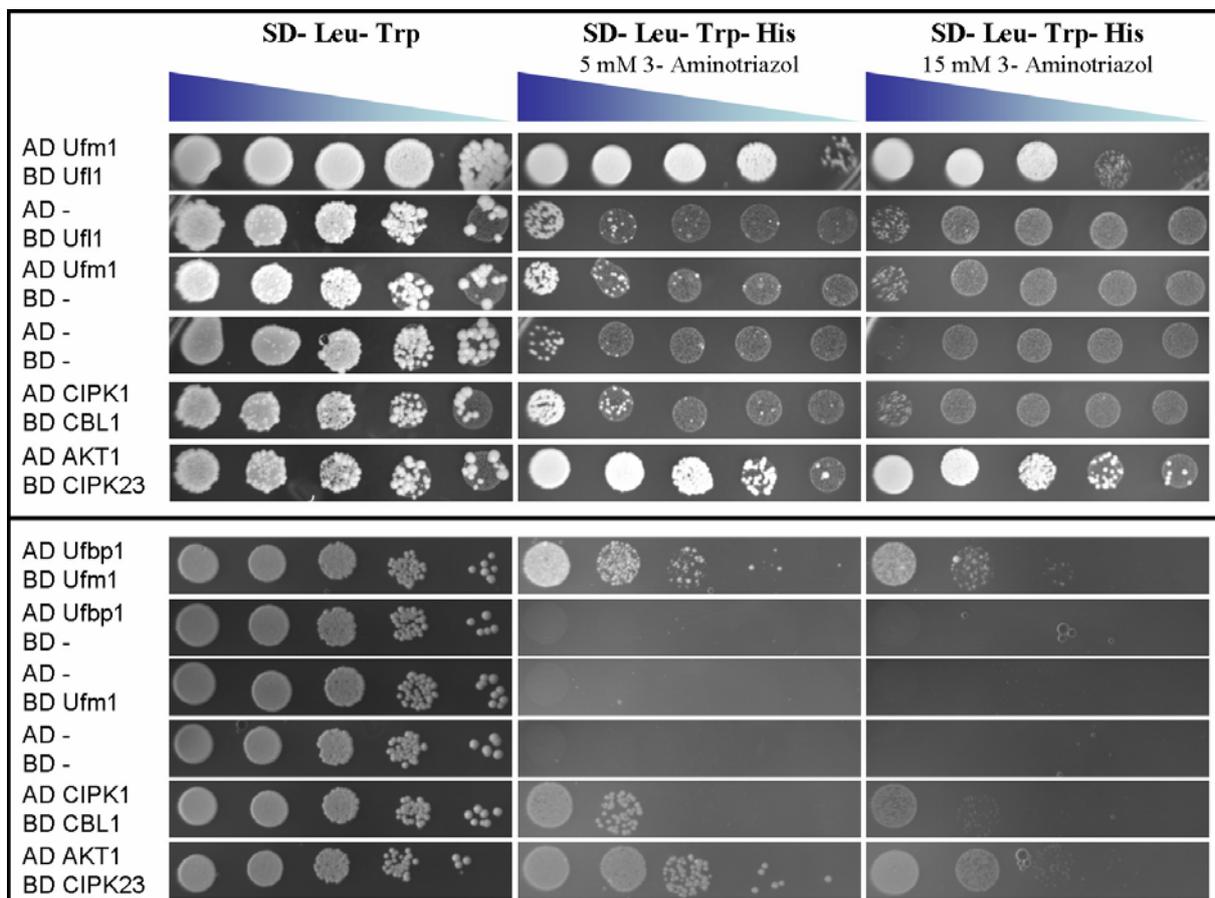


Abb. 21: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen Ufm1-Ufl1 und Ufbp1-Ufm1. (3, 5)

Ufm1, Ufl1 und Ufbp1 wurden mit den entsprechenden Kontrollen in den Hefestamm SMY3 cotransformiert und in einer Verdünnungsreihe von links ($OD_{600} = 1$) nach rechts ($OD_{600} = 10^{-4}$) auf Selektionsplatten getropft. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 30°C. Eine mögliche Protein-Protein-Interaktion wird durch das Wachstum der Hefen auf Histidin-freiem Medium angezeigt (5 – 15 mM 3-AT). Die Kombinationen der transformierten Konstrukte sind auf der linken Seite gelistet.

3.1.4.3 Uba5-Ufc1 & CDK5Rap3-AAKB1

Hefewachstum bis zu einer 3-AT Konzentration von 2,5 mM konnte auf den Selektionsplatten nach Cotransformation von AD-Uba5::BD-Ufc1 und AD-CDK5Rap3::BD-AAKB1 in den

Hefe-Stamm pJ69-4A beobachtet werden. Eine umgekehrte Orientierung bei der Interaktionsanalyse führte bei beiden Analysen zu keinem Hefewachstum. Die Negativkontrolle und die entsprechenden Transaktivierungskontrollen sind aufgeführt und zeigten kein Hefewachstum auf den Selektionsplatten. Die schwache Positivkontrolle CIPK1-CBL1 wies ein etwas geringeres Hefewachstum als die untersuchte Interaktionsanalyse Uba5-Ufc1 auf. Die Interaktion zwischen CDK5Rap3 und AAKB1 verhält sich im Vergleich zu der schwachen Positivkontrolle etwas schwächer (Abb. 22). Bei AAKB1 (AMP-Proteinkinase) handelt es sich um einen wichtiger Stresssensor, der bei einem hohen AMP:ATP-Verhältnis innerhalb der Zelle aktiviert wird und dem Schutz vor Energiemangel dient (Hardie 2003). Die Ergebnisse der Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchungen deuten auf eine schwache Interaktion zwischen Uba5 und Ufc1 und eine noch schwächere Interaktion zwischen CDK5Rap3 und AAKB1 hin.

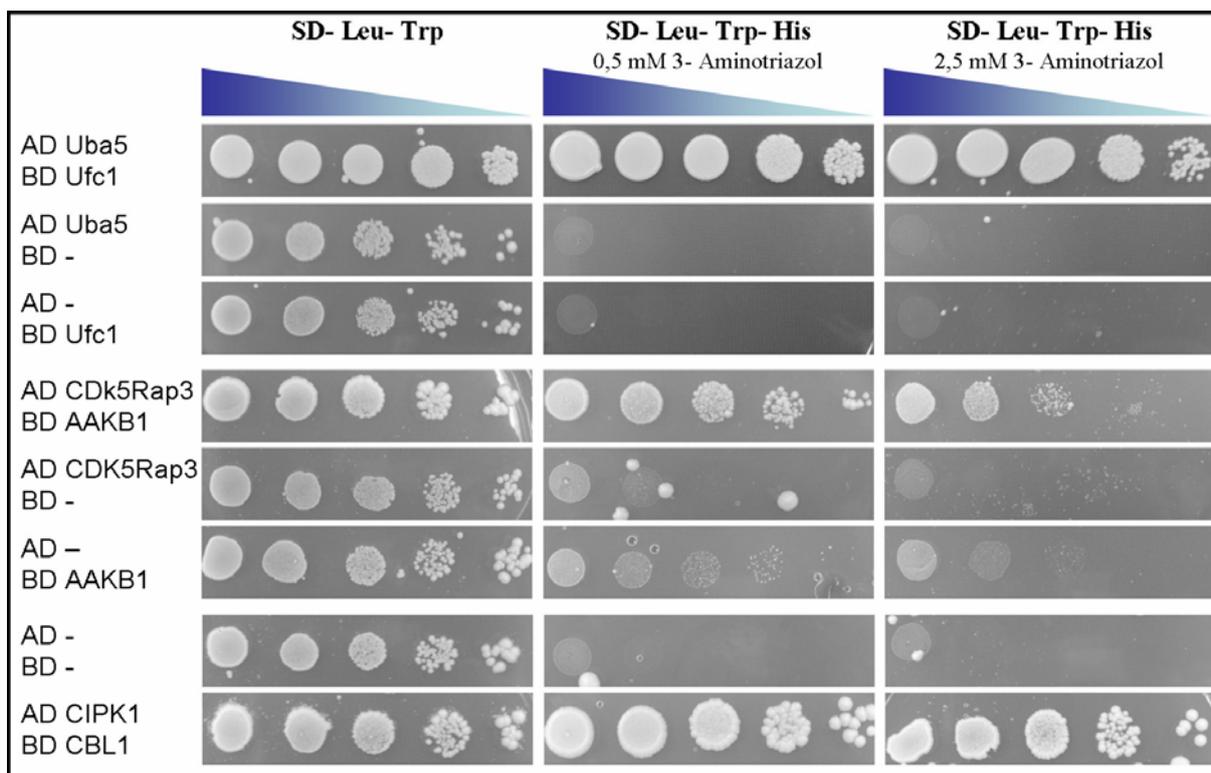


Abb. 22: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen Uba5-Ufc1 und CDK5Rap3-AAKB1. (2)

Cotransformation von Uba5, Ufc1, CDK5Rap3, AAKB1 und den entsprechenden Kontrollen in den Hefestamm pJ69-4A auf SD-Leu-Trp-, SD-Leu-Trp-His + 0,5 mM 3-AT- und SD-Leu-Trp-His + 2,5 mM 3-AT-Platten. In einer abfallenden Konzentration von links ($OD_{600} = 1$) nach rechts ($OD_{600} = 10^{-4}$) wurden die Hefen auf Selektionsplatten aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Eine mögliche Proteininteraktion wird durch das Wachstum der Hefen auf Histidin-freiem Medium angezeigt. Die transformierten Konstrukt-Kombinationen sind am linken Rand aufgeführt.

3.1.4.4 Ufl1-Ufbp1, Ufl1-CDK5Rap3 & Ufbp1-CDK5Rap3

Die Interaktionsanalyse von Ufl1-Ufbp1, Ufl1-CDK5Rap3 und Ufbp1-CDK5Rap3 erfolgte anhand des Hefewachstums nach Cotransformation in den Hefe-Stamm SMY3. Transaktivierungs-, Negativ- sowie Positivkontrollen wurden mitgeführt und sind ebenfalls in Abb. 23 dargestellt. Ufl1-Ufbp1 und Ufl1-CDK5Rap3 wiesen in beiden Orientierungen gleich starkes Hefewachstum auf den Selektionsplatten mit 3-AT auf. Die entsprechende Negativkontrolle und die Transaktivierungskontrollen zeigten ein geringes Wachstum auf Selektionsplatten.

Der Wachstumsvergleich der Interaktionsanalysen zu den verwendeten Positivkontrollen lässt eine starke Interaktion zwischen Ufl1-Ufbp1 und Ufl1-CDK5Rap3 annehmen. Hingegen zeigten sich Unterschiede im Hefewachstum des Ansatzes Ufbp1-CDK5Rap3 in beiden Orientierungen. So konnte starkes Wachstum von AD-Ufbp1::BD-CDK5Rap3 und schwaches Wachstum der cotransformierten Hefe AD-CDK5Rap3::BD-Ufbp1 auf den Selektionsplatten ermittelt werden. Hierbei zeigte die Transaktivierungskontrolle von Ufbp1 ein vergleichbares Wachstum wie AD-CDK5Rap3::BD-Ufbp1. Die restlichen Transaktivierungskontrollen sowie die Negativkontrolle wiesen ein geringes Hefewachstum auf.

Der Vergleich der Wachstumsstärke zwischen den Positivkontrollen zu dem Interaktionsansatz in der Orientierung AD-Ufbp1::BD-CDK5Rap3 lässt eine starke Interaktion zwischen Ufbp1 und CDK5Rap3 annehmen.

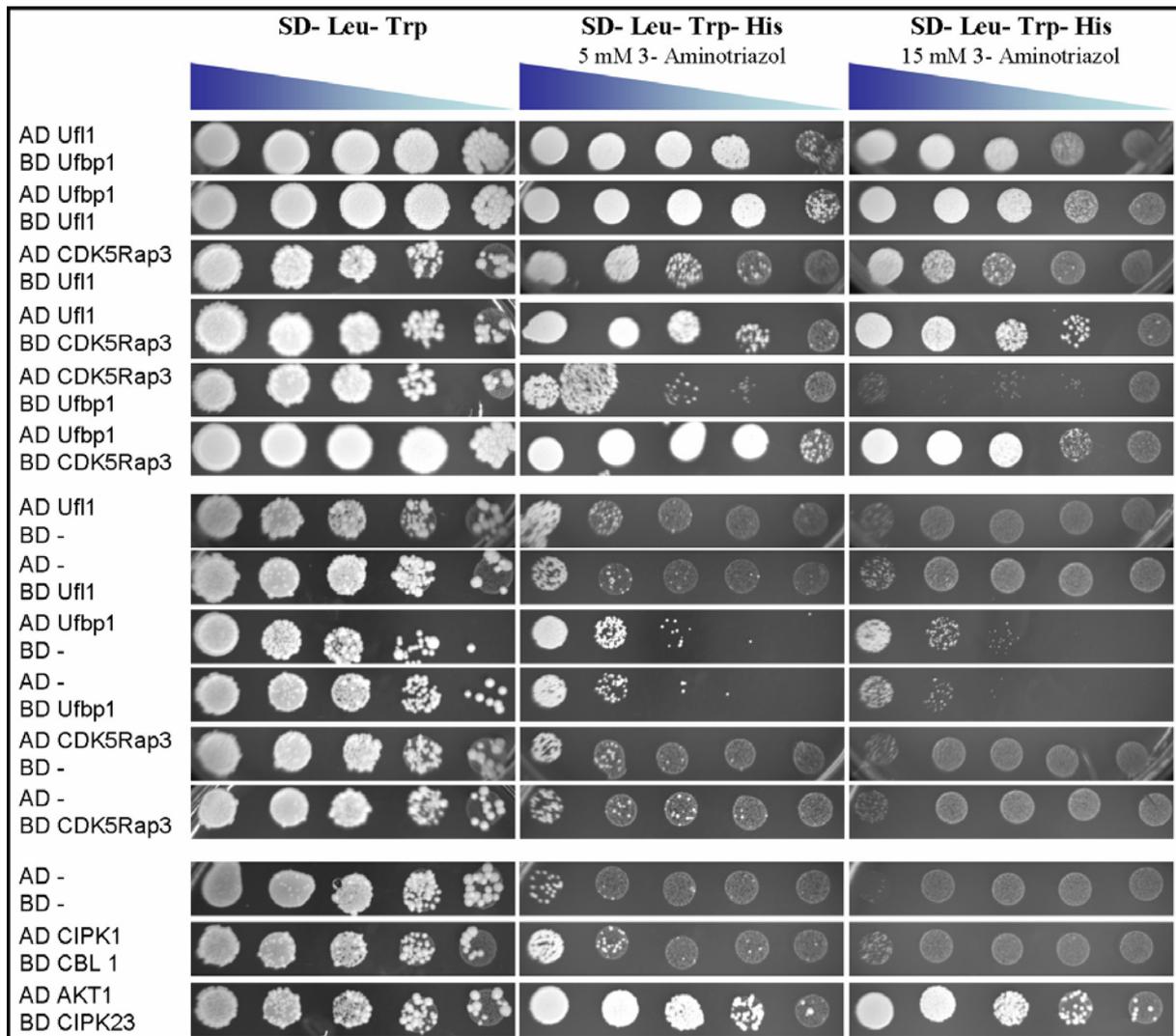


Abb. 23: Hefe-Zwei-Hybrid Analyse der Interaktion zwischen Ufl1-Ufbp1, Ufl1-CDK5Rap3 und Ufbp1-CDK5Rap3. (3, 5)

Cotransformation von Ufl1, Ufbp1, CDK5Rap3 und den entsprechenden Kontrollen in den Hefestamm SMY3. Die Hefen wurden auf Selektionsplatten in einer abfallenden Konzentration von links ($OD_{600} = 1$) nach rechts ($OD_{600} = 10^{-4}$) auf Selektionsplatten aufgetragen. Bei einer Temperatur von 30°C erfolgte die Inkubation. Eine mögliche Proteininteraktion wird durch das Wachstum der Hefen auf Histidin-freiem Medium angezeigt. Am linken Rand sind die Kombinationen der transformierten Konstrukte aufgeführt.

Zusammenfassend lassen die Hefe-Zwei-Hybrid Analysen eine starke Interaktion zwischen UfSP2-Ufm1, UfSP2-Kel8, Ufm1-Ufl1, Ufm1-Ufbp1, Ufl1-Ufbp1, Ufl1-CDK5Rap3 und Ufbp1-CDK5Rap3 erkennen. Hingegen liegt eine schwache Interaktion zwischen Uba5-Ufc1 und eine noch schwächere Interaktion zwischen CDK5Rap3-AAKB1 vor.

Es konnten keine Interaktionen zwischen Kel8-Ufc1, CDK5Rap3-Ufc1 und CDK5Rap3-Ufm1 im Rahmen der Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchungen ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.5 In vivo Interaktionsanalyse in *C. elegans* mittels DCLA

Während die *in vivo* Untersuchungen mittels Hefe-Zwei-Hybrid System in einzelligen Hefen heterolog durchgeführt wurden, stellt eine neuartige Methode zur *in vivo* Interaktionsanalyse in *C. elegans* selbst, der von Andrew Fire entwickelte *Different Cyto-localization Assay* (DCLA) dar (Blanchard *et al.* 2006). Der DCLA ermöglicht eine visuelle Prüfung von Protein-Protein Interaktionen direkt in *C. elegans*. Interaktionen werden als Relokalisierung des GFP-markiertem „prey“-Proteins durch ein Membran-gebundenes (MTLS; *Membrane Tether Localization Signal*) „bait“-Protein dargestellt (siehe 2.2.9.4).

Die Interaktionsstudien konzentrierten sich dabei auf die Kernelemente der Ufm1-Kaskade. So wurden auf genomischer Ebene die Gene von *ufm1*, *uba5* und *ufc1* amplifiziert und in den Vektor pPD122.36 kloniert. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktionsanalysen und Sequenzierungen bestätigt. Verwendete Oligonukleotide und Vektoren liegen in Tab. 4 und Abb. 11 vor. Der verwendete Vektor ermöglicht je nach Wahl der Schnittstellen eine C-terminale Fusion mit GFP, N-terminale Fusion mit dem MTLS oder keine Fusion mit MTLS oder GFP. Die Expression der Konstrukte steht unter der Kontrolle des endogenen Myosin Promotors *myo3*, welcher eine starke Expression der Proteine in den Muskelzellen von *C. elegans* bedingt. Somit kann sichergestellt werden, dass die zu untersuchenden Proteine für die Interaktionsstudie in ausreichender Menge und identischer Lokalisation exprimiert werden. Die erfolgreiche Mikroinjektion der Konstrukte kann zum einen visuell durch das Reportergen GFP als auch durch den Selektionsmarker *rol-6* bestätigt werden. Falls nicht anders vermerkt, erfolgte die Mikroinjektion in den Wildtyp *C. elegans*-Stamm (N2 Bristol). Zur Interaktionsanalyse ist eine cytosolische Expression des „prey“-Proteins die Grundvoraussetzung. Daher wurde zunächst die Lokalisation von *myo3Ufc1*-GFP bestimmt. Es konnte eine starke diffus-verteilte GFP Expression im Cytosol der Muskelzellen beobachtet werden (Abb. 24; A).

Anschließend folgte die Interaktionsanalyse zwischen gereiftem Ufm1 (*mUfm1*) und Ufc1 durch Injektion der Konstrukte *myo3mUfm1*-MTLS, *myo3Uba5* und *myo3Ufc1*-GFP in *C. elegans* (Wt). *myo3Uba5* wurde dem Injektionsansatz zugegeben, da das Expressionsmuster von Uba5 (Abb. 28) keine Expression in den Muskel-Zellen erkennen lässt und die Aktivierung von *mUfm1* unter ATP-Verbrauch durch Uba5 essentiell ist zur Ausbildung eines Thioesters zwischen *mUfm1* und Ufc1. Da *mUfm1* die Ankerdomäne (MTLS) trägt, ist eine membrangebundene Lokalisation von Ufc1 unter Anwesenheit von *mUfm1* ein starker Hinweis auf eine Interaktion dieser beiden Proteine. Hierbei ist in Abb. 24 (B) eine granuläre

GFP-Lokalisation im Vergleich zur diffus verteilten GFP-Lokalisation von *myo3Ufc1*-GFP (Abb. 24; A) zu sehen.

Des Weiteren wurde durch Mikroinjektion von *myo3Uba5*-MTLS und *myo3Ufc1*-GFP untersucht, inwieweit die Uba5-Ufc1 Interaktionsergebnisse aus den *Pull-down* und Hefe-Zwei-Hybrid Analysen durch den DCLA bestätigt werden können. Die GFP-Lokalisation ist in Abb. 24 (C) dargestellt und weist partielle, membrangebundene, granuläre Strukturen auf, allerdings nicht in dem Maße wie in Abb. 24 (B) dargestellt. Somit könnte diese partielle GFP-Lokalisationsänderung ein Indiz für die Darstellung unterschiedlicher Interaktionsstärken im DCLA sein. Es ist daher von einer schwachen Interaktion zwischen Uba5 und Ufc1 in diesem System auszugehen.

Weiterführend wurde die Abhängigkeit der Interaktion zwischen *mUfm1* und Ufc1 von Uba5 untersucht. Hierzu wurde die Deletionsmutante *uba5(ok3364)* als genetischer Hintergrund zur Analyse verwendet und *myo3mUfm1*-MTLS und *myo3Ufc1*-GFP mikroinjiziert (Abb. 24; E). Das erhaltene GFP-Expressionsmuster gleicht dem von *myo3Ufc1*-GFP (Abb. 24; A) und deutet auf keine Interaktion der beiden Proteine hin. Zur Bestätigung, dass die GFP Lokalisation in Abb. 24 (E) allein auf den Verlust von Uba5 zurückzuführen ist, wurden die Konstrukte *myo3mUfm1*-MTLS, *myo3Uba5* und *myo3Ufc1*-GFP in die Deletionsmutante *uba5(ok3364)* mikroinjiziert. Dabei konnte erneut eine granuläre membrangebundene GFP-Loaklisation beobachtet werden, welche in Abb. 24 (D) dargestellt ist und auf eine Interaktion von *mUfm1* und Ufc1 hindeutet.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass *mUfm1* und Ufc1 *in vivo* miteinander interagieren und diese Interaktion abhängig von Uba5 ist, um den Thioester zu *mUfm1* auszubilden und anschließend an Ufc1 zu übertragen. Des Weiteren konnten die Ergebnisse der *Pull-down* und Hefe-Zwei-Hybrid Analysen bezüglich einer Interaktion zwischen Uba5 und Ufc1 bestätigt werden, wobei es sich allerdings unter diesen Bedingungen um eine schwache Interaktion handelt.

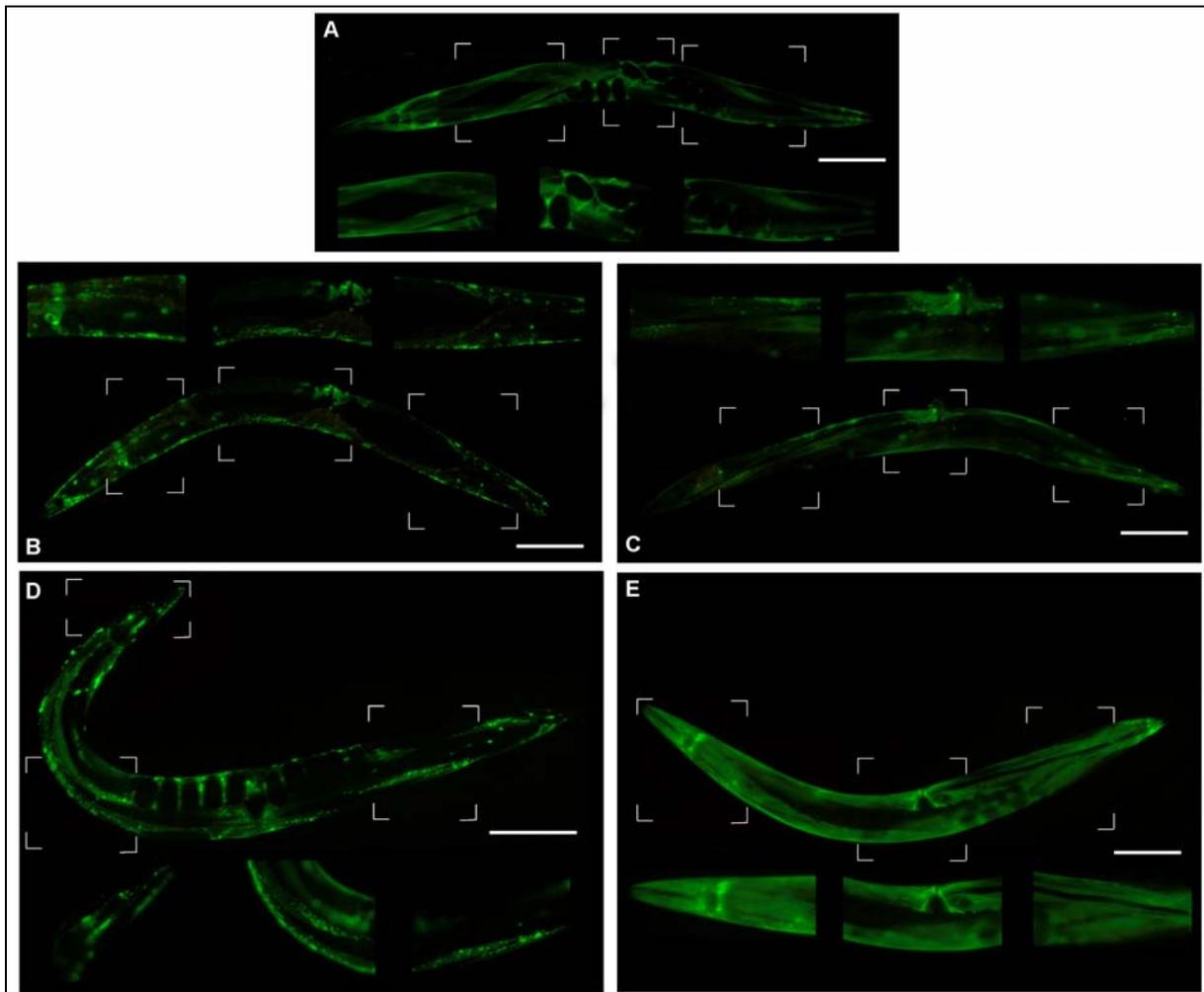


Abb. 24: *In vivo* Interaktionsanalyse (DCLA) von *mUfm1*, *Uba5* und *Ufc1* in *C. elegans*.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen adulter Hermaphroditen sind in A - E dargestellt. Ausschnittsvergrößerungen sind mit Klammern gezeichnet und im entsprechenden Bild präsentiert. Die injizierten Konstrukte stehen unter der Kontrolle des *myo3*-Promotors, welcher eine Expression in den Muskelzellen bedingt. Eine Interaktion wird anhand der Lokalisation der GFP-Expression ersichtlich. (A) *myo3Ufc1*-GFP (Wt) diffus verteilte cytosolische GFP-Expression. (B) *myo3Ufc1*-GFP::*myo3Uba5*::*myo3mUfm1*-MTLS (Wt) granuläre GFP-Expression. (C) *myo3Ufc1*-GFP::*myo3Uba5*-MTLS (Wt) partielle, granuläre GFP-Expression. (D) *myo3Ufc1*-GFP::*myo3Uba5*::*myo3mUfm1*-MTLS in der *uba5(ok3364)*-Mutante granuläre GFP-Expression. (E) *myo3Ufc1*-GFP::*myo3mUfm1*-MTLS in der *uba5(ok3364)*-Mutante diffus verteilte cytosolische GFP-Expression. Größenmaßstab: 100 μ m.

3.2 Expressionsstudien der Ufm1-Kaskade und potentieller Interaktionspartner in *C. elegans*

Zur Identifikation der räumlichen und zeitlichen Lokalisation der Ufm1-Kaskaden Proteine sowie deren potentieller Interaktionspartner in *C. elegans* wurde eine Reporterstudie durchgeführt. Das grün fluoreszierende Protein GFP wurde hierbei unter die Kontrolle der verschiedenen putativen Promotorsequenzen (Größe 2 – 3 kb) der entsprechenden untersuchten Gene gestellt.

Bis auf die *C. elegans*-Linie *ce-Pufsp2::GFP* (BC14232), welche von CGC (*Caenorhabditis Genetics Center*) bestellt wurde, sind alle transgenen *C. elegans*-Linien durch Mikroinjektion selbst erzeugt worden. Die Amplifikation der putativen Promotoren (3 kb) samt Gene von *proUfm1* (Ufm1-Vorstufe), *matUfm1* (gereiftes Ufm1), *Uba5* und *Ufc1* erfolgte auf genomischer Ebene. Zur Promotorstudie wurden die 2 kb Promotorbereiche von *uf11*, *ufbp1*, *kel-8* und *cdk5rap3* amplifiziert. Die Amplifikate wurden in den Vektor pPD95.77 kloniert, welcher eine C-terminale Fusion mit GFP erlaubt. Da Ufm1 C-terminal durch die Protease UfSP2 im Wurm prozessiert wird, erfolgte die Klonierung zum Schutz vor dem Verlust des GFP-tags von *proUfm1* und *matUfm1* hingegen in den Vektor pPD95.77N-Term (Abb. 11). Der Vektor wurde im Rahmen dieser Arbeit generiert. Hierbei wurden Restriktionsschnittstellen durch PCR-gerichtete Mutagenesen am C-Terminus des Reportergens GFP in den Vektor pPD95.77 eingefügt (Abb. 10). Die Möglichkeit einer N-terminalen Fusion der Gene mit GFP ist damit gegeben. Die erfolgreiche Klonierung aller Konstrukte wurde durch Restriktionsanalysen und mittels Sequenzierung erfolgreich bestätigt. Verwendete Oligonukleotide zur Klonierung und Mutagenese sowie Vektorkarten sind in Tab. 5, Tab. 6 und Abb. 11 aufgeführt.

Die Mikroinjektion der Konstrukte erfolgte zusammen mit dem *rol-6*- bzw. pBX-Plasmid als Marker zur Selektion transgener Tiere für den *C. elegans*-Stamm Wildtyp (N2 Bristol) bzw. *pha-1*(e2123). In den Abb. 25 - Abb. 33 sind die Expressionsstudien von UfSP2, *proUfm1*, *matUfm1*, *Uba5*, *Ufc1*, *Uf11*, *Ufbp1*, *Kel-8* und *CDK5Rap3* dargestellt. Da die jeweiligen GFP-Lokalisationen keine stadienspezifische Expression aufweisen werden nur die Expressionsmuster adulter Hermaphroditen dargestellt.

Die Promotorstudie der Ufm1-spezifischen Protease UfSP2 ist in Abb. 25 (*ce-Pufsp2::GFP*) aufgeführt. Dabei konnte eine starke Expression in den chemosensorischen Amphid-Neuronen, Phasmid-Neuronen sowie in den Neuronen posterior zum Rektum von *C. elegans* beobachtet werden. Des Weiteren sind GFP-Signale im Embryo (*in uteri*) und eine leichte GFP-Expression im Darm erkennbar.

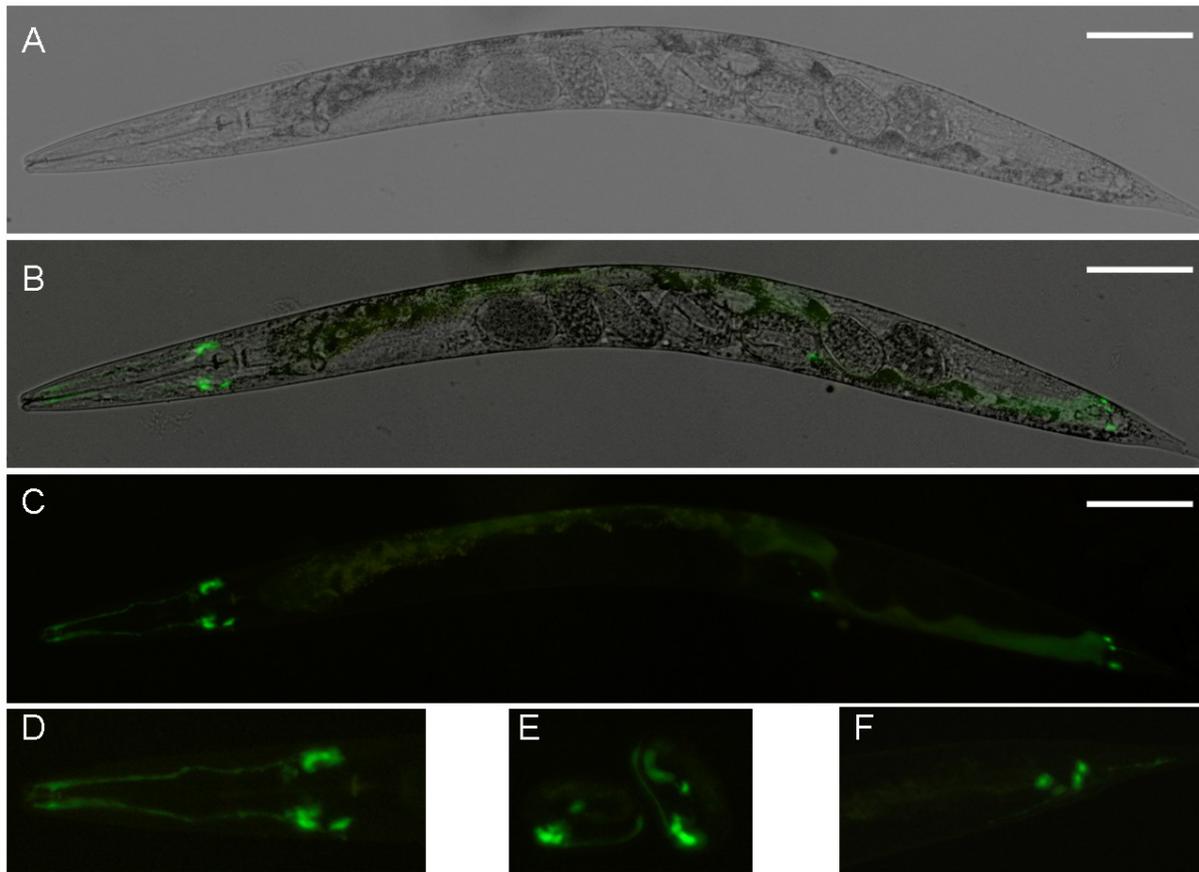


Abb. 25: Promotorstudie des Reportergergen-Konstrukts *ce-Pufsp2::GFP* in *C. elegans* (Stamm BC14232 [*F38A5.1::GFP*]). (4)

(A) monochrome DIC-Aufnahme, (B) Überlagerung von (A) und (C), (C) Fluoreszenz-Aufnahme: Expression in den Amphid-Neuronen, Phasmid-Neuronen, Neuronen posterior zum Rektum und im Darm, (D) Ausschnittsvergrößerung der Amphid-Neuronen aus (C), (E) Expression in den Embryonen, (F) Ausschnittsvergrößerung der Neuronen posterior zum Rektum. Größenbalken = 100 μm .

Die Überexpressionen der ungereiften (*proUfm1*) und gereiften (*matUfm1*) Form des UBLs Ufm1 unter der Kontrolle des nativen Promotors wiesen ein gemeinsames Expressionsmuster in verschiedenen Kopf-Neuronen, Darm, Embryo und Hypodermis auf (Abb. 26 *ce-pro-ufm1::GFP*; Abb. 27 *ce-mat-ufm1::GFP*).

Abweichend zu *proUfm1* wies *matUfm1* allerdings keine GFP-Expression in den Embryonen auf, jedoch in adulten Würmern zusätzlich im Pharynx, der Vulva und im Kanal der exkretorischen Zelle (H-Zelle) (Abb. 27 *ce-mat-ufm1::GFP*).

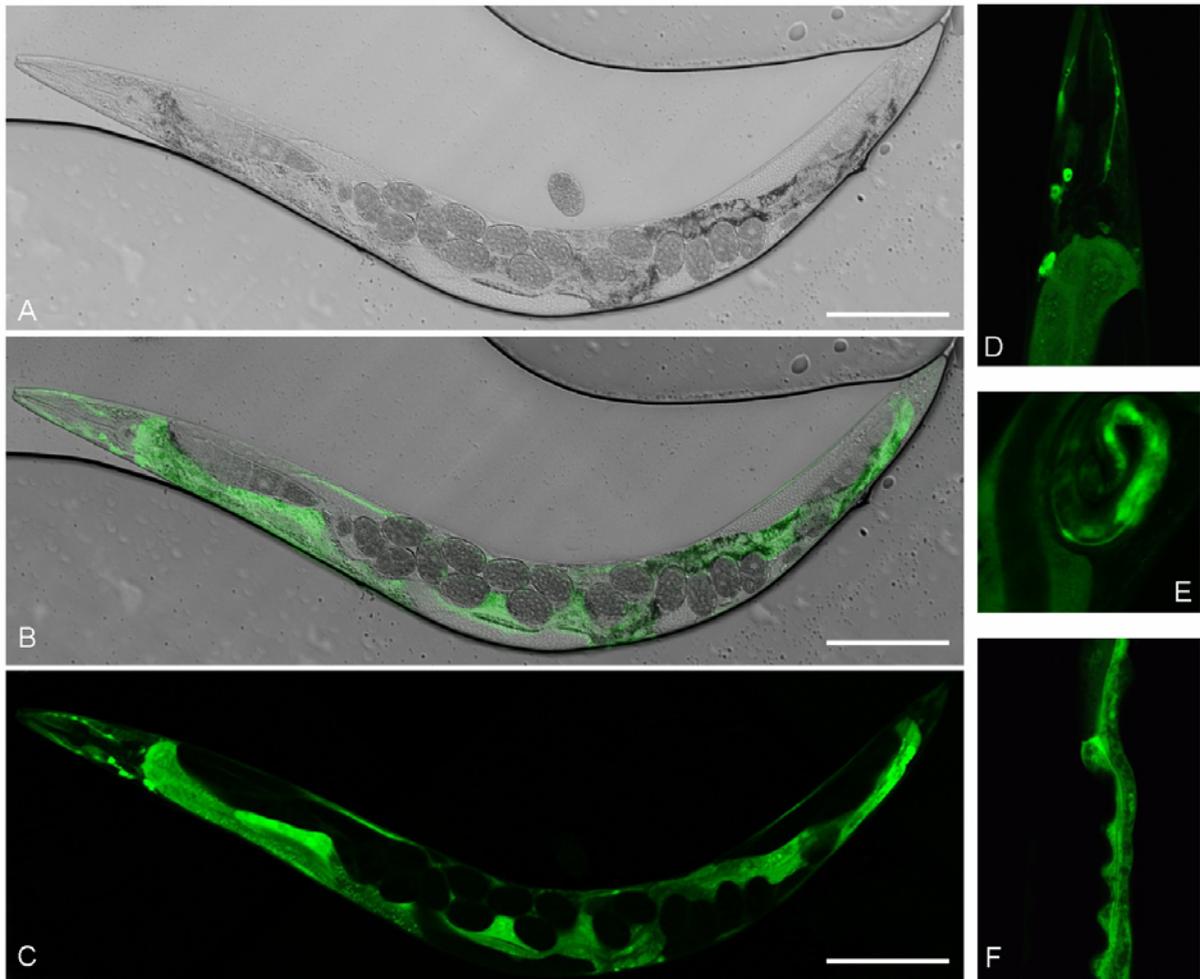


Abb. 26: Expressionsstudien des Reportergen-Konstrukts *ce-pro-ufm1::GFP* in *C. elegans*. (A) monochrome DIC-Aufnahme, (B) Überlagerung von (A) und Fluoreszenz-Aufnahme, (C) Fluoreszenz-Aufnahme: Expression in den Kopf-Neuronen, Darm und Hypodermis, (D) Ausschnittsvergrößerung der Kopf-Neuronen aus (C), (E) Expression in den Embryonen, (F) Detailansicht der Expression im Darm. Größenbalken = 100 μm .

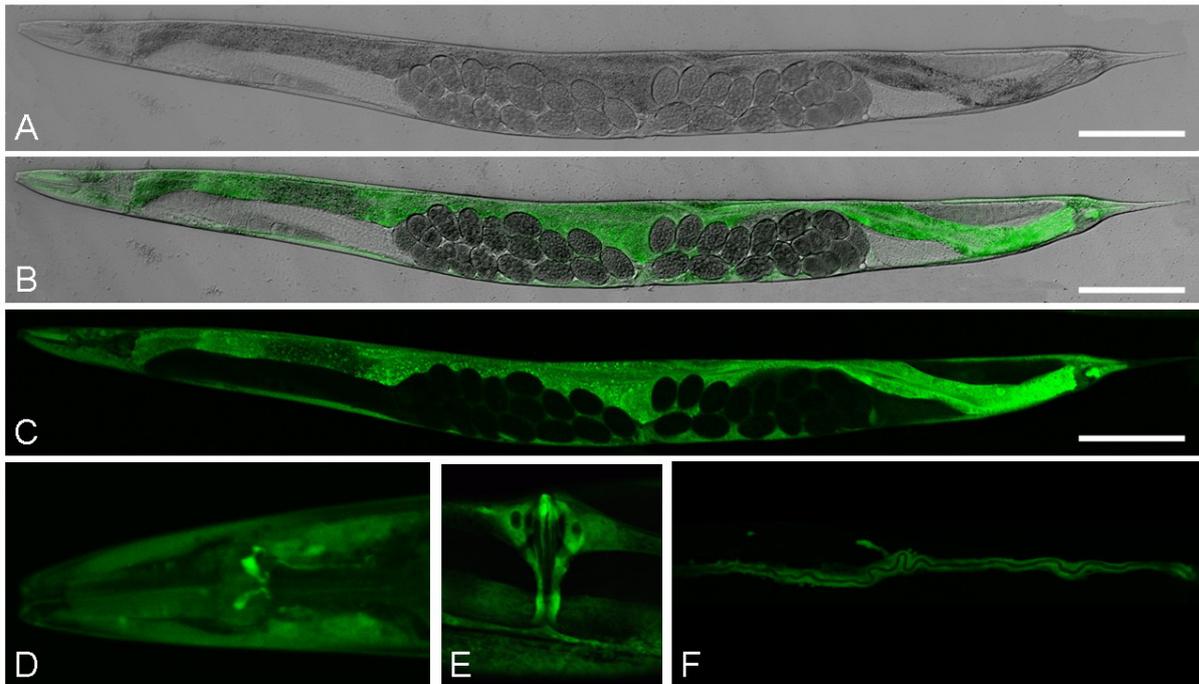


Abb. 27: Expressionsmuster des Reportergen-Konstrukts *ce-mat-ufm1::GFP* in *C. elegans*.

(A) monochrome DIC-Aufnahme, (B) Überlagerung von (A) und (C), (C) Fluoreszenz-Aufnahme: Expression in einigen Kopf-Neuronen, Darm, Hypodermis, Pharynx, Vulva und im Kanal der exkretorischen Zelle; Ausschnittsvergrößerung der Expression in den Kopf-Neuronen (D), der Vulva (E) und dem Kanal der exkretorischen Zelle (F). Größenbalken = 100 μm .

Expressionsanalysen des Ufm1-aktivierenden Enzyms Uba5 wurden als Überexpressionskonstrukt mit einem Promotorbereich von 3 kb generiert. GFP-Signale konnten in den Kopf-Neuronen, im Darm, in den Neuronen am Rektum, schwach in der Hypodermis und dem Pharynx festgestellt werden (Abb. 28 *ce-uba5::GFP*).

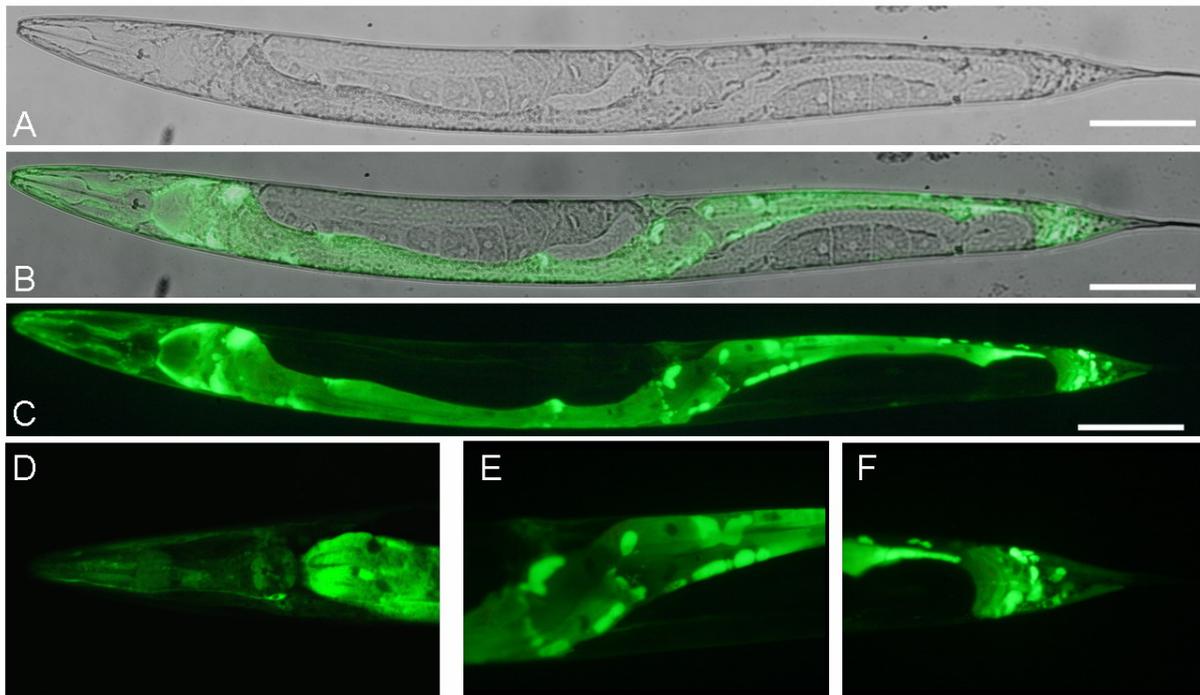


Abb. 28: Expressionsstudien des Reportergen-Konstrukts *ce-uba5::GFP* in *C. elegans*. (A) monochrome DIC-Aufnahme, (B) Überlagerung von (A) und (C), (C) Fluoreszenz-Aufnahme: Expression in den Kopf-Neuronen, Darm, Neuronen am Rektum, Hypodermis und Pharynx, (D) Ausschnittsvergrößerung der Kopfregion, Detailansicht der Expression im Darm (E) und der Schwanzregion (F). Größenbalken = 100 μ m.

Expressionsmuster des Ufm1-konjugierenden Enzyms Ufc1 ist in Abb. 29 (*ce-ufc1::GFP*) dargestellt. Das Startcodon des Gens C40H1.5 (*ttr-5*), welches in der 3 kb Promotorregion von Ufc1 lokalisiert ist, musste im Rahmen der Klonierung mittels PCR mutagenisiert werden, um somit dessen zusätzliche Genexpression zu verhindern. Hierzu verwendete Oligonukleotide sind in Tab. 5 aufgelistet. Die Überexpression von Ufc1 unter der Kontrolle des nativen Promotors (3 kb) wies eine starke und ubiquitäre Expression in *C. elegans* auf. So waren GFP-Signale in den Kopf-Neuronen, Darm, Hypodermis, Spermatheka, Vulva und Pharynx zu beobachten (Abb. 29).

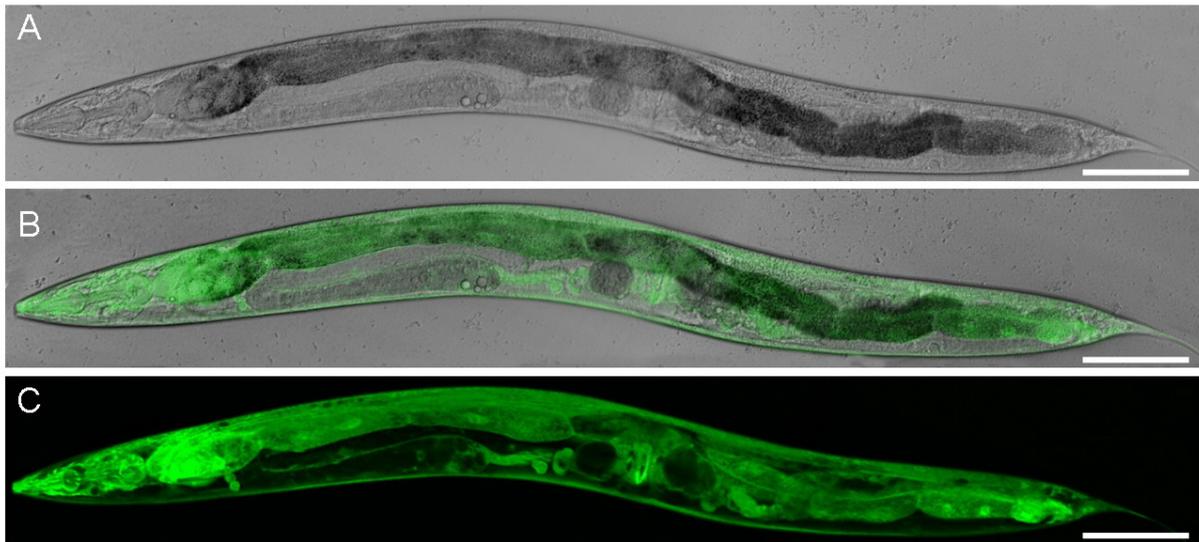


Abb. 29: Expressionsmuster des Reporter-gen-Konstrukts *ce-ufc1::GFP* in *C. elegans*. (A) monochrome DIC-Aufnahme, (B) Überlagerung von (A) und (C), (C) Fluoreszenz-Aufnahme: Expression in den Kopf-Neuronen, Darm, Hypodermis, Spermatheka, Vulva und Pharynx. Größenbalken = 100 μm .

Eine Promotorstudie der bisher einzigen bekannten E3-Ligase der Ufm1-Kaskade Ufl1 ist in Abb. 30 (*ce-Pufl1::GFP*) dargestellt. Die GFP-Lokalisation ist ausschließlich auf den Darm beschränkt.

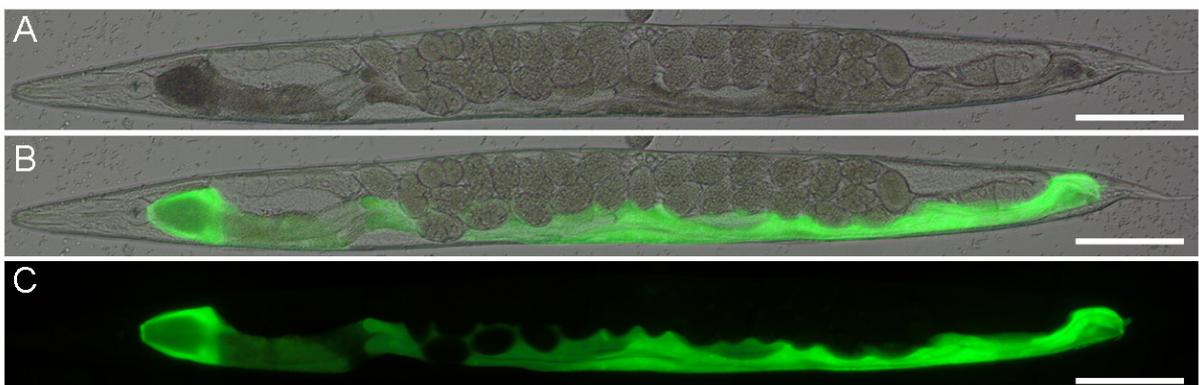


Abb. 30: Promotorstudien des Reporter-gen-Konstrukts *ce-Pufl1::GFP* in *C. elegans*. (5) (A) monochrome DIC-Aufnahme, (B) Überlagerung von (A) und (C), (C) Fluoreszenz-Aufnahme: Expression im Darm. Größenbalken = 100 μm .

Die Promotorstudien der putativen Interaktionspartner der Ufm1-Kaskade Ufbp1 (Abb. 31, *ce-Pufbp1::GFP*), Kel-8 (Abb. 32 *ce-Pkel8::GFP*) und CDK5Rap3 (Abb. 33 *ce-Pcdk5::GFP*) wiesen unterschiedliche Expressionsstärken und Lokalisationen auf. Eine Expression in den Kopf-Neuronen und im Darm war in allen transgenen Linien präsent. Kel-8 und CDK5Rap3 wiesen zusätzlich eine Expression im Nervensystem der ventralen Motorneuronen von anterior nach posterior auf. Kel-8 wurde ebenfalls schwach im Pharynx exprimiert, während

CDK5Rap3 sich durch eine besonders starke Expression im vorderen Abschnitt des Pharynx, der *pharyngeal gland cell*, auszeichnete.

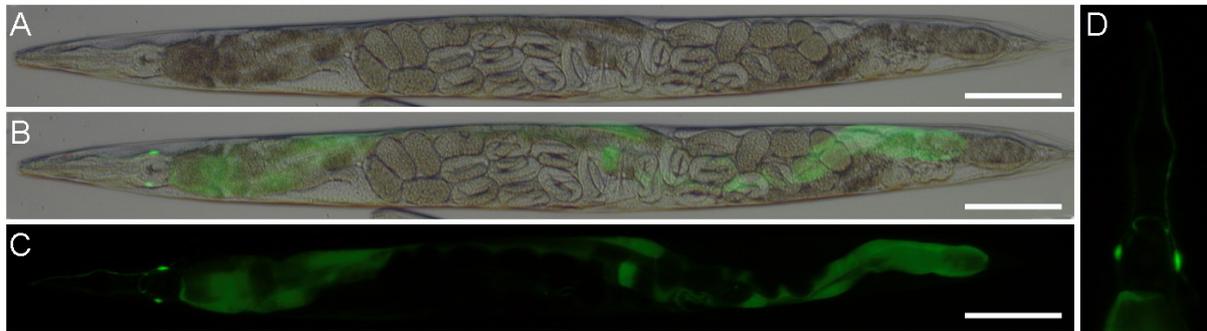


Abb. 31: Promotorstudien des Reportergen-Konstrukts *ce-Pufpbl::GFP* in *C. elegans*. (3)
(A) monochrome DIC-Aufnahme, **(B)** Überlagerung von (A) und (C), **(C)** Fluoreszenz-Aufnahme: Expression in den Amphid-Neuronen und im Darm, **(D)** Ausschnittsvergrößerung der Amphid-Neuronen aus (C). Größenbalken = 100 μm .

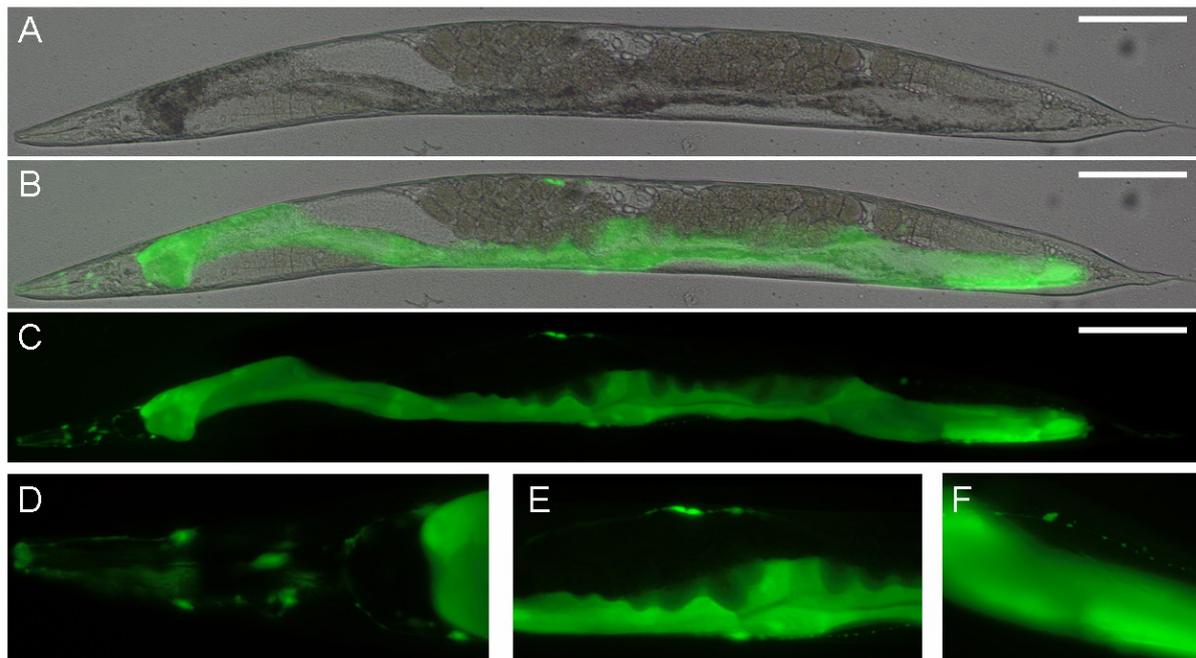


Abb. 32: Promotorstudien des Reportergen-Konstrukts *ce-Pkel8::GFP* in *C. elegans*. (4)
(A) monochrome DIC-Aufnahme, **(B)** Überlagerung von (A) und (C), **(C)** Fluoreszenz-Aufnahme: Expression in den Kopf-Neuronen, im Darm und in den ventralen Motorneuronen; Ausschnittsvergrößerungen der Expressionsmuster der Kopffregion **(D)**, des Darms **(E)** und der von anterior nach posterior verlaufenden ventralen Motorneuronen **(F)** von (C). Größenbalken = 100 μm .

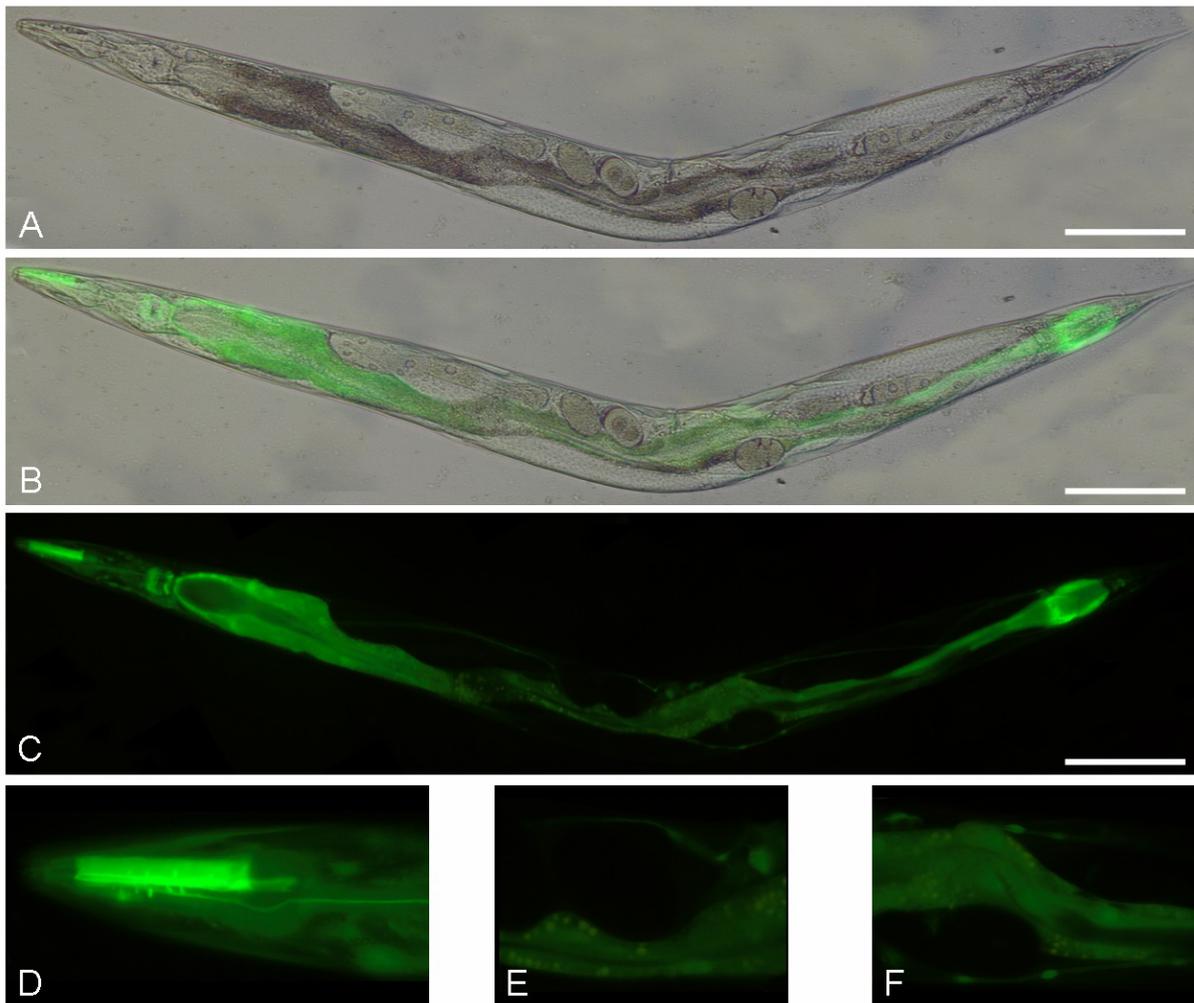


Abb. 33: Promotorstudien des Reportergen-Konstrukts *ce-Pcdk5::GFP* in *C. elegans*. (3)
 (A) monochrome DIC-Aufnahme, (B) Überlagerung von (A) und (C), (C) Fluoreszenz-Aufnahme: Expression in den Kopf-Neuronen, Pharynx, *pharyngeal gland cell*, im Darm und in den ventralen Motorneuronen; Ausschnittsvergrößerungen der Kopfregion, Pharynx bzw. *pharyngeal gland cell* (D) sowie der Expression im Darm (E) und in den ventralen Motorneuronen (F) von (C). Größenbalken = 100 µm.

Tab. 10: Expressionslokalisationen aller Reportergergenkonstrukte in *C. elegans*.

Konstrukt	Lokalisation	Expressionsstärke
<i>ce-Pufsp2::GFP</i>	Amphid-Neuronen, Phasmid-Neuronen, Neuronen posterior zum Rektum, Darm, Embryo	niedrig
<i>ce-pro-ufm1::GFP</i>	Kopf-Neuronen, Darm, Hypodermis, Embryo	niedrig
<i>ce-mat-ufm1::GFP</i>	Kopf-Neuronen, Darm, Hypodermis, Vulva, Pharynx, Kanal der exkretorischen Zelle	niedrig
<i>ce-uba5::GFP</i>	Kopf-Neuronen, Darm, Hypodermis, Neuronen am Rektum, Pharynx	niedrig
<i>ce-ufc1::GFP</i>	Kopf-Neuronen, Darm, Hypodermis, Spermatheka, Vulva, Pharynx	hoch
<i>ce-Puf11::GFP</i>	Darm	hoch
<i>ce-Pufpb1::GFP</i>	Amphid-Neuronen, Darm	niedrig
<i>ce-Pkel8::GFP</i>	Kopf-Neuronen, Darm, ventrale Motorneuronen	hoch
<i>ce-Pcdk5::GFP</i>	Kopf-Neuronen, Darm, ventrale Motorneuronen, Pharynx, <i>pharyngeal gland cell</i>	hoch

3.3 Phänotypanalyse der *uba5(ok3364)*-Deletionsmutante

uba5(ok3364) wurde unter Berücksichtigung der Reproduktionsrate, adulten Lebensdauer, larvalen Entwicklung und Stressresistenz charakterisiert. Weiterführend wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Proteom- und Transkriptom-Analysen der Deletionsmutane *uba5(ok3364)* begonnen.

Da es sich bei Uba5 um das einzige Ufm1-aktivierende Enzym handelt, führt ein *knock-out* dieses Proteins wahrscheinlich zum kompletten Stillstand der Ufm1-Kaskade. Daher sollten mittels dieser Untersuchungen potentielle Funktionen der Ufm1-Kaskade in dem Nematoden *C. elegans* nachgegangen werden.

Die verwendete *C. elegans*-Linie wurde vom *Gene Knockout Consortium* erzeugt. Vor den Phänotypisierungsuntersuchungen wurde *uba5(ok3364)* (Stamm RB2441) sechsmal mit dem Wildtyp N2 Bristol ausgekreuzt, um potentielle Hintergrundmutationen zu entfernen. Der positive Nachweis homozygoter Individuen bezüglich der *uba5*-Deletion erfolgte mittels Einzelwurm-PCR auf das *uba5* Gen. Die *uba5*-Deletion betrifft ein 827 bp großes DNA-Fragment, welche unter anderem zum Verlust des aktiven Zentrums (Cys²⁵⁰) des Proteins führt (Abb. 34).

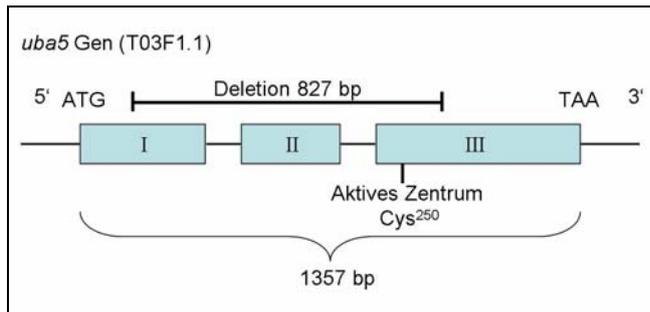


Abb. 34: Schematische Darstellung der *uba5*-Deletion im *C. elegans*-Stamm *uba5(ok3364)*.

3.3.1 *uba5(ok3364)* – Reproduktion

Die Reproduktionsrate von *uba5(ok3364)* wurde im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Pro Ansatz wurden 30 Tiere eingesetzt, wobei die Gesamtzahl an gelegten Eiern pro Individuum gezählt wurde. In Abb. 35 sind die mittleren Reproduktionsraten einschließlich der Standardabweichungen der beiden untersuchten *C. elegans* Stämme unter normaler Kultivierungstemperatur (20°C) und unter leichtem Hitzestress (25°C) dargestellt.

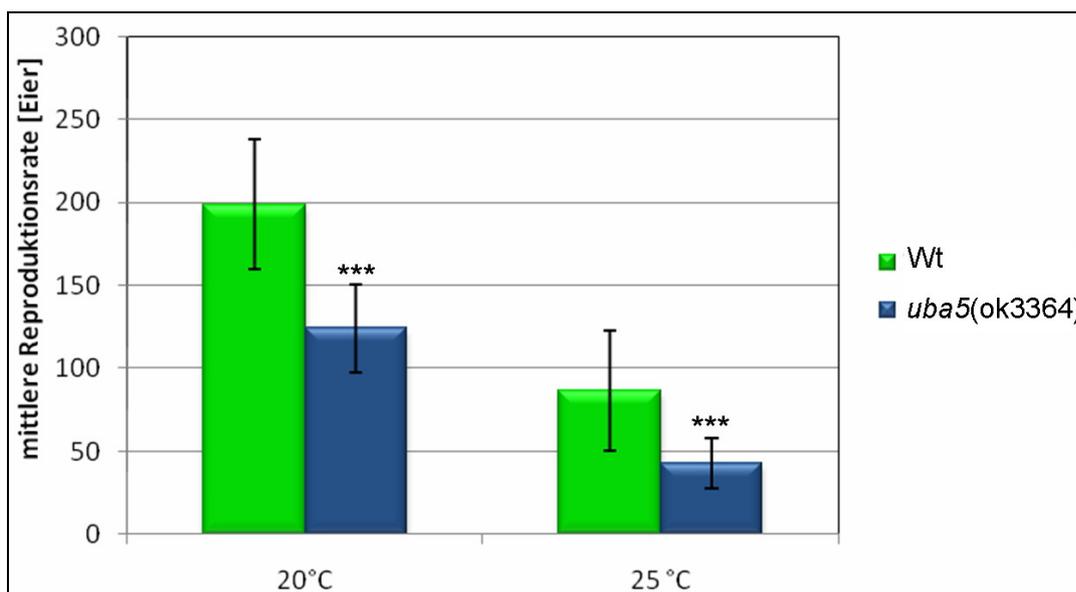


Abb. 35: Vergleich der Reproduktionsrate von *uba5(ok3364)* gegenüber dem Wt. (4)

Die mittlere Reproduktionsrate ergibt sich aus der durchschnittlichen Anzahl an gelegten Eiern von *uba5(ok3364)* und dem Wildtyp. Für beide untersuchten Temperaturen weist der *student* t-Test hoch signifikante Unterschiede in der Reproduktionsrate auf ($p \leq 0,0001$).

Die mittlere Reproduktionsrate des Wildtyps bei einer Kultivierungstemperatur von 20°C betrug 199 Eier, während *uba5(ok3364)* 124 Eier legte. Die Standardabweichungen der Mittelwerte überschneiden sich nicht, und der F-Test zeigt, dass sich beide Wurm-Linien in ihrer Varianz nicht unterscheiden ($p \geq 0,01$). Die ermittelten Werte zur Reproduktion wurden mit dem *student* t-Test untersucht und weisen eine hohe Signifikanz auf ($p \leq 0,0001$). Eine

Kultivierung von *C. elegans* unter Hitzestressbedingungen (25°C) führte zu einer deutlichen Verringerung der Reproduktion (Wt = 87 Eier, *uba5(ok3364)* = 43 Eier). Ebenso konnte eine Reduktion der maximalen Dauer der Eiablage beobachtet werden (11 Tage bei 20°C zu 8 Tage bei 25°C). Die Standardabweichungen der Reproduktionsraten bei 25°C überlappen, wobei die Streuung von Wildtyp und Mutante signifikant verschieden ist (F-Test: $p \leq 0,001$). Nach Berechnung des *student* t-Test liegt ein hoch signifikanter Unterschied der Reproduktionsraten auch bei 25°C vor ($p \leq 0,0001$).

3.3.2 *uba5(ok3364)* – adulte Lebensdauer

Die Analyse der adulten Lebensdauer bei einer Kultivierungstemperatur von 20°C erfolgte mit jeweils 10 Platten à 10 Würmern und ist in Abb. 36 dargestellt. Die ermittelte maximale Lebensdauer des Wildtypen betrug 24 Tage, während die Deletionsmutante *uba5(ok3364)* bis zu 19 Tage bei 20°C lebte. Die Kurvenverläufe weisen eine versetzte Linearität auf, wobei eine hoch signifikante Lebensdauerreduktion der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* im Vergleich zum Wt nachgewiesen werden konnte ($p \leq 0,001$).

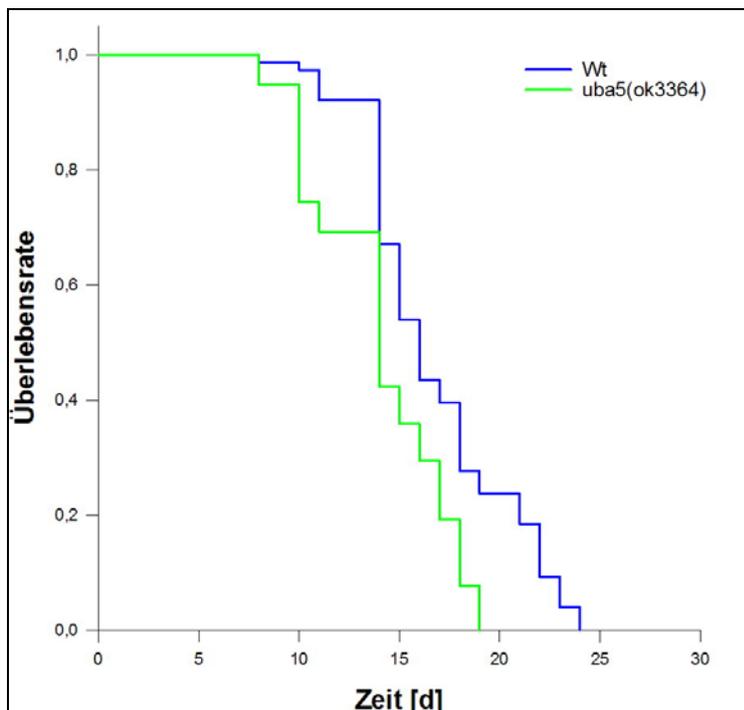


Abb. 36: Vergleich der adulten Lebensdauer von *uba5(ok3364)* und Wt (N2) bei 20°C. (4)

Dargestellt ist die prozentuale Lebensdauer der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* (grün; $n = 75$) und des Wildtypen (blau; $n = 74$). Würmer, die am Rand der Petrischalen vertrockneten wurden nicht in die Berechnung einbezogen. Eine früher einsetzende Sterblichkeit konnte bei *uba5(ok3364)* (10 Tage) im Vergleich zum Wt (14 Tage) beobachtet werden. Die maximale Lebensdauer des *C. elegans* Wildtypen beträgt 24 Tage und die der *uba5(ok3364)*-Mutante 19 Tage. Es konnte eine signifikante Verringerung der Lebensdauer von *uba5(ok3364)* beobachtet werden ($p \leq 0,001$).

3.3.3 *uba5(ok3364)* - larvale Entwicklung

Zur vergleichenden Bestimmung der zeitlichen Entwicklung wurden synchrone *C. elegans* Kulturen der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* und des Wildtypen bei 20°C unter Standardbedingungen kultiviert. Wurmulturen wurden hierfür zunächst synchronisiert und konnten ÜN schlüpfen. Anschließend erfolgte die Dokumentation der *C. elegans* Entwicklung nach 48 h und 72 h (Abb. 37). Es zeigte sich, dass nach 48 h nahezu alle *C. elegans* Wt das L4-Stadium erreicht hatten. Die *uba5(ok3364)*-Deletionsmutante erreichte jedoch nur das L2- bis L3-Stadium. Nach 72 h legte der Wt bereits Eier, während die Deletionsmutante im L4-Stadium bis zu maximal jungen Adulten vorlag. *uba5(ok3364)* weist eine Entwicklungsverzögerung von ca. 6 h im Vergleich zum Wt auf.

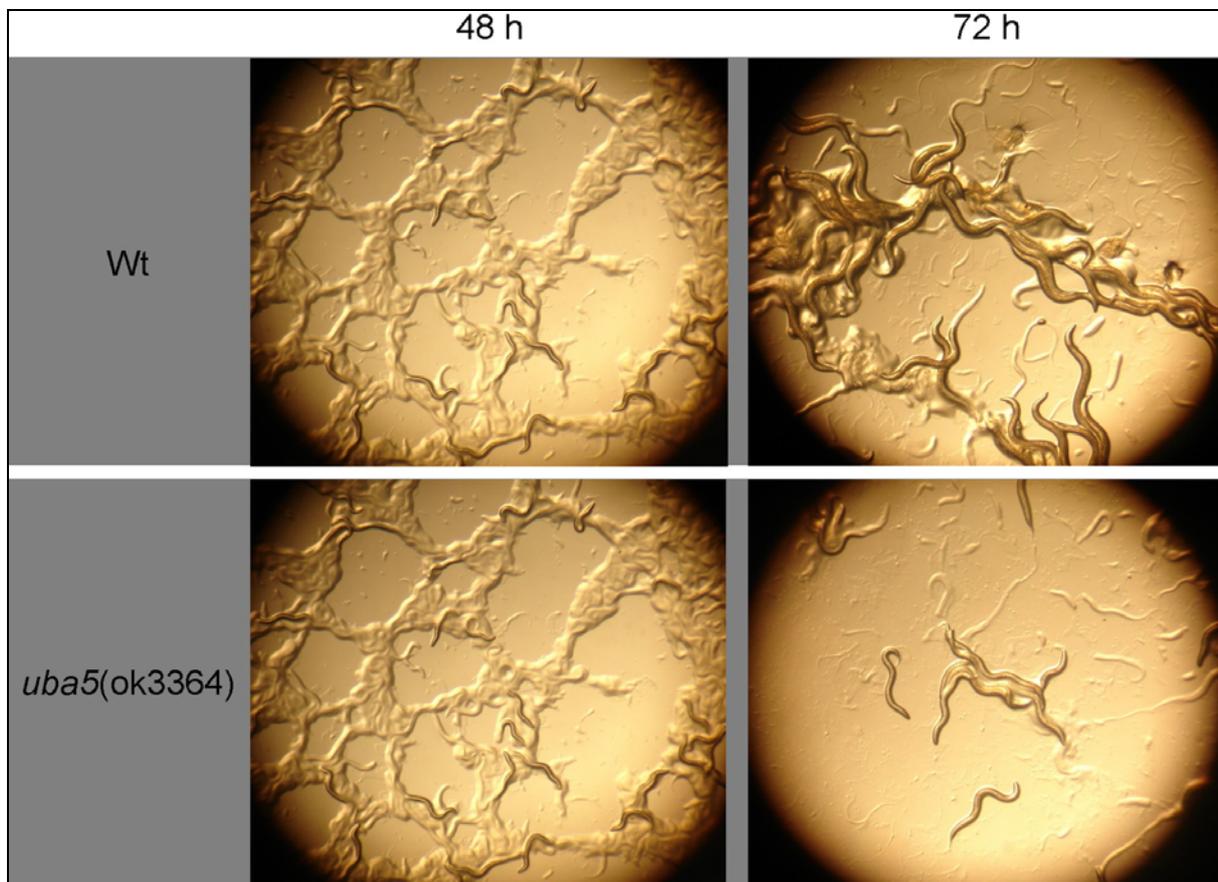


Abb. 37: Vergleichende mikroskopische Dokumentation der Entwicklung von *uba5(ok3364)* und Wt. (4)

Synchrone Wurmulturen wurden auf NGM-Platten kultiviert und nach einem Zeitintervall von 48 h und 72 h dokumentiert. Es wurden pro Ansatz mindestens 20 NGM-Platten mit jeweils mehreren hundert Würmern untersucht.

3.3.4 uba5(ok3364) – Stress-Resistenz

Ziel der Untersuchungen war es Veränderungen in der Stress-Resistenz zwischen der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* und dem Wt aufzudecken. Als Stressoren fungierten Hitze (34°C), Toxine des *B. thuringiensis*-Stammes BT-18247, Metall-Stress (Cadmium) und oxidativer Stress (Juglon). Dabei wurde die Überlebensrate als prozentualer Anteil der lebenden Würmer auf die Gesamtzahl der eingesetzten Tiere berechnet. Pro Versuchsansatz der Stressuntersuchungen wurden 10 NGM-Platten mit jeweils 10 Würmern verwendet. Die Ergebnisse dieser vergleichenden Stress-Resistenz-Untersuchungen sind in Abb. 38 dargestellt.

Als Hitzestress wurde eine Temperatur von 34°C über einen Zeitraum von 16 h angelegt. Anschließend wurden die gestressten Tiere für 3 h bei 20°C inkubiert, um auszuschließen, dass lediglich paralysierte Tiere als tot gewertet werden. Der Wt war hierbei vollständig tot (0 %), während 32,43 % der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* lebten.

Weiterführend wurden die toxisch wirkenden Proteinkristalle (BT-Toxin) des Stammes BT-18247 (12 h bei 20°C) *C. elegans* als Nahrungsquelle geboten. Es konnte eine Überlebensrate von 15,96 % (Wt) zu 88,17 % (*uba5(ok3364)*) ermittelt werden.

Untersuchungen zur Metallstress-Resistenz erfolgten durch Cadmium-Exposition (3,5 mg/ml) der Würmer über eine Zeitspanne von 16 h bei 20°C. Es stellte sich eine Überlebensrate von 75 % (Wt) gegenüber 46,15 % (*uba5(ok3364)*) heraus.

Abschließend wurde die Wirkung von oxidativem Stress auf die Überlebensrate der beiden Wurmlinien durch Juglon ermittelt. Hierbei erfolgte die Exposition der Würmer gegenüber einer Juglonkonzentration von 0,2 mM über einen Zeitraum von 16 h bei 20°C. Die ermittelte Überlebensrate lag bei 7 % (Wt) zu 40 % (*uba5(ok3364)*).

Nach Berechnungen mit Hilfe des *students t*-Test konnte bestätigt werden, dass eine hoch signifikant ($p \leq 0,0001$) verbesserte Überlebensrate von *uba5(ok3364)* im Vergleich zum Wt bei den Stressoren BT-Toxine und Juglon vorliegt. Eine hoch signifikant verminderte Überlebensrate ($p \leq 0,0001$) von *uba5(ok3364)* im Vergleich zum Wt wurde unter Cadmium-Stress festgestellt.

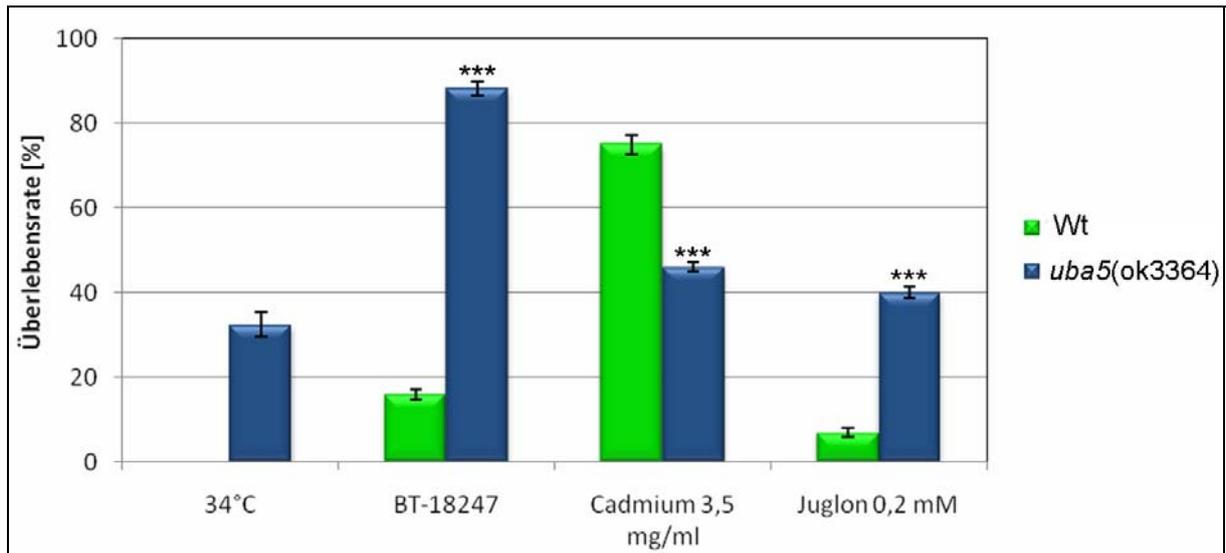


Abb. 38: Vergleich der Überlebensraten zwischen Wt und *uba5(ok3364)* nach Exposition verschiedener Stressoren. (4)

Zur Stressresistenz-Analyse wurden die Stressoren Hitze (34°C, 16 h; 3h, 20°C), BT-Toxine des *B. thuringiensis* Stammes BT-18247 (12 h, 20°C), Cadmium (3,5 mg/ml, 16 h, 20°C) und Juglon (0,2 mM, 16 h, 20°C) verwendet. Die Überlebensrate wurde als prozentualer Anteil der lebenden Würmer von der Gesamtzahl der Tiere auf den Stress-Platten berechnet. Würmer, die am Rand der Petrischalen vertrockneten, wurden nicht in die Berechnung mit einbezogen. Pro Versuchsansatz wurden 10 NGM-Platten mit jeweils 10 Würmern verwendet. Eine deutlich gesteigerte Überlebensrate wurde unter Hitzestress der *uba5(ok3364)*-Mutante zugeordnet (Wt n = 94, *uba5(ok3364)* n = 74). Nach Berechnungen des *student t*-Tests konnte eine signifikant höhere Überlebensrate bei *uba5(ok3364)* im Vergleich zum Wt unter den Stressbedingungen BT-18247 (Wt n = 94, *uba5(ok3364)* n = 93) und Juglon (Wt n = 120, *uba5(ok3364)* n = 110) mit einem *p*-Value von $\leq 0,0001$ festgestellt werden. Hingegen zeigte *uba5(ok3364)* unter Cadmium-Stress eine signifikant schlechtere Überlebensrate als der Wt (Wt n = 88, *uba5(ok3364)* n = 78; $p \leq 0,0001$).

Zusätzlich wurde ermittelt, inwieweit eine Überexpression von Uba5 Einfluss auf die Stress-Resistenz nimmt. Als exemplarischer Stressor wurde Juglon gewählt. Hierfür wurde der Wt und die im Rahmen dieser Arbeit generierten transgenen *pha-1(e2123)* Überexpressions-Linien *ce-uba5::GFP* (Uba5(ÜE)) (Abb. 28) und *ce-ufc1::GFP* (Ufc1 (ÜE)) (Abb. 29) auf ihre Überlebensrate unter oxidativem Stress (0,2 mM Juglon, 16 h, 20°C) analysiert (Abb. 39). Um Einflüsse auszuschließen, die lediglich auf dem genetischen Hintergrund *pha-1(e2123)* beruhen, wurde die Promotorstudie Ufc1(P) als Kontrolle verwendet. Pro Versuchsansatz wurden 20 Würmer eingesetzt, und die Experimente wurden 3-mal unabhängig wiederholt. Hierbei konnte ein hoch signifikanter Unterschied in der Überlebensrate von Ufc1(ÜE) (50 %) gegenüber den verwendeten Wurmlinien Wt (10 %), Uba5(ÜE) (10 %) und Ufc1(P) (15 %) nach Berechnungen mit Hilfe des *student t*-Tests ($p \leq 0,0001$) ermittelt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen keine verbesserte Stresstoleranz durch eine Überexpression von Uba5 erkennen.

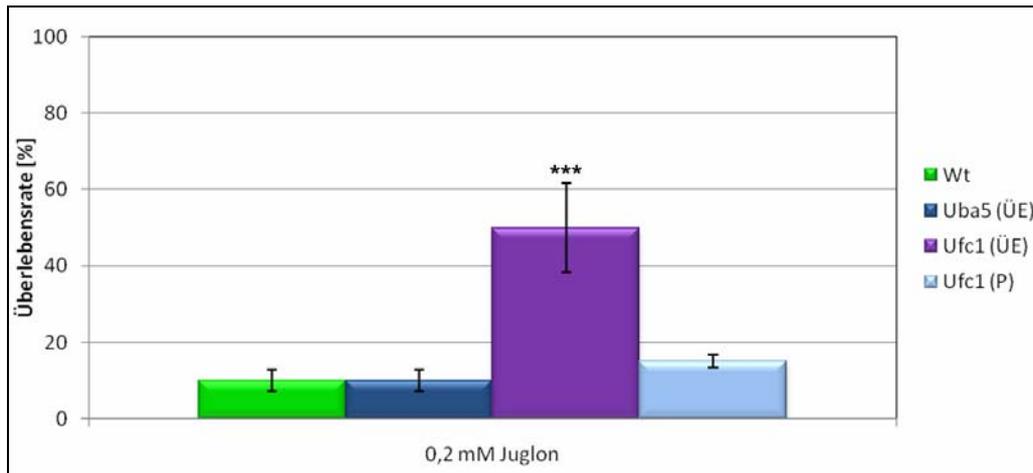


Abb. 39: Vergleich der Überlebensraten von Wt und den transgenen *pha-1(e2123)* Wurmlinien Uba5(ÜE), Ufc1(ÜE) und Ufc1(P) bei oxidativem Stress. (4)

Die Stress-Toleranz gegenüber oxidativem Stress (Juglon 0,2 mM) wurde über eine Zeitspanne von 16 h bei 20°C untersucht. Die Überlebensrate wurde als prozentualer Anteil an lebenden Würmern von der Gesamtzahl der Tiere auf den Platten berechnet. Pro Versuchsansatz wurden 20 Würmer verwendet, wobei die Experimente 3-mal unabhängig wiederholt wurden. Hierbei konnte nach Berechnungen mit dem *student* t-Test ein hoch signifikanter Unterschied von Ufc1(ÜE) gegenüber Wt, Uba5(ÜE) und Ufc1(P) mit einem *p*-Value von $\leq 0,0001$ bestimmt werden.

3.4 Reporter-gen-Analyse zu ER-Stress

3.4.1 Analyse der *hsp4*-GFP Expression unter ER-Stress nach *knock-down* von Komponenten der Ufm1-Kaskade

Assoziationen der Ufm1-Kaskade zum ER wurden durch verschiedenste Arbeitsgruppen ermittelt (Azfer *et al.* 2006, Lu *et al.* 2008, Tatsumi *et al.* 2010). Daher könnten Untersuchungen zum möglichen Einfluss der Ufm1-Kaskade auf das ER erste Hinweise zur physiologischen Funktion dieser Kaskade geben. Hierzu wurde die ER-Stress Reporter-genlinie *hsp4*-GFP(*zcls4*)V (*Caenorhabditis Genetics Center*; Stamm SJ6) zur weiteren Analyse verwendet. Die Promotorregion (1,1 kb) von *hsp4*, dem *C. elegans* Ortholog von BiP/GRP78 (einem bedeutenden Chaperon des ER) wurde mit GFP fusioniert und stabil im Genom integriert (Calfon *et al.* 2002). Die Regulation der *hsp4*-GFP Expression unter ER-Stress erfolgt durch den ER-Signaltransduktor Ire-1 und dem nachfolgenden Transkriptionsfaktor Xbp-1 in *C. elegans* (Urano *et al.* 2002). Somit stellt die Intensität des GFP-Signals ein Maß für ER-Stress dar.

Untersuchungen einer Assoziation der Ufm1-Kaskade zum ER konzentrierten sich zunächst auf die Fragestellung, ob der RNAi vermittelte *knock-down* von Komponenten der Ufm1-Kaskade bereits ER-Stress bedingt. In diesem Fall konnte keine GFP-Fluoreszenz bzw. erhöhte Expression von *hsp4* nach *knock-down* der Ufm1-Kaskade beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Da der *knock-down* des Ufm1-Signalwegs an sich keinen ER-Stress auslöst, wurde untersucht, inwieweit die *hsp4*-Expression bei bereits gestressten Würmern durch den

knock-down der Ufm1-Kaskade beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurde der äußerst effektive ER-Stressor Tunicamycin, welcher die Glykosylierung im ER inhibiert, verwendet. Hierzu wurden axenisierte *hsp4*-GFP Würmer auf RNAi-Platten kultiviert und die nächste Generation nach Erreichen des adulten Stadiums auf Tunicamycin-Stressplatten (5 µg/ml) umgesetzt (Calfon *et al.* 2002). Eine Inkubationszeit von 5 h bei 20°C wurde angelegt. Die GFP-Fluoreszenzmuster unter Tunicamycin-Stress sind in Abb. 40 dargestellt und stellen neben der Kontrolle (L4440) den Einfluss des RNAi vermitteltem *knock-down* von *ufsp2*, *ufm1* und *uba5* heraus. Das *hsp4*-Expressionsmuster liegt ubiquitär in *C. elegans* vor. Ein schwaches GFP-Signal ist sowohl der Kontrolle (L4440) als auch nach *knock down* von *ufsp2* zuzuordnen (Abb. 40; A & B). Hingegen konnte eine sehr starke GFP-Fluoreszenz durch den *knock-down* von *ufm1* und *uba5* unter Tunicamycin-Stress im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden (Abb. 40; C & D).

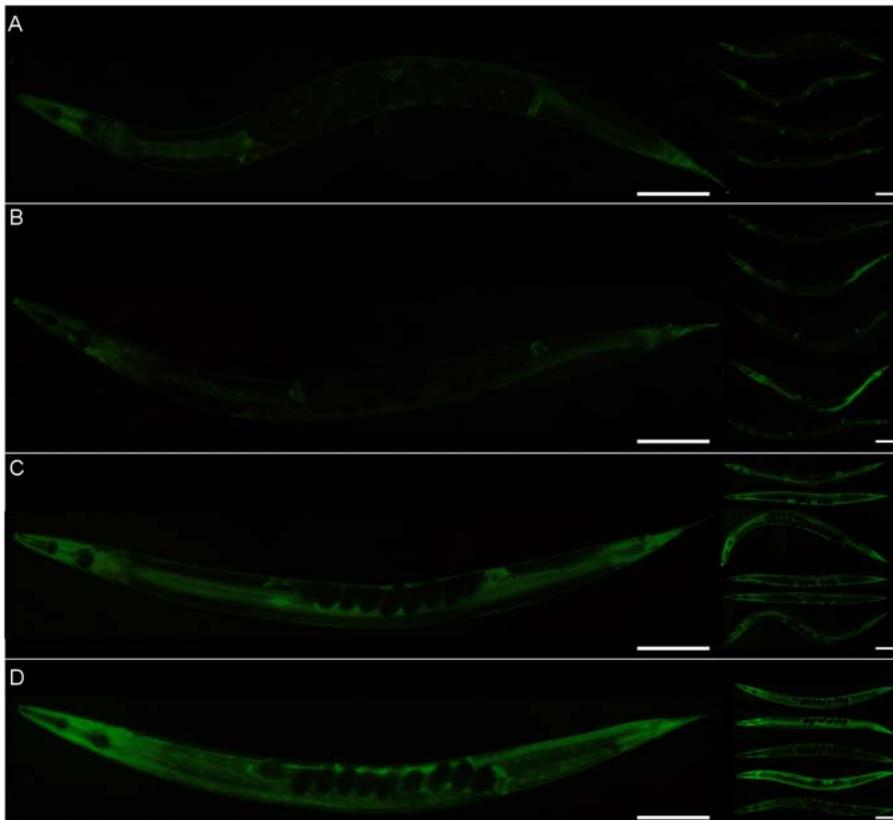


Abb. 40: Analyse der *hsp4*-GFP Expression nach *knock-down* von Komponenten der Ufm1-Kaskade unter Tunicamycin-Stress. (3)

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung adulter Hermaphroditen der ER-Stress Reporter *C. elegans*-Linie *hsp4*-GFP(zcIs4)V. RNAi vermittelter *knock-down* von *ufsp2* (B), *ufm1* (C) und *uba5* (D) wurde mit der Kontrolle (L4440) (A) unter Tunicamycin (5 µg/ml)-Stress nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 20°C dokumentiert und verglichen. Größenmaßstab: 100 µm.

Zusammenfassend konnte *in vivo* unter Tunicamycin-Stress eine verstärkte *hsp4*-Expression festgestellt werden, die auf den *knock-down* von *ufm1* und *uba5* in *C. elegans* zurückzuführen ist.

3.4.2 Analyse der *hsp4*-GFP Expression unter Stressbedingungen in *uba5(ok3364)*

Im Folgenden wurde die *C. elegans knock-out* Mutante *uba5(ok3364)* in die ER-Stress Reporterogenlinie *hsp4*-GFP(*zcIs4*)V eingekreuzt (siehe Masterarbeit Hannah Vaupel). Damit konnte die ermittelte Stresstoleranz durch den *uba5 knock-out* visuell mit der *hsp4*-GFP Expression verknüpft werden. Der Einfluss verschiedener Stressoren auf die *hsp4*-Expression wurde in den Wurmlinien *uba5(ok3364)::hsp4*-GFP und *hsp4*-GFP miteinander verglichen. Zunächst wurde geprüft, ob der *uba5 knock-out* bereits ER-Stress hervorruft. Die Kultivierung der Würmer erfolgte hierfür unter Standardbedingungen bei 20°C, wobei eine geringe Steigerung der GFP-Fluoreszenz durch den *uba5 knock-out* zu beobachten ist (Abb. 41; K).

Weiterführend wurden Stressoren zur Analyse genutzt, welche zum Teil bereits zur Untersuchung der *uba5(ok3364)*-Überlebensrate verwendet wurden (Abb. 38). Die Spanne an Stressoren reicht hierbei von ER-, oxidativem-, Osmo-, UV- bis zu Hitze-Stress.

Als ER-Stressoren wurden Tunicamycin (5 µg/ml; 8 h) und DTT (10 mM, 16 h) verwendet. Unter Tunicamycin-Stress konnte eine Steigerung der *hsp4*-Expression in der *uba5*-Deletionsmutante im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 41; T). Die DTT-Untersuchungen wiesen im Gegensatz zum Tunicamycin-Stress eine hohe Variation in den GFP-Fluoreszenzen auf. Die Darstellung erfolgte daher durch die prozentuale Verteilung an hoch, mittel und niedrig fluoreszierenden Würmern im Vergleich zueinander (An und Blackwell 2003). Insgesamt liegt der prozentuale Anteil an stark leuchtenden Würmern der *uba5*-Deletionsmutante mit 73 % weit über dem der Kontrolle (25 %) unter DTT-Stress (Abb. 41; D).

Die Ergebnisse lassen eine geringe *hsp4*-GFP Fluoreszenzsteigerung unter Standardbedingungen auf Grund des *uba5 knock-outs* erkennen. Eine starke Fluoreszenzerhöhung durch den *uba5 knock-out* konnte unter Tunicamycin- und DTT-Stress ermittelt werden.

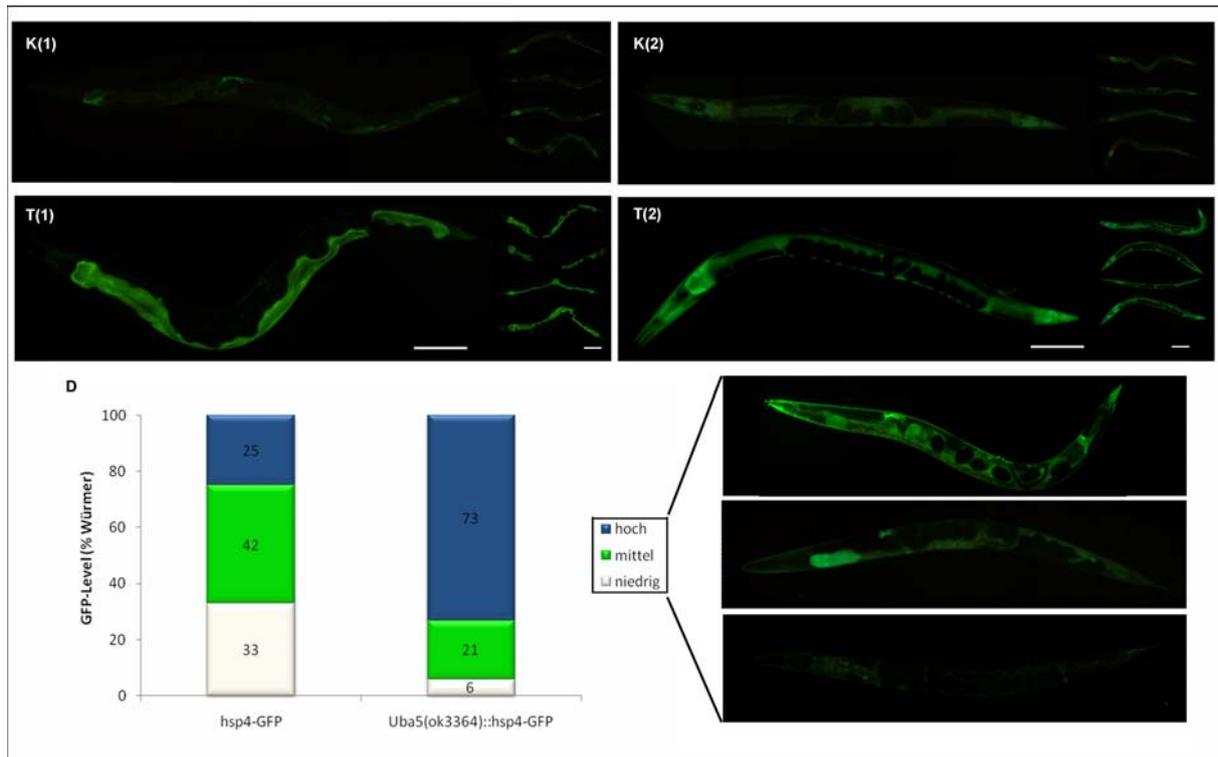


Abb. 41: Auswirkung des *uba5* knock-outs auf das *hsp4*-GFP Expressionsmuster unter Standardbedingungen und ER-Stressbedingungen. (3)

Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten adulter Hermaphroditen der Kontrolle (*hsp4*-GFP) (1) und der Kreuzung (*uba5(ok3364)::hsp4*-GFP) (2) unter Standardkultivierungsbedingungen (K) und unter Einfluss von ER-Stressoren wie (T) Tunicamycin: 5 μ g/ml, 8 h und (D) DTT: 10 mM, 16 h. Das Verhältnis der heterogenen Verteilung an hoch, mittel und niedrig fluoreszierenden Würmern unter DTT-Stress ist unter (D) aufgeführt. N = 30. Größenmaßstab: 100 μ m. Belichtungszeit 1,5 s.

Bereits durchgeführte Stresstoleranzuntersuchungen zeigten z.T. eine erhöhte Überlebensrate durch den *uba5* knock-out (Abb. 38). Diese Untersuchungen beinhalteten jedoch keine ER-Stressoren. Nachdem eine erhöhte *hsp4*-Expression auf Grund des *uba5* knock-outs unter ER-Stressbedingungen detektiert werden konnte, wurde die Überlebensrate unter ER-Stress nachträglich geprüft (Abb. 42).

Hierbei erfolgte die Exposition von *C. elegans* zunächst gegenüber Tunicamycin mit einer Konzentration von 40 μ g/ml über einen Zeitraum von 9 Tagen bei 20°C auf NGM-Platten. Die ermittelte Überlebensrate lag bei 48 % (*hsp4*-GFP = Kontrolle) zu 97,67 % (*uba5(ok3364)::hsp4*-GFP = Kreuzung). Weiterführend wurde die Überlebensrate bei einer DTT-Konzentration von 15 mM über eine Zeitspanne von 16 h bei 20°C untersucht. Eine Überlebensrate von 4,65 % (Kontrolle) zu 74,19 % (Kreuzung) konnte ermittelt werden.

Nach Berechnungen mit Hilfe des *student* t-Tests liegt eine hoch signifikant gesteigerte Überlebensrate ($p \leq 0,0001$) nach *uba5* knock-out sowohl bei Tunicamycin als auch bei DTT vor (Abb. 42).

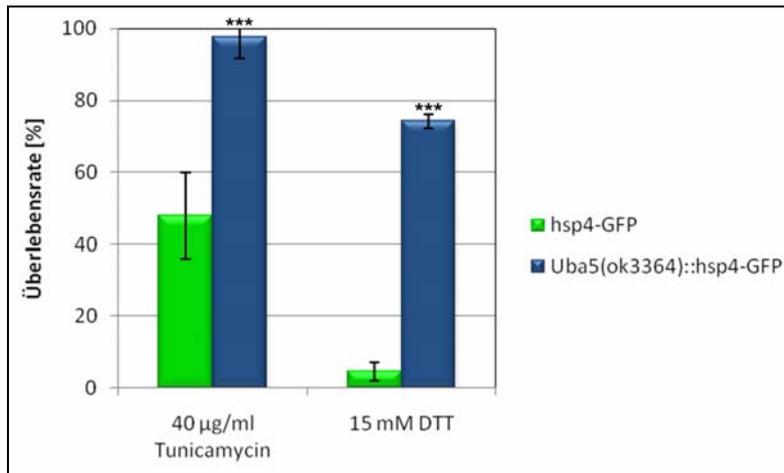


Abb. 42: Vergleich der Überlebensrate zwischen *hsp4*-GFP (Kontrolle) und *uba5(ok3364)::hsp4*-GFP (Kreuzung) unter ER-Stress. (3)

Zur Stress-Toleranzanalyse wurden die ER-Stressoren Tunicamycin (40 µg/ml, 9 Tage) und DTT (15 mM, 16 h) verwendet. Die Überlebensrate wurde als prozentualer Anteil der lebenden Würmer von der Gesamtzahl der Tiere auf den Platten berechnet. Würmer, die am Rand der Petrischale vertrockneten, wurden nicht in die Berechnungen einbezogen. Tunicamycin-Stress: 48 % *hsp4*-GFP, 97,67 % *uba5(ok3364)::hsp4*-GFP; DTT-Stress: 4,65 % *hsp4*-GFP, 74,19 % *uba5(ok3364)::hsp4*-GFP. Berechnungen des *student t*-Test lassen eine hoch signifikant gesteigerte Überlebensrate ($p \leq 0,0001$) auf Grund der *uba5*-Deletion unter den Stressoren Tunicamycin und DTT erkennen. N = 60.

Des Weiteren wurde der Einfluss von oxidativem Stress durch Juglon (0,1 mM, 16 h), Methylviologen/Paraquat (15 mM, 16 h) und tert-butyl Hydroperoxid (t-BOOH) (2,5 mM, 16 h) untersucht. Eine erhöhte *hsp4*-Expression unter Verwendung der drei oxidativen Stressoren konnte der *uba5*-Deletion zugeordnet werden. Im Vergleich zu t-BOOH und Paraquat erfolgte die stärkste GFP-Fluoreszenz Zunahme durch den Einfluss von Juglon (Abb. 43; J, B, P).

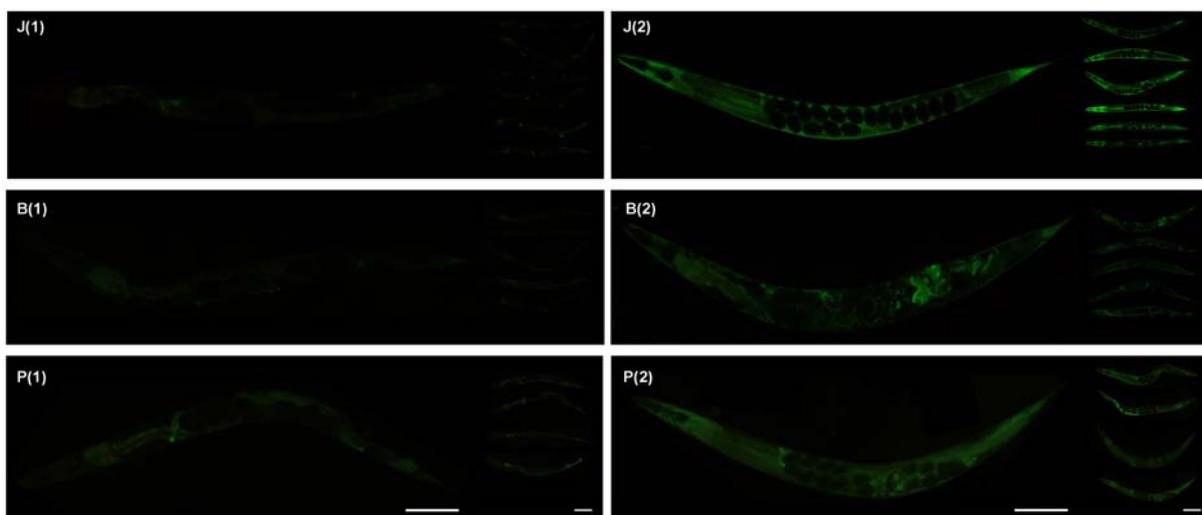


Abb. 43: Auswirkung des *uba5* knock-outs auf das *hsp4*-GFP Expressionsmuster unter oxidativem Stress. (3)

Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten adulter Hermaphroditen zwischen der Kontrolle (*hsp4*-GFP) (1) und der Kreuzung (*uba5(ok3364)::hsp4*-GFP) (2) unter den Stressoren (J) Juglon: 0,1 mM; 16 h, (B) t-BOOH: 2,5 mM 16 h und (P) Paraquat: 15 mM 16 h. Größenmaßstab: 100 µm. Belichtungszeit 1,5 s.

Abschließend erfolgten *hsp4*-Expressionsuntersuchungen bezüglich der Wirkung von Hitze- (34°C, 3h), Osmo- (200 mM NaCl, 6 h) und UV-Stress (10 Kilojoule, 254 nm, 1 min). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 44 dargestellt. Bei allen drei Stressoren konnte erneut eine Steigerung der *hsp4*-Expression auf Grund der *uba5*-Deletion beobachtet werden. UV-Stress bewirkte zudem eine erhöhte *hsp4*-Expression in den Embryonen von *C. elegans*, welche bei keinem anderen Stressor zu beobachten war.

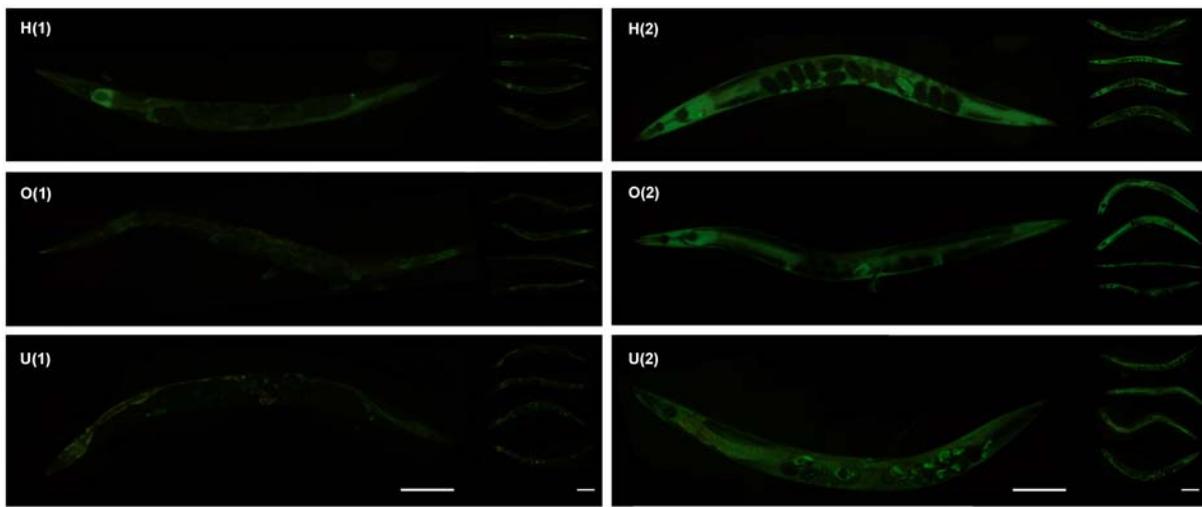


Abb. 44: Auswirkung des *uba5* knock-outs auf das *hsp4*-GFP Expressionsmuster unter Hitze-, Osmo- und UV-Stress. (3)

Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten adulter Hermaphroditen der Kontrolle (*hsp4*-GFP) (1) und der Kreuzung (*uba5(ok3364)::hsp4*-GFP) (2) unter den Stressoren (H) Hitze: 34°C; 3 h, (O) NaCl: 200mM; 6 h. (U) UV: 10 Kilojoule, 254 nm, 1 min. Größenmaßstab: 100 µm. Belichtungszeit 1,5 s.

Zusammenfassend ist unter normalen Kultivierungsbedingungen eine geringe Steigerung der *hsp4*-Expression auf den *uba5* knock-out zurückzuführen. Weiterführend lassen die Ergebnisse eine verstärkte *hsp4*-Expression auf Grund des *uba5* knock-outs unter Tunicamycin-, DTT-, Juglon-, t-BOOH-, Paraquat-, Hitze-, Osmo- und UV-Stress erkennen. Außerdem führte die *uba5*-Deletion zu einer verbesserten Überlebensrate unter Tunicamycin- und DTT-Stress.

3.5 Tunicamycin-Sensitivitäts-assay - *C. elegans* Entwicklung unter Tunicamycin-Stress

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Ufm1-Kaskade und dem UPR Signalweg aufzudecken wurde ein Tunicamycin-Sensitivitäts-assay durchgeführt. Die zeitliche Entwicklung von *C. elegans* stellte hierbei das zentrale Kriterium dar, und wurde unter Einfluss von Tunicamycin nach RNAi vermitteltem knock-down der Ufm1-Komponenten dokumentiert. Hierbei verwendete *C. elegans*-Linien umfassten den Wildtyp (N2 Bristol) und UPR-Deletionsmutanten.

Die UPR kennzeichnet sich durch drei Signalwege, wobei die zugehörigen ER-Signaltransduktoren in den Mutanten *ire-1(v33)*, *pek-1(ok275)* und *atf-6(ok551)* deletiert wurden. Kommt es zu einer geringen Entwicklungsverzögerung ($\leq 5\%$) nach einem *knock-down* der Ufm1-Komponenten im Vergleich zur Kontrolle (L4440), kann von einer Abhängigkeit des ER-Signaltransduktors und der Ufm1-Kaskade ausgegangen werden.

Entsprechend nach Darom *et al.* (2010) erfolgte hierzu die *C. elegans* Kultivierung auf RNAi-Platten mit dem jeweiligen RNAi-Konstrukt, wobei nach Erreichen des adulten Stadiums die Würmer axenisiert und die Eier der F1-Generation auf Tunicamycin-Stressplatten überführt wurden. Nun erfolgte die Dokumentation der Entwicklung der *C. elegans*-Stämme Wt, *pek-1(ok275)* und *atf-6(ok551)* nach einer Zeitspanne von 72 h bei 20°C. Da die Deletionsmutante *ire-1(v33)* unter Tunicamycin-Stress an sich eine stark verzögerte Entwicklung aufwies, erfolgte die Dokumentation nach 106 h (Zeitpunkt zu dem mind. 70 % der Kontrolle (L4440) adult war). Die Unterteilung der hierbei ausgezählten Würmer zur Entwicklungsbestimmung erfolgte in zwei Kategorien. Die erste Gruppe bestand aus L1 - L4 Larven, während die zweite Gruppe durch jung adulte bis adulte Tiere definiert wurde. Das Verhältnis der beiden Gruppen zueinander wurde zwischen Kontrolle (L4440) und *knock-down* der Ufm1-Komponenten (*ufm1*, *uba5*, *ufl1* und *ufbp1*) in den entsprechenden *C. elegans*-Stämmen miteinander verglichen. Ein Verhältnisunterschied von $\leq 5\%$ in der Entwicklung wurde als Indikator einer Abhängigkeit des entsprechenden ER-Stress Signaltransduktoren zur Ufm1-Kaskade definiert. Pro Tunicamycin-Konzentration und RNAi-Konstrukt wurden 10 NGM-Platten verwendet und in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

Zur Entwicklungsbestimmung wurden 2 µg/ml Tunicamycin verwendet. Dies erwies sich, wie auch bei Darom *et al.* (2010) beschrieben, als die sensitivste, und damit aussagekräftigste Konzentration. Eine Tunicamycin-Konzentration von 0 µg/ml wurde in diesen Untersuchungen verwendet, um einen potentiell entwicklungsstörenden Effekt auf Grund des *knock-down* der jeweiligen Ufm1-Komponenten zu identifizieren. Die starke entwicklungsstörende Wirkung des Stressors selbst wurde durch eine Tunicamycin-Konzentration von 5 µg/ml veranschaulicht.

Um eine Abhängigkeit der UPR zur Ufm1-Kaskade zu identifizieren, musste zunächst geprüft werden, ob der Wt einen Entwicklungsunterschied bei ER-Stress nach *knock-down* der einzelnen Ufm1-Komponenten (*ufm1*, *ufl1* und *ufbp1*) im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Die Deletionsmutante *uba5(ok3364)* konnte hierbei direkt mit dem Wt unter ER-Stress verglichen werden. Große Verhältnisunterschiede ($> 5\%$) zur entsprechenden Kontrolle wurden in der Wt-Entwicklung festgestellt (Abb. 45). Somit war die Grundlage zu weiteren Analysen

gegeben, da der *knock-down* von Ufm1-Komponenten die Entwicklung im Wt unter Tunicamycin-Stress beeinflusste.

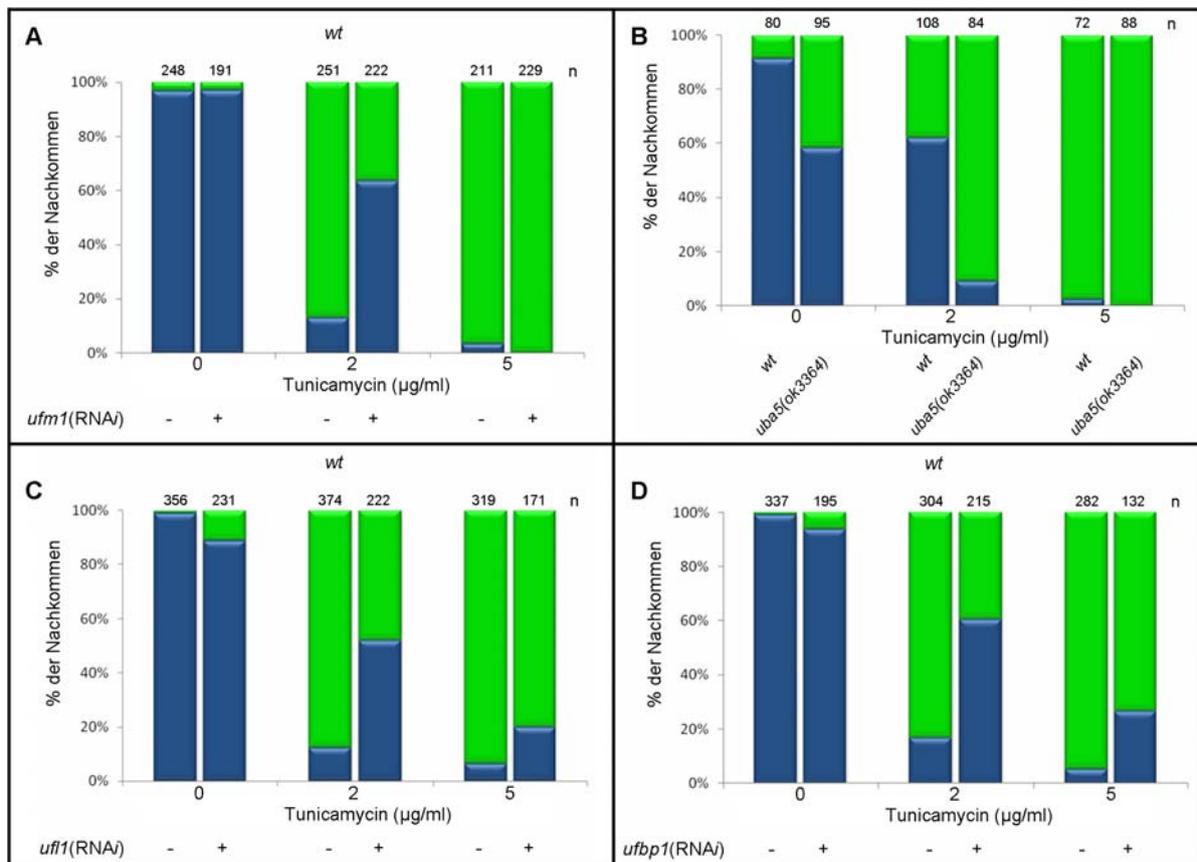


Abb. 45: Tunicamycin-Sensitivitäts-assay im Wildtyp (N2). (3, 4, 5)

RNAi vermittelter Vergleich zwischen (A) *ufm1* RNAi (+), (C) *ufl1* RNAi (+), (D) *ufbp1* RNAi (+) und dem Leervektor L4440 (-). Die Entwicklung der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* wurde direkt mit dem Wildtyp verglichen (B). Die verwendeten Tunicamycin-Konzentrationen sind unter dem Balkendiagramm angegeben. Die Entwicklungsstadien wurden nach 72 h bei 20°C dokumentiert. Das Verhältnis der Gruppen (L1 - L4 = grün; jung Adult - Adult = blau) zueinander ist im Balkendiagramm als die prozentuale Verteilung der Gesamtzahl an eingesetzten Tiere dargestellt (n = Gesamtzahl an Tieren von 10 Platten in drei unabhängigen Experimenten). Es liegt kein Verhältnisunterschied von $\leq 5\%$ vor.

Daraufhin wurde der Einfluss nach *knock-down* der Ufm1-Komponenten (*ufm1*, *uba5*, *ufl1* und *ufbp1*) auf die Entwicklung der Deletionsmutanten *ire-1(v33)*, *pek-1(ok275)* und *atf-6(ok551)* unter ER-Stress geprüft. Dabei zeigten sich in den Mutanten *ire-1(v33)* und *atf-6(ok551)* Verhältnisunterschiede von $> 5\%$ in der Entwicklung bei allen RNAi Ansätzen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 46 & Abb. 47). Somit ist nach diesen Ergebnissen davon auszugehen, dass keine Abhängigkeit der Ufm1-Kaskade von den ER-Signaltransduktoren Ire-1 und ATF6 vorliegt.

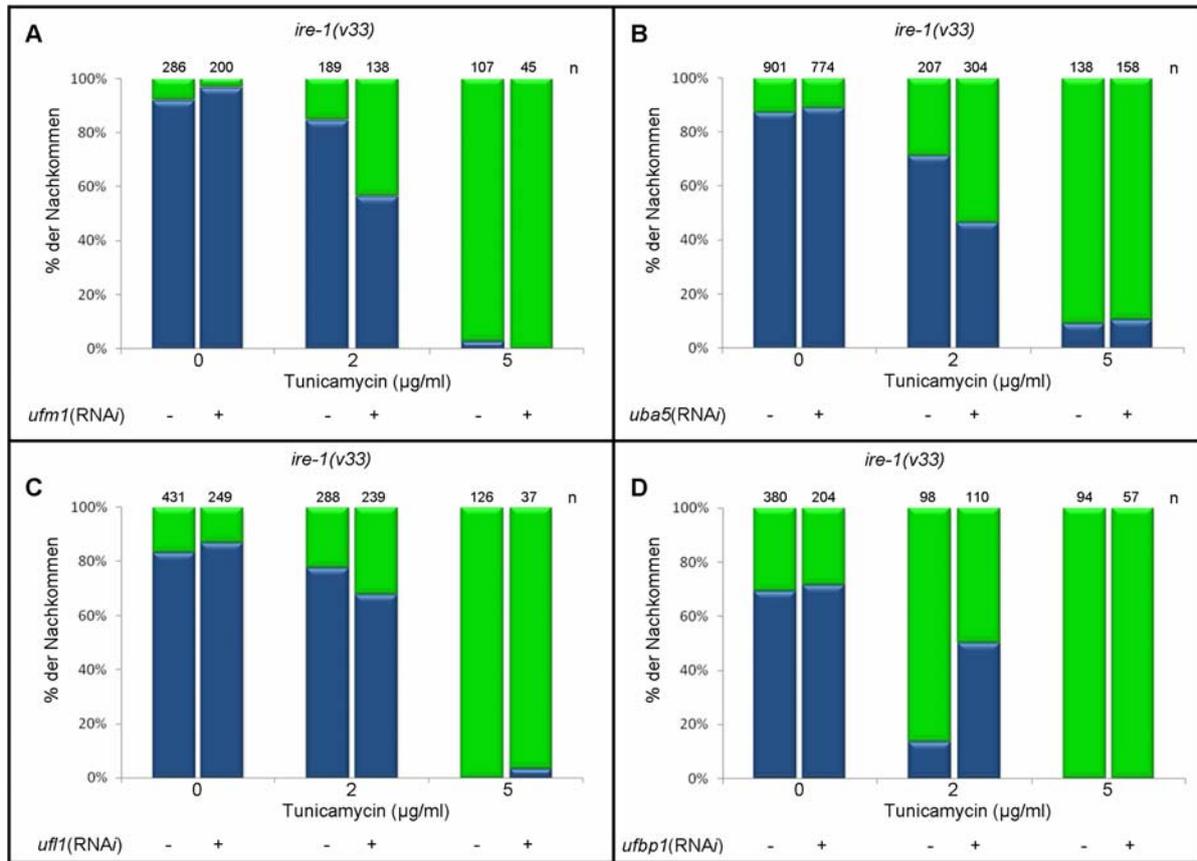


Abb. 46: Tunicamycin-Sensitivitäts-assay in der Deletionsmutante *ire-1(v33)*. (3, 4, 5)

Die Entwicklung von *ire-1(v33)* nach *knock-down* (+) von *ufm1* (A), *uba5* (B), *ufl1* (C) und *ufbp1* (D) wurde mit dem Leervektor L4440 (-) unter den dargestellten Tunicamycin-Konzentrationen verglichen. Die Entwicklungsstadien wurden nach 106 h bei 20°C dokumentiert. Das Verhältnis der Gruppen (L1 - L4 = grün; jung Adult - Adult = blau) zueinander ist im Balkendiagramm als die prozentuale Verteilung der Gesamtzahl an eingesetzten Tieren dargestellt (n = Gesamtzahl an Tieren von 10 Platten in drei unabhängigen Experimenten). Es ist kein Verhältnisunterschied von $\leq 5\%$ zu erkennen.

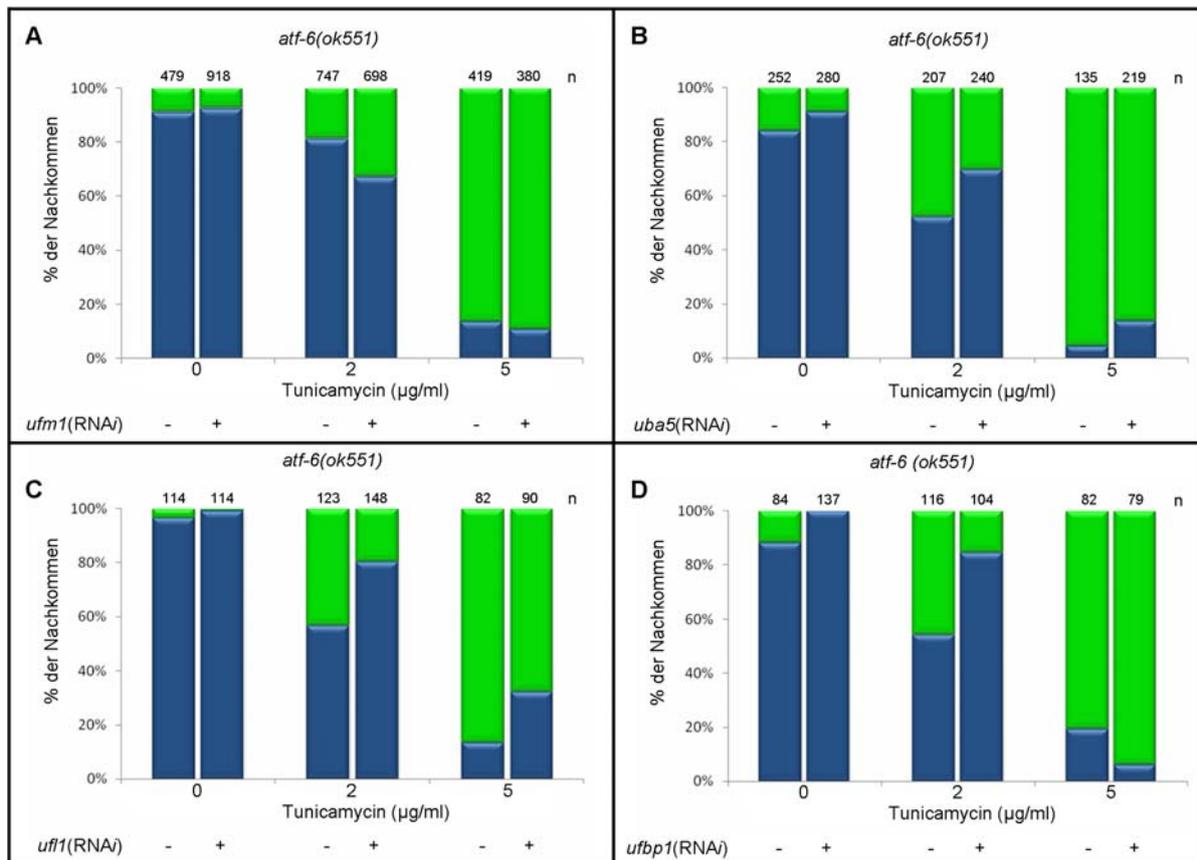


Abb. 47: Tunicamycin-Sensitivitäts-assay in der Deletionsmutante *atf-6(ok551)*. (3, 4, 5)

Die Entwicklung von *atf-6(ok551)* nach *knock-down* (+) von *ufm1* (A), *uba5* (B), *ufl1* (C) und *ufbp1* (D) wurde mit dem Leervektor L4440 (-) unter den dargestellten Tunicamycin-Konzentrationen verglichen. Die Entwicklungsstadien wurden nach 72 h bei 20°C ausgezählt. Das Verhältnis der Gruppen (L1 - L4 = grün; jung Adult - Adult = blau) zueinander ist im Balkendiagramm als die prozentuale Verteilung der Gesamtzahl an eingesetzten Tieren dargestellt (n = Gesamtzahl an Tieren von 10 Platten in drei unabhängigen Experimenten). Kein Verhältnisunterschied von $\leq 5\%$ ist zu erkennen.

Einzig bei der Deletionsmutante *pek-1(ok275)* konnte ein Verhältnisunterschied in der Entwicklung von $\leq 5\%$ beim *knock down* von *ufm1*, *uba5* und *ufl1* im Vergleich zur Kontrolle (L4440) dokumentiert werden (Abb. 48). Hingegen weist der *knock down* von *ufbp1* einen Verhältnisunterschied von mehr als 5% auf. Da *Ufbp1* ein potenciales Substrat der *Ufm1*-Kaskade ist, und nicht ein Kernelement des *Ufm1*-Signalwegs darstellt, ist ein abweichendes Verhalten durchaus möglich.

Abschließend lässt sich festhalten, dass nach diesen Ergebnissen die *Ufm1*-Kaskade in *C. elegans* im gleichen genetischen Signalweg agiert wie *Pek-1*.

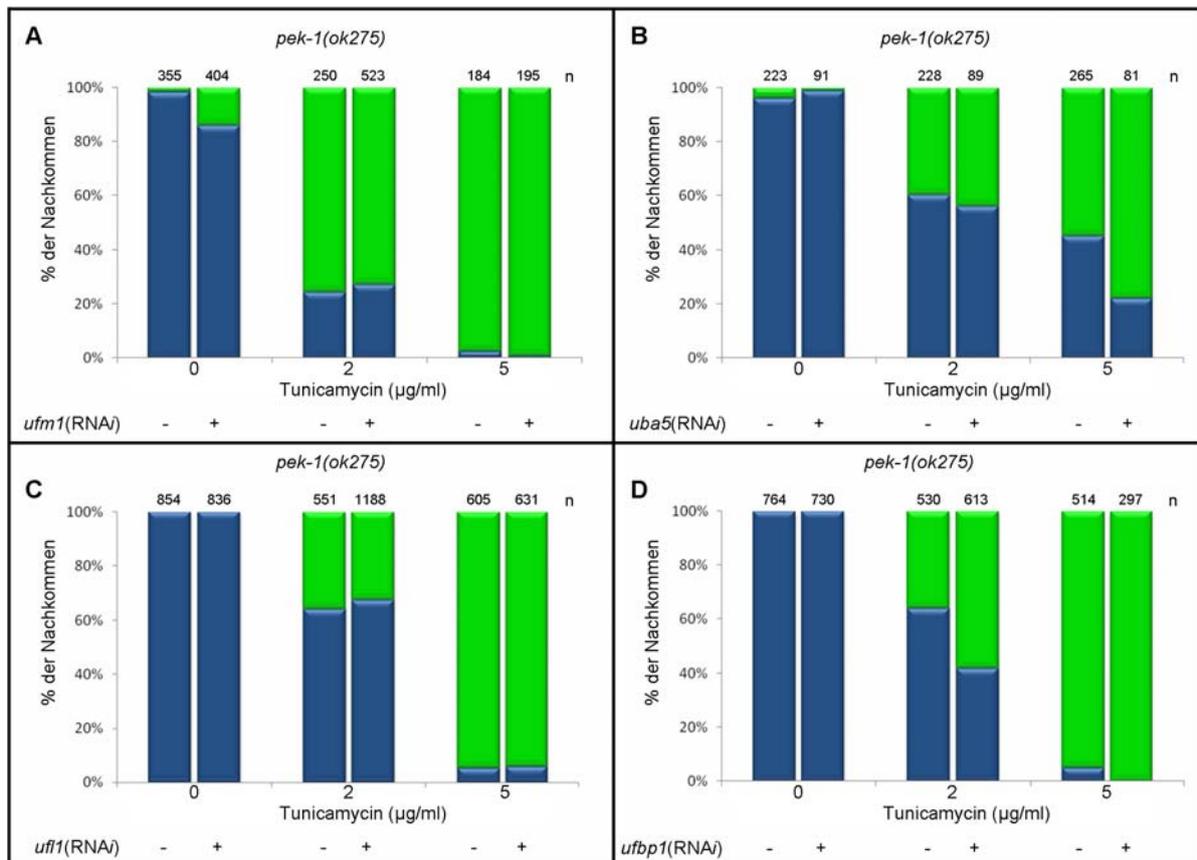


Abb. 48: Tunicamycin-Sensitivitäts-assay in der Deletionsmutante *pek-1(ok275)*. (3, 4, 5)
 Die Entwicklung von *pek-1(ok275)* nach *knock-down* (+) von *ufm1* (A), *uba5* (B), *ufl1* (C) und *ufbp1* (D) wurde mit dem Leervektor L4440 (-) unter den dargestellten Tunicamycin-Konzentrationen verglichen. Die Entwicklungsstadien wurden nach 72 h bei 20°C dokumentiert. Das Verhältnis der Gruppen (L1 - L4 = grün; jung Adult - Adult = blau) zueinander ist im Balkendiagramm als die prozentuale Verteilung der Gesamtzahl an eingesetzten Tieren dargestellt (n = Gesamtzahl an Tieren von 10 Platten in drei unabhängigen Experimenten). Ein Verhältnisunterschied von $\leq 5\%$ liegt in (A), (B) und (C) vor.

3.6 Microarray-Analyse der Deletionsmutante *uba5(ok3364)*

Die Microarray-Untersuchungen ermöglichen die Expressionsanalyse des gesamten Transkriptoms. Transkriptom-Unterschiede der Mutante *uba5(ok3364)* im Vergleich zum Wt wurden mittels Microarray untersucht. Neben der Standardkultivierung bei 20°C wurde hierbei zusätzlich der Einfluss von Tunicamycin (5 µg/ml) und leichtem Hitzestress (25°C) auf Transkriptomebene der beiden *C. elegans*-Linien während der gesamten Kultivierung geprüft. Synchronisierte Wurmkulturen wurden den Bedingungen entsprechend bis zum Erreichen des adulten Stadiums kultiviert und lysiert, wobei die Gesamt-RNA der Würmer isoliert wurde. Die Probenvorbereitung ist dem Methoden-Teil zu entnehmen (siehe 2.2.10.1). Unter Verwendung von RNA nanochips konnte daraufhin die RNA-Qualität bestimmt werden. Biologische Replikate wurden von jeder zu untersuchenden Bedingung der beiden *C. elegans*-Linien angefertigt. Mindestens zwei Proben mit einer RIN (*RNA Integrity Number*) > 9 oder

einem vergleichbaren Elektropherogramm wurden in den Microarray-Analysen verwendet. Die Normalisierung der Rohdaten, sowie die Abgrenzung von WT und *uba5(ok3364)* in eine jeweilige Gruppe unter Verwendung der *principal component analysis* (PCA), sind der Masterarbeit von Jens Daniel zu entnehmen.

Als verändert konnten 31.844 der insgesamt 43.603 Microarray Gen-Sonden gewertet werden. Unter Berücksichtigung der einzelnen Gruppen zueinander lagen in bis zu 11.000 Gen-Sonden Unterschiede vor. Alle Gen-Sonden, die unter Standardkultivierungsbedingungen (20°C) eine erhöhte Wt-Expression im Vergleich zu *uba5(ok3364)* aufwiesen, werden durch $Wt > uba5(ok3364)$ in Tab. 11 ausgedrückt. Der reziproke Zustand ist mit $Wt < uba5(ok3364)$ gekennzeichnet. Ein Expressionsunterschied der um den Faktor 2 (FC2) im Vergleich der Gruppen zueinander vorliegt lässt ein Verhältnis von 2:1 zugunsten des Wt erkennen. Allerdings verschiebt sich dieses Verhältnis bei Betrachtung der Genexpression ab einen Faktor von mindestens 5 (FC5 1:3) und 10 (FC10 1:4).

Tab. 11: Genvergleich zwischen Wt und *uba5(ok3364)* bei 20°C. (4)

Vergleich	FC2	FC5	FC10
$Wt > uba5(ok3364)$	6965	223	49
$Wt < uba5(ok3364)$	3846	630	212

Der Einfluss von Tunicamycin und leichtem Hitzestress auf das Transkriptom von *uba5(ok3364)* bzw. Wt ist wesentlich geringer einzuordnen als die Unterschiede der beiden Genotypen an sich. Hierzu sind in Abb. 49 die Expressionsunterschiede ab mindestens einem Faktor von 10 (FC10) unter den einzelnen Bedingungen dargestellt.

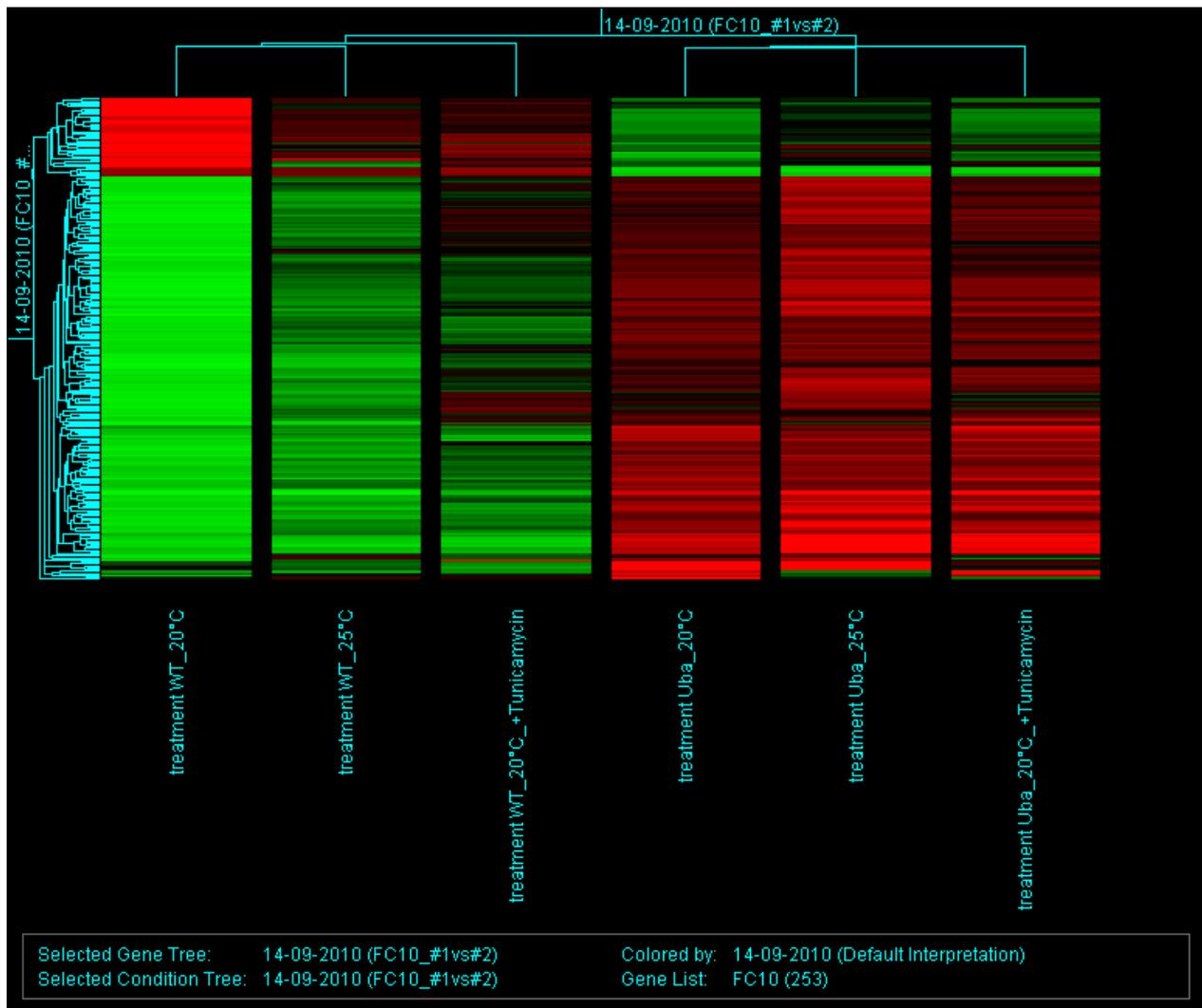


Abb. 49: Genexpressionsunterschiede zwischen Wt und *uba5(ok3364)*. (4)

Alle Gen-Sonden, die einen Unterschied um mindestens den Faktor 10 (FC10) in den beiden Gruppen Wt und *uba5(ok3364)* aufwiesen, sind dargestellt. Zu jeder Gruppe sind die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen mit aufgeführt (20°C, 25°C, Tunicamycin 5 µg/ml). Eine erhöhte Expression wird in rot und eine verringerte Expression in grün visualisiert. Die Intensitätsunterschiede lassen jeweils den Grad der Expressionsreduktion bzw. Expressionssteigerung erkennen.

3.6.1 Analyse zur Genexpression der Ufm1-Kaskade und deren Partner in der Deletionsmutante *uba5(ok3364)*

Das Expressionsverhalten von Komponenten der Ufm1-Kaskade sowie deren Interaktionspartner Ufbp1, Kel-8 und CDK5Rap3 wurde untersucht. Hierbei erfolgte die Analyse lediglich der Sonden, die zwischen Wt und *uba5(ok3364)* unter Standardbedingungen eine unterschiedliche Expression um mindestens den Faktor 2 (FC2) aufwiesen. Es zeigte sich durch drei Gen-Sonden des Microarray eine deutliche Reduktion (FC (fold change) 8) der *uba5*-Genexpression in der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* (Abb. 50). Die einzige weitere Komponente der Ufm1-Kaskade, die im Rahmen dieser Untersuchungen einen nennenswerten Unterschied darstellte, war die Ufm1-spezifische

Protease UfSP2. Die weiteren Komponenten der Ufm1-Kaskade wiesen entweder keine Unterschiede auf oder waren in den Untersuchungen nicht zu finden. Wie auch die Interaktionspartner der Ufm1-Kaskade, *kel-8* und *cdk5rap3*, wies *ufsp2* eine Reduktion in der Genexpression in allen *uba5(ok3364)*-Proben auf (Abb. 50).

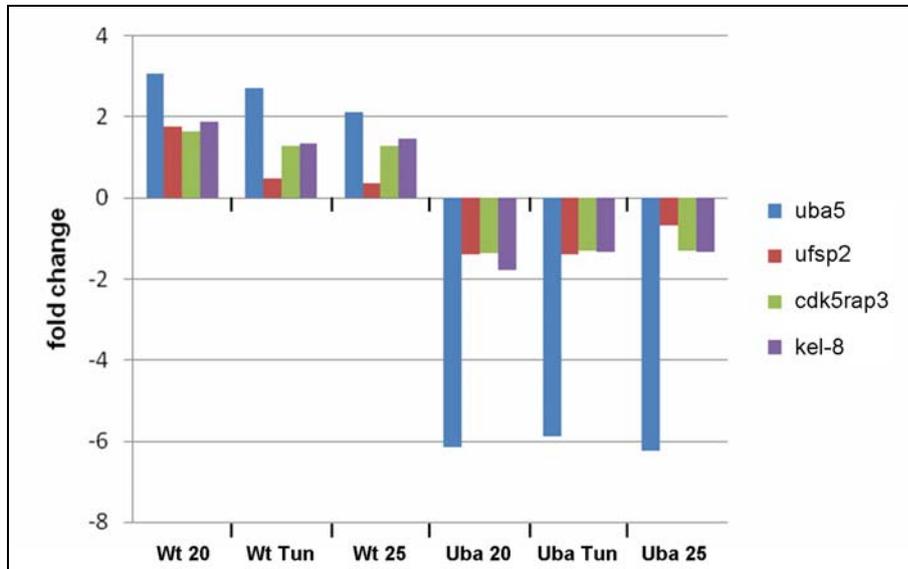


Abb. 50: Expressionsanalyse von Komponenten der Ufm1-Kaskade. (4)

Die Genexpression von *uba5* (3 Sonden), *cdk5rap3* (5 Sonden), *kel-8* (2 Sonden) und *ufsp2* (3 Sonden) wurde untersucht. Dargestellt ist die gemittelte Expressionsänderung (*fold change*) der einzelnen Gruppen. Wt 20: Wildtyp bei 20°C kultiviert, Wt Tun: Wildtyp bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert, Wt 25: Wildtyp bei 25°C kultiviert, Uba 20: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C kultiviert, Uba Tun: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert, Uba 25: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 25°C kultiviert.

3.6.2 Analyse zur verringerten Reproduktionsrate der Mutante *uba5(ok3364)* auf Transkriptomebene

Die ermittelte reduzierte Reproduktionsrate der Mutante (Abb. 36) kann sowohl auf eine geringere Produktion von Eiern, Störungen in der Eiablage und embryonale Letalität zurückzuführen sein.

Zumindest eine Veränderung in der Eiproduktion lässt sich direkt auf Transkriptomebene durch die hierfür essentielle Expression von Eidotterproteinen (Vitellogeninen) aufzeigen. Es konnte eine verminderte Genexpression von *vit-1*, *-3* und *-4* in *uba5(ok3364)* ermittelt werden (Tab. 12). Die weiteren Vitellogenine konnten in den Untersuchungen nicht identifiziert werden.

Tab. 12: Expressionsänderung der Vitellogenin Gene *vit-1*, -3 und -4. (4)

	Wt 20	Wt Tun	Wt 25	Uba 20	Uba Tun	Uba 25
<i>vit-1</i>	1,28	1,38	1,45	-1,67	-1,32	-1,25
<i>vit-3</i>	1,48	1,32	1,35	-1,45	-1,25	-1,14
<i>vit-4</i>	1,22	1,22	1,48	-1,90	-1,52	1,08

3.6.3 Analyse zur Tunicamycin- und Hitze-Stress Resistenz der Mutante *uba5(ok3364)* auf Transkriptomebene

Tunicamycin stellt einen äußerst effektiven ER-Stressor dar, dessen Wirkung auf das ER beschränkt ist. Die UPR wird als Folge der Stressbedingungen im ER aktiviert und charakterisiert sich durch die drei Signaltransduktoren, Pek-1, Atf-6, Ire-1 inklusive dem zugehörigen Transkriptionsfaktor Xbp-1 und dem Ubiquitin-abhängigen Abbau fehlgefalteter Proteine durch das ERAD-System (Mori 2009). Ire-1 und Xbp-1 stellen in *C. elegans* den bedeutendsten Weg der UPR dar. Es konnte keine Steigerung der Genexpression unter Stressbedingungen beobachtet werden. Stattdessen ist eine verminderte Genexpression von *ire-1* und *xbp-1* unter allen Bedingungen in *uba5(ok3364)* zu beobachten. Einzig unter leichtem Hitzestress wurde in der Mutante *uba5(ok3364)* eine dem Wt ähnliche *xbp-1* Genexpression ermittelt (Abb. 51). Das ERAD System sowie die beiden anderen Signaltransduktoren *pek-1* und *atf-6* wiesen keine Unterschiede in den Transkriptom-Analysen auf (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnten Unterschiede in der Genexpression von mehreren *abu*-Genen aufgezeigt werden. Der ABU-Signalweg (*Activated by Blocked UPR*) wird, wie der Name schon sagt, bei einer gestörten UPR aktiviert (Urano *et al.* 2002). So konnte sowohl im Wt als auch in *uba5(ok3364)* eine verstärkte Genexpression vieler *abu*-Gene unter Tunicamycin-Stress festgestellt werden. Generell ist eine verminderte Expression bei allen Bedingungen in *uba5(ok3364)* zu beobachten (Tab. 13). Lediglich *abu-8* weist eine erhöhte Genexpression in *uba5(ok3364)* auf.

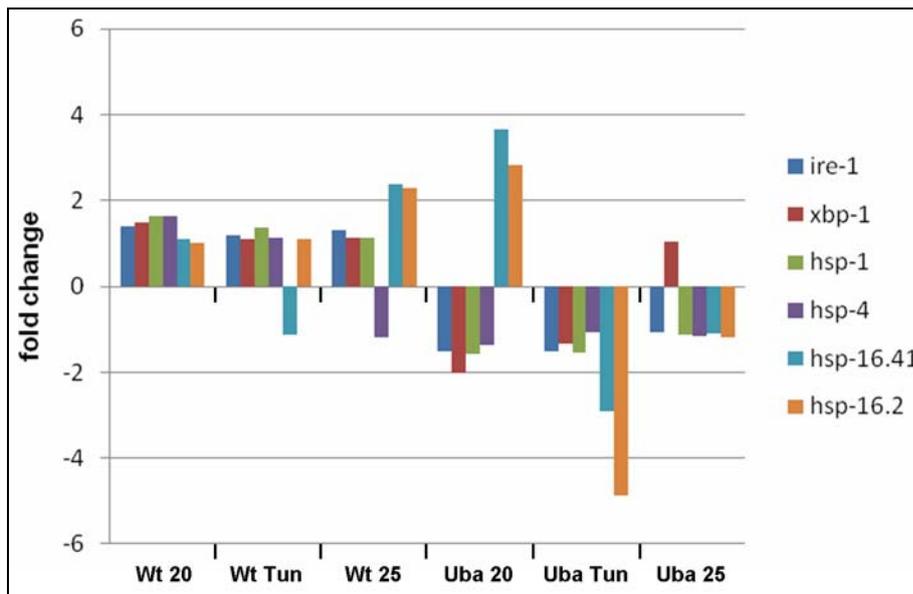


Abb. 51: Expressionsanalyse der UPR-Komponenten und hsp. (4)

Die Genexpression von *ire-1* (1 Sonde), *xbp-1* (2 Sonden), *hsp-1* (6 Sonden), *hsp-4* (1 Sonde), *hsp-16.2* (3 Sonden) und *hsp-16.41* (2 Sonden) wurde untersucht. Die gemittelte Expressionsänderung (*fold change*) der einzelnen Gruppen ist dargestellt. Wt 20: Wildtyp bei 20°C kultiviert, Wt Tun: Wildtyp bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert, Wt 25: Wildtyp bei 25°C kultiviert, Uba 20: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C kultiviert, Uba Tun: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert, Uba 25: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 25 °C kultiviert.

Tab. 13: Expressionsänderung der *abu*-Gene 1, 3, 5, 6, 7, 8 und 11. (4)

	Wt 20	Wt Tun	Wt 25	Uba 20	Uba Tun	Uba 25
<i>abu-1</i>	-2,33	7,42	0,00	-1,06	1,12	-1,06
<i>abu-3</i>	3,82	1,52	-1,20	-1,07	1,51	-1,15
<i>abu-5</i>	2,09	1,08	-1,52	-1,31	1,03	-2,10
<i>abu-6</i>	0,00	2,41	0,00	-1,31	1,09	0,00
<i>abu-7</i>	0,00	2,65	0,00	-1,34	1,16	1,21
<i>abu-8</i>	-4,54	2,37	0,00	-1,35	4,46	2,37
<i>abu-11</i>	0,00	2,03	0,00	-1,54	1,25	0,00

Ebenso wie Tunicamycin führt Hitzestress zur verstärkten Akkumulierung von fehlgefalteten Proteinen im ER und löst die UPR aus. Hitzestress an sich induziert allerdings auch die Expression von verschiedenen Genen, die dem Schutz der Zelle unter den erhöhten Temperaturbedingungen dienen (Sharp *et al.* 1999). Diese Gruppe der Hitze-induzierbaren Proteine, die sogenannten *heat shock proteins (hsp)*, kennzeichnet sich häufig durch Chaperone, welche bei der nativen Rückfaltung fehlgefalteter Proteine helfen. Es konnten lediglich vier unterschiedlich exprimierte *hsp*s (*hsp-1*, *hsp-4*, *hsp-16.2*, *hsp-16.41*) in den Transkriptom-Analysen ermittelt werden (Abb. 51). Ungewöhnlicherweise ist keine verstärkte Expression unter Stressbedingungen sowohl im Wt als auch in *uba5(ok3364)* zu beobachten. Bis auf eine erhöhte Genexpression von *hsp-16.2* und *hsp-16.41* in der Deletionsmutante

uba5(ok3364) unter Standardbedingungen weist die Analyse unter allen Bedingungen eine verminderte *hsp* Genexpression in *uba5(ok3364)* auf.

Zusammenfassend ist anzumerken, dass die Genexpression der ER-Signaltransduktoren und der meistens *hsps* reduziert in der Mutante *uba5(ok3364)* vorliegt.

3.6.4 Analyse zur oxidativen-Stress Resistenz der Mutante *uba5(ok3364)* auf

Transkriptomebene

In bereits dargestellten Experimenten konnte eine erhöhte oxidative Stress-Toleranz, induziert durch den Stressor Juglon beobachtet werden (Abb. 38). Die Resistenz gegenüber oxidativem Stress bzw. ROS (*Reactive Oxygen Species*) wird in *C. elegans* maßgeblich durch die Aktivität des Insulin-ähnlichen Daf-2 Signalwegs vermittelt (Braeckman *et al.* 2001). Genexpressions-Unterschiede im Daf-2 Signalweg sollen daher Aufschluss zur veränderten oxidativen Stress-Resistenz geben. Auf Grund der großen Menge an beteiligten Komponenten in diesem Signalweg sind lediglich Genexpressionsunterschiede der vier wichtigsten Bestandteile graphisch dargestellt (Abb. 52), wobei die Änderungen aller identifizierten Komponenten in Tab. 14 aufgeführt sind. Ungewöhnlicherweise konnte im Gegensatz zu Standardbedingungen eine verminderte Expression der Gene im Wt unter Stress beobachtet werden. In *uba5(ok3364)* sind bis auf *daf-10* alle untersuchten Gene verringert exprimiert.

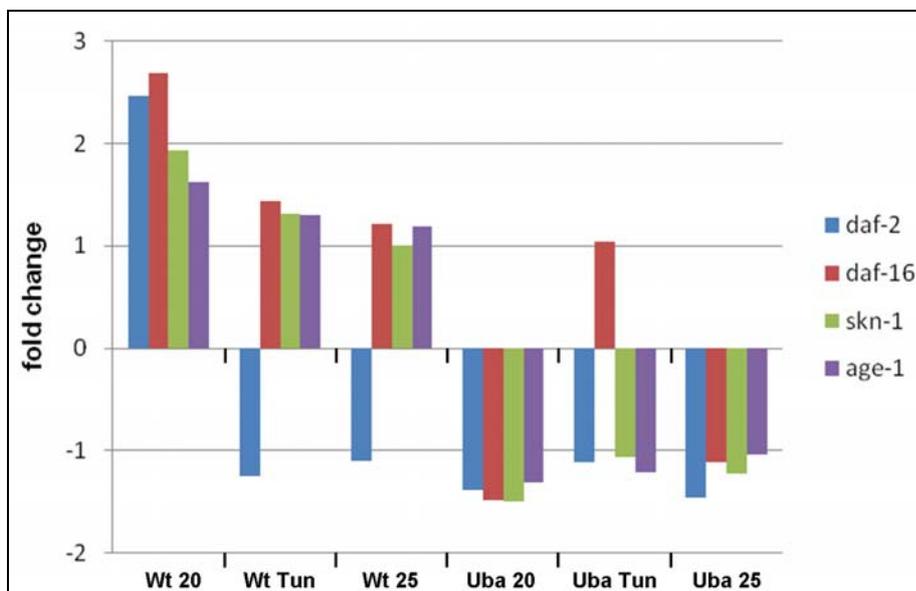


Abb. 52: Expressionsanalyse des Daf-2 Signalwegs. (4)

Es ist die gemittelte Expressionsänderung (*fold change*) der Gene *daf-2*, *daf-16*, *skn-1* und *age-1* dargestellt. Wt 20: Wildtyp bei 20°C kultiviert, Wt Tun: Wildtyp bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert, Wt 25: Wildtyp bei 25°C kultiviert, Uba 20: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C kultiviert, Uba Tun: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert, Uba 25: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 25°C kultiviert.

Ein Verlust von Daf-2 konnte in einer Daf-2 Null-Mutante mit einem differenzierten Expressionsmuster der *dao*-Gene (*dauer or aging adult overexpression*) assoziiert werden, wobei *dao-2*, *-3*, *-4*, *-8* und *-9* hierbei reduziert und *dao-5*, *-6* und *-7* verstärkt exprimiert wurden (Yu und Larsen 2001). Die Transkriptom-Analysen sind in Tab. 14 dargestellt und weisen ein teils gegensätzliches Expressionsmuster zu den Untersuchungen von Yu und Larsen (2001) auf, welches auf eine verstärkte Daf-2 Aktivität hindeutet (Abb. 52).

Nach den Transkriptom-Analysen bezüglich oxidativen Stress ist eine Reduktion des Daf-2 Signalwegs und eine differenzierte Expression der *dao*-Gene zu erkennen.

Tab. 14: Expressionsänderungen des Daf-2 Signalwegs und der *dao*-Gene. (4)

	Wt 20	Wt Tun	Wt 25	Uba 20	Uba Tun	Uba 25
Daf-2 Signalweg						
<i>aap-1</i>	1,52	1,1	1,24	-1,37	-1,63	-0,97
<i>age-1</i>	1,62	1,3	1,19	-1,31	-1,21	-1,04
<i>akt-1</i>	1,64	1,34	1,34	-1,24	-1,33	-1,12
<i>daf-2</i>	2,47	-1,25	-1,1	-1,39	-1,11	-1,46
<i>daf-10</i>	-1,28	-1,08	-1,33	1,66	1,91	1,79
<i>daf-16</i>	2,69	1,44	1,22	-1,49	1,04	-1,11
<i>hlh-13</i>	0	0	0	2,05	2,15	1,83
<i>skn-1</i>	1,93	1,31	1	-1,5	-1,07	-1,22
<i>wdr-23</i>	1,61	1,08	1,36	-1,38	-1,38	-0,98
dao-Gene						
<i>dao-2</i>	-5,88	-1,02	1,01	1,26	-1,01	1,96
<i>dao-5</i>	2,01	1,25	-1,38	-1,66	-1,34	-1,54
<i>Dao-4</i>	-1,91	7,92	2,63	-2,20	-1,15	-1,44
<i>Dao-9</i>	-1,92	1,17	1,02	1,06	-1,15	2,34
<i>Dao-7</i>	1,77	1,34	1,03	-1,30	-1,04	-1,27

3.6.5 Analyse zur verminderten Cadmium-Resistenz der Mutante *uba5(ok3364)* auf Transkriptomebene

Der Schutz vor Cadmium-Stress wird durch verschiedene Proteine in *C. elegans* bewerkstelligt. Beispielsweise vermittelt der Interaktionspartner der Ufm1-Kaskade Kel-8 die Stressantwort durch die MAP-Kinase Mek-1. In diesem Zusammenhang ist auch Y46G5A.24 zu nennen, welches über Kel-8 und Mek-1 in der Cadmium-Stressantwort reguliert wird (Cui *et al.* 2007). *kel-8* und *mek-1* zeigten eine reduzierte Genexpression in allen *uba5(ok3364)*-Proben, während Y46G5A.24 keine Unterschiede in den Analysen aufwies (Abb. 53). Nach Cui *et al.* (2007) sind *gst38*, *cdr-1*, *mtl-1* und *mtl-2* an der Cadmium-Stressantwort beteiligt. Allerdings konnten lediglich Expressionsunterschiede der Metallothioneine *mtl-1* und *mtl-2* in den Analysen ermittelt werden. Einzig *mtl-1* wies eine äußerst hohe Genexpression unter leichtem Hitzestress (25°C) im Wt auf, während diese Steigerung der *mtl-1* Expression

wesentlich geringer in der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* zu beobachten war (Abb. 53). Weiterführend wird der Schutz gegen Schwermetall in *C. elegans* auch durch die beiden Gene *numr-1* und *numr-2* (*nuclear localized metal responsive*) vermittelt (Tvermoes *et al.* 2010). In den Untersuchungen konnte ausschließlich *numr-1* mit Unterschieden in der Genexpression detektiert werden. Hierbei zeigte *numr-1* eine besonders starke Genexpression unter Standardbedingungen (20°C) wie auch unter leichtem Hitzestress (25°C) in *uba5(ok3364)* (Abb. 53).

Zusammenfassend ist die verminderte Expression von *kel-8* und *mek-1* sowie die stark erhöhte *numr-1* Expression der Mutante *uba5(ok3364)* zu erwähnen.

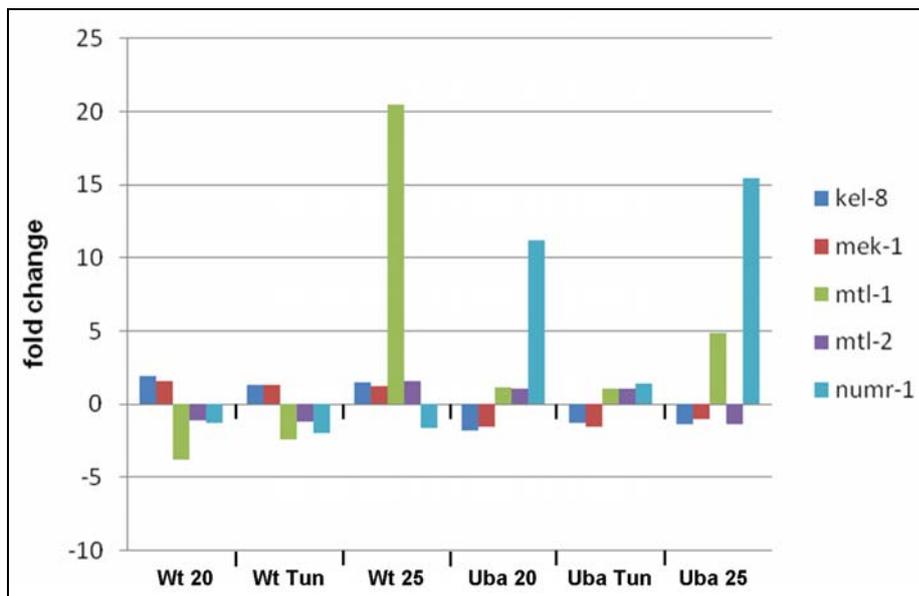


Abb. 53: Expressionsanalyse der Cadmium-Stressantwort. (4)

Die Genexpression von *kel-8* (2 Sonden), *mek-1* (1 Sonde), *mtl-1* (1 Sonde), *mtl-2* (1 Sonden) und *numr-1* (2 Sonden) wurde untersucht. Die gemittelte Expressionsänderung (*fold change*) der einzelnen Gruppen ist dargestellt. Wt 20: Wildtyp bei 20°C kultiviert, Wt Tun: Wildtyp bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert, Wt 25: Wildtyp bei 25°C kultiviert, Uba 20: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C kultiviert, Uba Tun: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert., Uba 25: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 25°C kultiviert.

3.6.6 Analyse zur *Bacillus thuringiensis*-Stress Resistenz der Mutante *uba5(ok3364)* auf Transkriptomenebene

Stress-Toleranzuntersuchungen konnten eine erhöhte Resistenz gegenüber den von *B. thuringiensis* gebildeten *Cry*-Toxinen in *uba5(ok3364)* feststellen (Abb. 38). Verschiedene Signalwege vermitteln in *C. elegans* die Resistenz gegenüber *Cry*-Toxinen. So erfolgt beispielsweise unter BT-Stress die Aktivierung der Ubiquitin E3-Ligase WWP-1 (*ww domain protein-1*) durch den Daf-2 Signalweg (Chen *et al.* 2010). Die Genexpression von *wwp-1* war in *uba5(ok3364)* unter Standard- und Hitzestress-Bedingungen reduziert, während eine verstärkte Expression hingegen unter Tunicamycin-Stress in *uba5(ok3364)* beobachtet

werden konnte. Eine generelle Immunantwort auf pathogen wirkende Stoffe erfolgt durch die bereits aufgeführte UPR, welche durch den MAPK-Weg (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Immunsystem spezifisch aktiviert werden kann (Bischof *et al.* 2008). Transkriptom-Analysen des MAPK-Wegs erwiesen sich jedoch unter Berücksichtigung der einzelnen Untersuchungsbedingungen und der beiden Genotypen als äußerst uneinheitlich (Daten nicht gezeigt). Weiterführend erfolgt die Aktivierung der UPR insbesondere des ABU-Wegs unter BT-Stress durch *ced-1 (cell death abnormality-1)* (Haskins *et al.* 2008). Allerdings wies *ced-1* ausschließlich unter Standardbedingungen Unterschiede im Transkriptom auf und lag verringert exprimiert in *uba5(ok3364)* vor.

3.6.7 Analyse zur Regulation der Glykolyse der Mutante *uba5(ok3364)* auf Transkriptomebene

Als besonders interessant erwies sich übereinstimmend mit den LC-MS Analysen (Tab. 15) eine Reduktion von zwei GAPDH-Genen *gpd-1* und *gpd-3*, sowie der Triosephosphat-Isomerase (*tpi-1*) in *uba5(ok3364)* (Abb. 54). GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) stellt ein Enzym der Glykolyse dar und ist für die reversible oxidative Phosphorylierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat zuständig (Ralser *et al.* 2007).

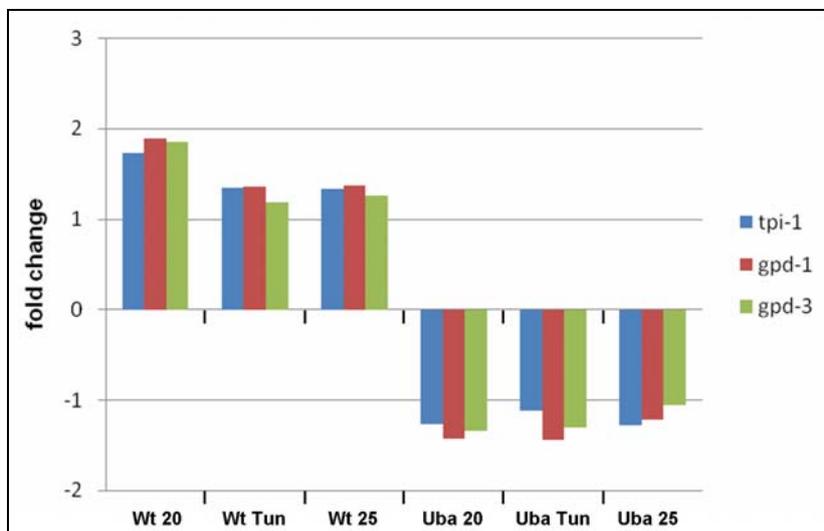


Abb. 54: Expressionsanalyse von Enzymen der Glykolyse. (4)

Die Genexpression von *tpi-1* (5 Sonden), *gpd-1* (3 Sonden) und *gpd-3* (3 Sonden) wurde untersucht. Die gemittelte Expressionsänderung (*fold change*) der einzelnen Gruppen ist dargestellt. Wt 20: Wildtyp bei 20°C kultiviert, Wt Tun: Wildtyp bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert, Wt 25: Wildtyp bei 25°C kultiviert, Uba 20: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C kultiviert, Uba Tun: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 20°C in Anwesenheit von 5 µg/ml Tunicamycin kultiviert., Uba 25: *uba5(ok3364)*-Mutante bei 25°C kultiviert.

Abschließend wurde geprüft, inwieweit die *uba5*-Deletion Einfluss auf die Genexpression verschiedener Komponenten ausgewählter Signalwege nimmt. Es zeigte sich bei allen hier untersuchten Signalwegen des Proteasoms, Peroxisoms, Phagosoms und der TGF- β -Signalweg eine Verminderung in der Genexpression der entsprechenden Komponenten in *uba5(ok3364)* (Daten nicht gezeigt).

3.7 Erste Proteom-Analyse der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* mittels LC-MS

Die sensitive Ermittlung von Expressionsunterschieden der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* auf Proteomebene erfolgte durch LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)-Analysen. Die Vorbereitung der Proben ist im Methoden-Teil aufgeführt (siehe 2.2.10.2), wobei *C. elegans* unter Standardbedingungen kultiviert wurde. 97 Proteine wiesen hierbei Unterschiede in der Expression zwischen *uba5(ok3364)* und Wt auf. Insgesamt wurden 26 Proteine in *uba5(ok3364)* reduziert exprimiert, wohingegen eine verstärkte Expression von 33 Proteinen festgestellt werden konnte. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ein Protein ausschließlich in *uba5(ok3364)* identifiziert, während 37 Proteine exklusiv in Wt ermittelt wurden. Die Tabelle mit den Ergebnissen der LC-MS Analyse befindet sich im Anhang (Tab. 15). So konnte eine verstärkte Expression von Myosinen, Tubulinen, Aktinen und fünf Vitellogeninen (Vit-2, -3, -4, -5, -6) in der Deletionsmutante detektiert werden, während Vit-1 hingegen vermindert exprimiert vorlag. Die stärkste Expressions-Reduktion auf Proteomebene der *uba5(ok3364)*-Mutante betraf alle vier Isoformen der GAPDH aus *C. elegans*. In der Gruppe der 37, exklusiv im Wt vorkommenden Proteine sind unter anderem ER assoziierte Proteine wie HSP70, Calreticulin und ERp57 vertreten. Des Weiteren wurden ausschließlich im Wt das Glykolyse Protein Fruktose-Bisphosphat Aldolase und NADPH abhängige Proteine wie die Aldehyd Dehydrogenase und die Malat Dehydrogenase ermittelt. Diese Ergebnisse stellen laufende Untersuchungen dar und müssen mittels quantitativer PCR bestätigt werden. Des Weiteren wird sich eine Proteom-Analyse von weiteren Deletionsmutanten anschließen.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Ufm1-Kaskade anhand von Interaktionsstudien

Die Charakterisierung der Ufm1-Kaskade in *C. elegans* hinsichtlich ihrer Funktion und ihres Ablaufs ist Ziel dieser Arbeit. Interaktionsstudien sollten das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten der Ufm1-Kaskade von *C. elegans* aufdecken (Abb. 55).

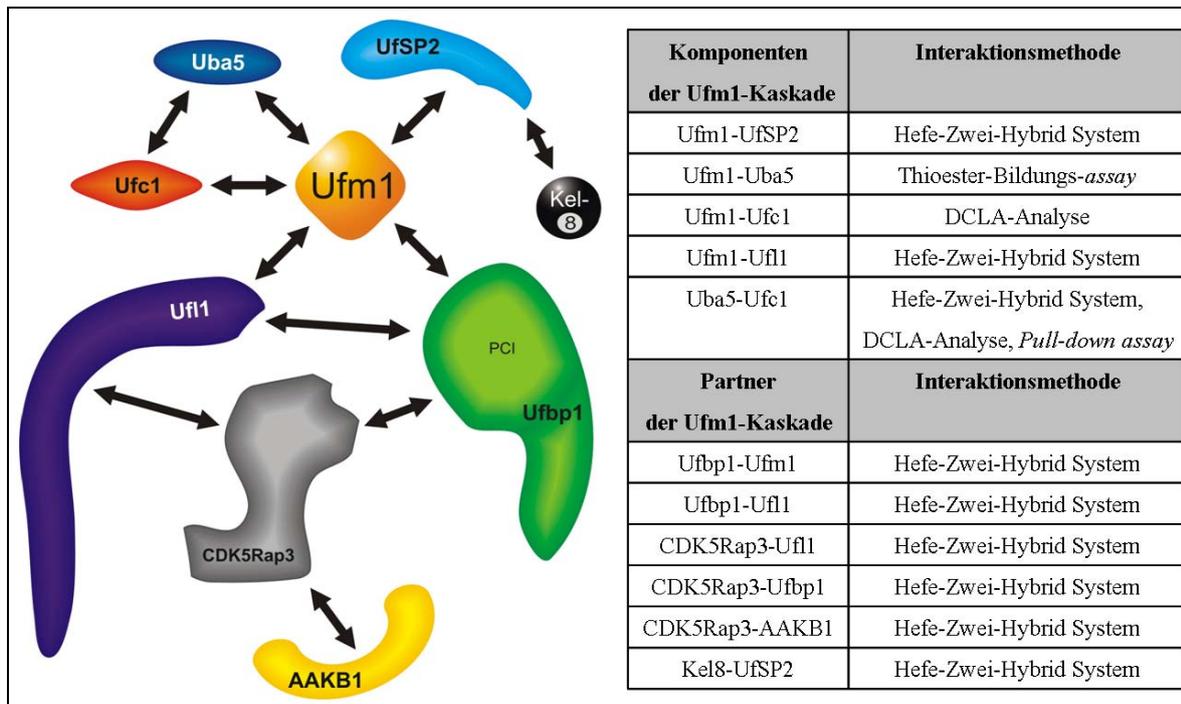


Abb. 55: Darstellung aller ermittelten Interaktionen dieser Dissertation

So konnte die Aktivierung von Ufm1 durch Uba5 mittels eines Thioester-Aktivierungs-assay bestätigt werden (Abb. 15, Abb. 17). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Komatsu *et al.* (2004) ging Uba5 hierbei nur eine Thioesterbindung mit Ufm1 unter reduzierenden Bedingungen (DTT/GSH) ein (Abb. 15, Spur 3; Abb. 17, Spuren 3 - 5). Vermutlich verhindern die reduzierenden Agenzien hierbei die Oxidation der Uba5-Sulphydrylgruppe. Unterstützend für diese Annahme sind die Ergebnisse der Aufreinigung des rekombinant exprimierten Uba5. So konnte nur nach Zugabe von DTT bei der Protein-Aufreinigung eine distinkte Proteinbande mit einem entsprechenden MW detektiert werden (Abb. 14, C). Die Abwesenheit von DTT führte zu Degradierungs- bzw. Aggregationsprodukten (Abb. 14, C). Eine abweichende Redox-Sensitivität von Uba5 in *C. elegans* ist anzunehmen, da aktuelle Studien eine negative Wirkung von DTT bei der Intermediatbildung erkennen lassen (Komatsu *et al.* 2004, Bacik *et al.* 2010).

Zusammenfassend bestätigen die *in vitro* Ergebnisse des Thioester-Aktivierungs-*assay* eine Aktivierung von Ufm1 am C-terminalen Glycin durch Uba5. Uba5 bildet einen Thioester durch das aktive Zentrum (Cys²⁵⁰) *in vitro* aus. Hierbei sind reduzierende Bedingungen durch DTT oder GSH notwendig. Damit scheint das Ufm1-aktivierende Protein Uba5 aus *C. elegans* gegenüber dem menschlichen Homolog Unterschiede in der Redox-Sensitivität aufzuweisen.

Der zweite Schritt der Ufm1-Kaskade beinhaltet den Ufm1-Transfer von Uba5 auf das Ufm1-konjugierende Enzym (E2) Ufc1. Meist bindet ein E2-Enzym das E1-Enzym erst mit erhöhter Affinität, wenn das E1-Enzym das jeweilige UBL trägt (Ye und Rape 2009). Jedoch konnte sowohl *in vitro* mittels *Pull-down assay* (Abb. 18, Abb. 19) als auch *in vivo* unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems (Abb. 22) und der DCLA-Analysen (Abb. 24, C) eine deutliche Interaktion nachgewiesen werden. Des Weiteren erfolgten DCLA-Analysen in *C. elegans*, die eine schwache Interaktion *in vivo* annehmen lassen (Abb. 24, C). Hierbei konnte eine partielle membrangebundene GFP-Lokalisation (*myo3Ufc1-GFP::myo3Uba5-MTLS*) im Vergleich zur cytosolischen Expression der Kontrolle (*myo3Ufc1-GFP*) beobachtet werden (Abb. 24, A). Dabei ist zu beachten, dass die Expression in diesem System durch den *myo3*-Promotor erfolgt. Da Ufm1 keine Expression in den Muskelzellen von *C. elegans* erkennen lässt (Abb. 26, Abb. 27), erfolgte die Bindung von Uba5-Ufc1 höchstwahrscheinlich in Abwesenheit von Ufm1. Um jedoch auszuschließen, dass eine geringe, nicht zu detektierende Menge an Ufm1 trotz allem vorhanden ist und diese Interaktion bedingt, folgte der RNAi vermittelte *ufm1 knock-down* in der *C. elegans*-Linie *myo3Ufc1-GFP::myo3Uba5-MTLS*. Hierbei konnten keine Unterschiede in der Interaktionsstudie beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich feststellen, dass Uba5 mit Ufc1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* interagiert.

Hierzu ist eine Studie zu erwähnen, die eine intrinsische Affinität des SUMO E2-Enzyms, Ubc9, zum katalytischen Zentrum des SUMO E1-Enzym aufzeigen konnte. Bei dieser Interaktion konnte eine gegenüberliegende Orientierung der beiden katalytischen Cysteine des E1- und E2-Enzyms beobachtet werden, die zum SUMO-Transfer von E1- zu E2-Enzym notwendig ist (Wang *et al.* 2008). Daher ist anzunehmen, dass Ufc1 ebenfalls eine intrinsische Affinität gegenüber Uba5 besitzt. Auch wenn diese Enzyme nicht in der Kaskade aktiv sind, könnten ihre katalytischen Cysteine möglicherweise in naher Nachbarschaft liegen, und somit unter Umständen leicht eine Disulfidbindung ausbilden.

Zur Ufm1-Konjugation bedarf es der Übertragung des durch einen Thioester an Uba5 gebundenen und aktivierten Ufm1 auf das E2-Enzym Ufc1. Es erfolgten *in vivo* Analysen zur

Intermediatbildung von Ufm1-Ufc1 in *C. elegans* mittels DCLA-Analysen (Abb. 24). Da Uba5 nicht in den Muskelzellen exprimiert wird (Abb. 28), wurde *myo3Uba5* dem Interaktionsansatz beigefügt. In diesem Fall zeigte die Kontrolle (*myo3Ufc1-GFP*) eine cytosolische GFP-Expression, während der Interaktionsansatz (*myo3Ufc1::GFP*, *myo3Uba5*, *myo3Ufm1-MTLS*) eine stark membrangebundene GFP-Lokalisation aufwies (Abb. 24 A, B, D). Zur abschließenden Bestimmung der Abhängigkeit der Ufm1-Ufc1 Interaktion von Uba5 erfolgte die Analyse der Ufm1-Ufc1 Interaktion ohne externe Zugabe von Uba5 in der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* (Abb. 24, E). Es konnte keine membranständige Lokalisation beobachtet werden und das Expressionsmuster entsprach der Kontrolle (*myo3Ufc1-GFP*; Abb. 24, A).

Der letzte Schritt der Ufm1-Kaskade umfasst den Ufm1-Transfer von Ufc1 auf das Zielprotein. Sowohl die hierfür benötigte E3-Ligase (Ufl1) als auch das entsprechende Zielprotein (Ufbp1) der Ufm1-Kaskade wurden erst kürzlich durch Tatsumi *et al.* (2010) identifiziert. Die neu entdeckten Komponenten der Ufm1-Kaskade sind in *C. elegans* konserviert, und entsprechende Homologe wurden für weitere Untersuchungen in dieser Studie verwendet. Hefe-Zwei-Hybrid Analysen zeigten deutliche Interaktionen zwischen Ufl1-Ufbp1 und Ufm1-Ufbp1 (Abb. 21, Abb. 23) und unterstützen die Stellung von Ufbp1 als Zielprotein der Ufm1-Kaskade. Eine Einteilung von Ufl1 in eine der bekannten E3-Klassen war nicht möglich, da keine bekannten Domänen der RING- bzw. HECT-Ligasen bei Ufl1 identifiziert werden konnten (Tatsumi *et al.* 2010). Die in dieser Studie ermittelte Interaktion zwischen Ufl1 und Ufm1 (Abb. 21) könnte für eine Klassifizierung hilfreich sein, da eine Bindung eines UBLs mit einer E3-Ligase ausschließlich bei HECT-Ligasen zu beobachten ist. Allerdings fehlt Ufl1 die typische C-terminale, ca. 350 Aa umfassende HECT-Domäne, die das katalytische Zentrum dieser Klasse bildet (Rotin und Kumar 2009, Tatsumi *et al.* 2010). Der sequenzielle Ablauf in der Konjugation bei HECT-Ligasen erscheint jedoch als angemessenster Mechanismus zur Ufm1-Konjugation unter diesen Bedingungen (Robinson und Ardley 2004, Rotin und Kumar 2009). Trotz allem kann wegen einer fehlenden HECT-Domäne keine Klassifizierung von Ufl1 vorgenommen werden.

Wie bereits diskutiert stellt Ufl1 die Ligase der Ufm1-Kaskade dar und erfüllt alle Kriterien einer E3-Ligase. So muss eine E3-Ligase das Zielprotein und das E2-Enzym binden sowie den Transfer des E2-gebundenen Ubls auf das Zielprotein stimulieren. Trotz allem scheint Ufc1 ebenfalls Charakteristika einer E3-Ligase zu zeigen. So konnte die Katalyse der Ufm1-Ufbp1 Intermediatbildung durch Ufc1 *in vitro* beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass rekombinant exprimiertes Ufc1 in Abwesenheit von Ufl1 unter ATP-Verbrauch ein Ufm1-

Ufbp1 Intermediat bilden kann. Unterstützend wirkt die ermittelte Interaktion zwischen Ufc1 und dem Zielprotein Ufbp1 (Tatsumi *et al.* 2010). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass gewisse Mono-Ubiquitinierungen ohne eine E3-Ligase ablaufen, indem das UBL beladene E2-Enzym bestimmte UBDs (*Ubiquitin Binding Domain*) des Zielproteins erkennt und konjugiert (Hoeller *et al.* 2007). Ohne Beteiligung einer E3-Ligase kann auch der SUMO-Transfer durch Ubc9 (E2) auf das Substrat direkt erfolgen. In diesem Fall wird ein Lysinreiches Sumoylierungsmotiv erkannt und gebunden. Aber Ubc9 interagiert auch mit der entsprechenden E3-Ligase und nimmt anschließend die klassische Rolle eines E2-Enzyms ein (Melchior 2000, Lin *et al.* 2002). Inwieweit die Intermediatbildung *in vitro* durch Ufc1 auf ein spezielles Ufm1-Motiv in Ufbp1 zurückzuführen ist, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sagen.

Eine Assoziation der Ufm1-Kaskade mit dem ER wurde bereits postuliert. So konnte eine erhöhte Ufm1-Expression während der Entwicklung von Typ-2 Diabetes und der ischämischen Herzerkrankung ermittelt werden. Diese Erkrankungen sind mit einer verstärkten Aggregation ungefalteter Proteine verknüpft, welche die als UPR bezeichnete Stressantwort auslösen (Azfer *et al.* 2006, Lu *et al.* 2008, Tatsumi *et al.* 2010).

Aktuelle Untersuchungen lassen eine Komplexbildung (ca. 550 kDa) an der ER-Membran bestehend aus Ufl1, Ufbp1, CDK5Rap3 und weiteren nicht bekannten Proteinen erkennen (Kwon *et al.* 2010, Shiwaku *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Auch konnten die massenspektrometrischen Untersuchungen von (Ewing *et al.* 2007) eine Interaktion von CDK5Rap3 mit den Ufm1-Kaskaden Komponenten Ufm1, Ufc1, Ufl1 und Ufbp1 aufzeigen. Zur Analyse dieser Komplexbildung in *C. elegans* wurde das Hefe-Zwei-Hybrid System verwendet. Hierbei konnten die Interaktionen zwischen Ufl1-Ufbp1, Ufl1-CDK5Rap3 und Ufbp1-CDK5Rap3 nachgewiesen werden (Abb. 23).

Nach aktuellen Veröffentlichungen wird Ufl1 in *Rattus norvegicus* durch die Transmembrandomäne in der ER-Membran in cytosolischer Orientierung gebunden (Shiwaku *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Zudem wird Ufbp1 über den N-terminalen Signalanker ebenfalls in der ER-Membran auf der cytosolischen Seite verankert und nimmt potentiell eine Funktion im Membrantransport ein (Neziri *et al.* 2010). Ufbp1 von *C. elegans* weist N-terminal eine Ankerdomäne auf und Ufl1 eine etwas anders positionierte Transmembrandomäne als in *R. norvegicus* (Abb. 57 siehe Anhang). Lokalisationsstudien der Ufm1-Komponenten Ufl1 und Ufbp1 wurden im Rahmen dieser Arbeit lediglich mit der putativen Promotorregion durchgeführt. Somit sind keine Aussagen bezüglich einer ER-Membranverankerung oder Kernlokalisierung der Proteine in *C. elegans* zu machen, sollten aber in anschließenden

Untersuchungen überprüft werden (Abb. 30, Abb. 31). Des Weiteren ist ein Ergebnis der Sequenzanalysen zu nennen, welches Ufbp1 ein NLS (*nuclear localization signal*)-Motiv zuschreibt und konserviert in *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Brugia malayi* vorliegt (Abb. 58 siehe Anhang). Da im Rahmen dieser Dissertation lediglich Ufbp1-Promotorstudien in *C. elegans* durchgeführt wurden liegen keine Ergebnisse vor, die eine Funktion dieses Motivs in *C. elegans* erkennen lassen. Bisher durchgeführte Untersuchungen zu den Bindedomänen der Komplexbildung von Ufl1, Ufbp1 und CDK5Rap3 sind teilweise gegensätzlich und lassen keine Aussage zu (Kwon *et al.* 2010, Shiwaku *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Die direkte Bindung der drei Proteine im Komplex kann auf Grund der Hefe-Zwei-Hybrid Analysen durchaus angenommen werden (Abb. 23). Die bisherige Charakterisierung des Komplexes in der Maus durch (Kwon *et al.* 2010) läßt erkennen, dass eine gegenseitige Stabilisierung von CDK5Rap3 und Ufl1 durch deren Bindung zur Unterdrückung der Ubiquitinierung des jeweils anderen Proteins führt. Zudem konnte nach Ufl1 *knock-down* ein durch Ubiquitin vermittelter Proteasom abhängiger Abbau von CDK5Rap3 und Ufbp1 beobachtet werden, der durch eine Ufl1 Überexpression aufgehoben werden konnte (Wu *et al.* 2010).

In diesem Kontext stellt sich die Frage, ob die Bindungen der Komplexparker untereinander, oder die Modifizierung mit Ufm1 die Stabilität des Komplexes (Ufl1, Cdk5Rap3 und Ufbp1) beeinflusst. Zur Prüfung einer möglichen stabilisierenden Wirkung von Ufl1 auf die weiteren Komponenten der Ufm1-Kaskade erfolgten Untersuchungen mit den transgenen *C. elegans* Reporterger-Linien *ce-pro-ufm1::GFP*, *ce-mat-ufm1::GFP*, *ce-uba5::GFP* und *ce-ufc1::GFP*, welche nach *knock-down* von *ufl1* keine veränderte Proteinexpression aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Somit liegt kein stabilisierender Effekt von Ufl1 bei anderen Komponenten der Ufm1-Kaskade in *C. elegans* vor. Des Weiteren könnte der beschriebene UPS abhängige Abbau der Komplexparker durch die Proteasom, COP9 Signalosom und eIF3 assoziierte PCI-Domäne von Ufbp1 vermittelt werden (Hofmann und Bucher 1998, Pick *et al.* 2009). Eine Verbindung von Ufbp1 zum Proteasom wird allerdings ausgeschlossen (Neziri *et al.* 2010). Alternative Untersuchungen zur Charakterisierung des Komplexes durch (Wu *et al.* 2010) ermittelten nach Ufl1 *knock-down* eine Kerntranslokation von CDK5Rap3 und dessen Bindung an RelA, einer Komponente des NF-kappaB-Signalwegs. Die anschließende Transkriptions-Repression von Cyclin D1 löst den Mitose Stopp (G1/S-Phase) aus (Cao *et al.* 2001, Karin *et al.* 2002, Wang *et al.* 2007, Shiwaku *et al.* 2010). Der NF-kappaB Signalweg existiert nicht in *C. elegans* (Gilmore 2006). In diesem Zusammenhang ist eine CDK5Rap3-Überexpression zu nennen, die ebenfalls zum Mitose Stopp in der G1-Phase führte (Wang *et al.* 2006). Dies lässt vermuten, dass die Balance zwischen Ufl1 und CDK5Rap3 entscheidend

für die Regulation ist. Nach aktuellen Untersuchungen wird eine fast vollständige Bindung von Ufl1 im Komplex beschrieben, während CDK5Rap3 nur zum Teil im Komplex gebunden vorliegt (Wu *et al.* 2010).

Hierbei ist die Auto-Ubiquitinierung als eine bekannte Form der Regulation von E3-Ligasen, DUBs und E2-Enzymen zu erwähnen. Hierbei erfolgt die Konjugation von Ubiquitin mit Komponenten der Ubiquitin-Kaskade selbst und bedingt den proteasomalen Abbau der Proteine (Joazeiro und Weissman 2000, Fang *et al.* 2003, Hunter 2007). Auto-Ubiquitinierung repräsentiert wahrscheinlich einen selbst-regulierenden Schutzmechanismus, durch den UBL-Enzyme sich selbst als Zielproteine sehen, wenn ihr Expressionslevel über dem der entsprechenden Bindungspartner liegt (Robinson und Ardley 2004). So wird beispielsweise Ubc7 (E2) an der ER-Membran durch Cue7 gehalten. Übersteigt das Proteinlevel von Ubc7 das von Cue7, erfolgt die Auto-Ubiquitinierung von Ubc7 an seinem katalytischen Cyctein durch die HECT E3-Ligase Ufd4 worauf der Abbau durch das Proteasom folgt (Chen *et al.* 2006, Ravid und Hochstrasser 2007).

Neben der Protein-Synthese Funktion wurde kürzlich dem ER eine bedeutende Funktion in der Zell-Zyklusregulation zugeschrieben und unterstützt die Untersuchungen von Shiwaku *et al.* (2010). Hierbei stellt die Lokalisation bestimmter Cycline und CDKs zu entsprechenden Zeitpunkten einen regulatorischen Mechanismus dar. Nach der bisherigen Charakterisierung von Ufl1 handelt es sich vermutlich bei diesem Protein um ein neues Mitglied einer Zell-Zyklus regulierenden Gruppe bestehend aus Cln3 und SCAPER (Fearon und Cohen-Fix 2008). So wird beispielsweise G1 Cyclin Cln3 in der frühen G1-Phase am ER gebunden, wohingegen es in der späten G1-Phase in den Zellkern transloziert, um die S-Phase beteiligend einzuleiten (Verges *et al.* 2007). Das kürzlich entdeckte ER Protein, SCAPER, reguliert den Übergang der G1/S-Phase und der M-Phase der Mitose. Dabei bindet an der ER Membran gebundenes SCAPER zu entsprechenden Zeitpunkten vermehrt Cyclin A/Cdk2. Die genaue Funktion dieser Interaktion ist nicht bekannt (Tsang *et al.* 2007).

Eine Erweiterung des beschriebenen Ufm1-Komplexes an der ER Membran erfolgt durch die einzige Ufm1-spezifische Protease in *C. elegans*, UfSP2. Die Aufgabe dieser Protease reicht von der Ufm1-Reifung durch die C-terminale Prozessierung der Ufm1-Vorstufe bis zur Ufm1-Dekonjugation von Zielproteinen (Kang *et al.* 2007, Ha *et al.* 2008, Tatsumi *et al.* 2010). Analysen dieser Arbeit konnten die Interaktion zwischen UfSP2 und Ufm1 aufzeigen (Abb. 20). Weiterführend konnte kürzlich eine Interaktion zwischen dem N-Terminus von UfSP2 und dem Zielprotein der Ufm1-Kaskade Ufbp1 aufgedeckt werden, welche eine Rekrutierung der Protease zur ER-Membran bedingt (Ha *et al.* 2011). Da der N-Terminus von

Ufbp1 zur Verankerung in der ER-Membran genutzt wird, wäre die UfSP2-Bindung an der C-terminalen PCI-Domäne denkbar. Allerdings sind bisher keine Untersuchungen bezüglich der Bindungsbereiche erfolgt. Im Hinblick auf die Bindung von Ufl1-CDK5Rap3-Ufbp1 am ER scheint diese Interaktion besonders interessant und erweitert die potentielle Wirkungsweise dieses Komplexes. Somit könnte die gesamte Komplexbildung, welche unter anderem CDK5Rap3 an der Kerntranslokation hindert (Shiwaku *et al.* 2010), durch die UfSP2 vermittelte De-Ufmylierung reguliert werden. So ist beispielweise bekannt, dass Komponenten der SUMO-Kaskade im Inneren des Zellkerns an den NPC (*nuclear pore complex*) gebunden vorliegen. In diesem Kontext erfolgt die Regulation des Kerntransports von Proteinen durch eine Sumoylierung bzw. De-Sumoylierung auf Grund eines Zusammenspiels der Protease und Ligase (Palancade und Doye 2008).

Die Regulation dynamischer Prozesse durch Ubiquitinierung und De-Ubiquitinierung ist ein verbreiteter Mechanismus. Beispiele vergleichbarer Abläufe finden sich ebenfalls in der Regulation des ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) wie auch in den Kontrollmechanismen der Mitosespindeln (Clague und Urbe 2006, Reddy *et al.* 2007, Stegmeier *et al.* 2007).

Weiterführend wurde eine bisher nicht beschriebene Interaktion zwischen UfSP2 und Kel-8 im Rahmen der Hefe-Zwei-Hybrid Studien ermittelt (Abb. 20). Für Kel-8, einem Mitglied der BTB-Kelch Protein Familie, sind zwar bereits viele Bindungspartner, jedoch nur wenige Funktionen bekannt. Bei den bisher bekannten Funktionen wirkt Kel-8 als regulierendes Verbindungsprotein zwischen Cul3-E3-Ubiquitin Ligase und Substrat während der Ubiquitinierung und führt zum Abbau von GLR-1 und Rapsyn/RPY-1 (Schaefer und Rongo 2006, Nam *et al.* 2009). Die Beteiligung von Cul3-Ligase-Komplexen an der Regulation der Übergänge in der Meiose und Mitose sind bereits beschrieben (Pintard *et al.* 2003, Xu *et al.* 2003). Nachdem UfSP2 durch die Bindung von Ufbp1 eine Rekrutierung an die ER-Membran zeigt, ist eine UfSP2 vermittelte Beteiligung von Kel-8 in einem Komplex am ER durchaus denkbar. Inwieweit die Bindung von Kel-8 zur Komplexbildung weiterer Proteine beiträgt oder zur Rekrutierung eine Cullin-E3-Ligase genutzt wird, ist nicht bekannt.

Zudem konnte gezeigt werden, dass DUBs regulierend auf die Auto-Ubiquitinierung von E3-Ligasen einwirken. So werden die E3-Ligasen MARCH7 und ICPO auto-ubiquitiniert, können allerdings durch USP7 (DUB) deubiquitiniert und damit vor dem Ubiquitin-vermittelten Abbau geschützt werden (Canning *et al.* 2004, Nathan *et al.* 2008). Neben der Funktion einen Pool an freiem Ubiquitin aufrechtzuhalten, verhindern DUBs nicht

notwendige Degradierungen und weisen somit eine *proof-reading* Funktion auf (Chung und Baek 1999, Li *et al.* 2002, Cohen *et al.* 2003).

Die Regulation von UBL-Komponenten wie DUBs, E2- und E3-Enzymen kann ebenfalls durch Phosphorylierung erfolgen und beispielsweise sowohl die Zielprotein-Bindung und katalytische Aktivität von HECT-Ligasen beeinflussen als auch die Kernlokalisierung der E3-Ligase Mdm2 bewirken (Mayo und Donner 2001, Gallagher *et al.* 2006, Hunter 2007). Da Ufl1 zwei Phosphorylierungsstellen aufweist, wäre es von großer Bedeutung zu untersuchen, inwieweit eine Regulation der Aktivität, Zielprotein-Bindung, Lokalisation und Stabilität von Ufl1 durch Phosphorylierung erfolgen könnte. Äußerst interessant erweist sich in diesem Zusammenhang die Stimulierung der Auto-Ubiquitinierung von COP1 (E3) nach Phosphorylierung durch die Protein Kinase ATM (Dornan *et al.* 2006).

Da die Regulation von UBL-Komponenten durch Auto-Ubiquitinierung, Phosphorylierung und DUBs sowie deren gegenseitiger *crossstalk* erfolgen kann erscheinen diese regulatorischen Aspekte im Hinblick auf die Untersuchungen des beschriebenen Komplexes an der ER-Membran besonders vielversprechend.

Der Verlust von Uba5 in der Mutante *uba5(ok3364)* verhindert die Ufm1-Modifikation des bisher einzig bekannten Zielproteins Ufbp1 an der cytosolischen Seite der ER-Membran. Inwieweit diese Ufm1-Modifikation die Komplexbildung und somit eine potentielle Rolle in der Regulation der Mitose in *C. elegans* einnimmt, ist momentan nicht geklärt. Allerdings weist die Deletionsmutante *uba5(ok3364)* eine Entwicklungsverzögerung von etwa 6 h im Vergleich zum Wt auf (Abb. 37).

CDK5Rap3 wirkt regulierend in der Cdk1 Aktivierung in menschlichen Zellen und gilt als negativer Regulator der *checkpoint* Antwort durch seine antagonistische Wirkung auf die *checkpoint kinase 1* (*chk1*) (Jiang *et al.* 2009). Eine Abhängigkeit der Ufm1-Kaskade zu CDK5Rap3 könnte auf die von Shiwaku *et al.* (2010) beschriebene Zell-Zyklus Regulation durch die Komplexbildung an der ER-Membran zurückzuführen sein. Möglicherweise führt der *uba5 knock-out* und damit eine ausbleibende Ufm1-Modifikation des ER-Membran Komplexes bereits zu vermehrtem Abbau oder zur Kerntranslokation von CDK5Rap3. Damit wäre eine Beteiligung der Ufm1-Kaskade durch die Ufm1-Konjugation im Komplex wirksam und würde regulierend den Zell-Zyklus beeinflussen.

Im folgenden Modell wird hypothetisch die Regulation des Komplexes an der ER-Membran in Abhängigkeit von der Ufm1-Modifikation dargestellt (Abb. 56). Als Basis dient die ermittelte verzögerte Entwicklung der Deletionsmutante *uba5(ok3364)*, die eine Störung des Zell-Zyklus nach Funktionsverlust der Ufm1-Kaskade annehmen lässt.

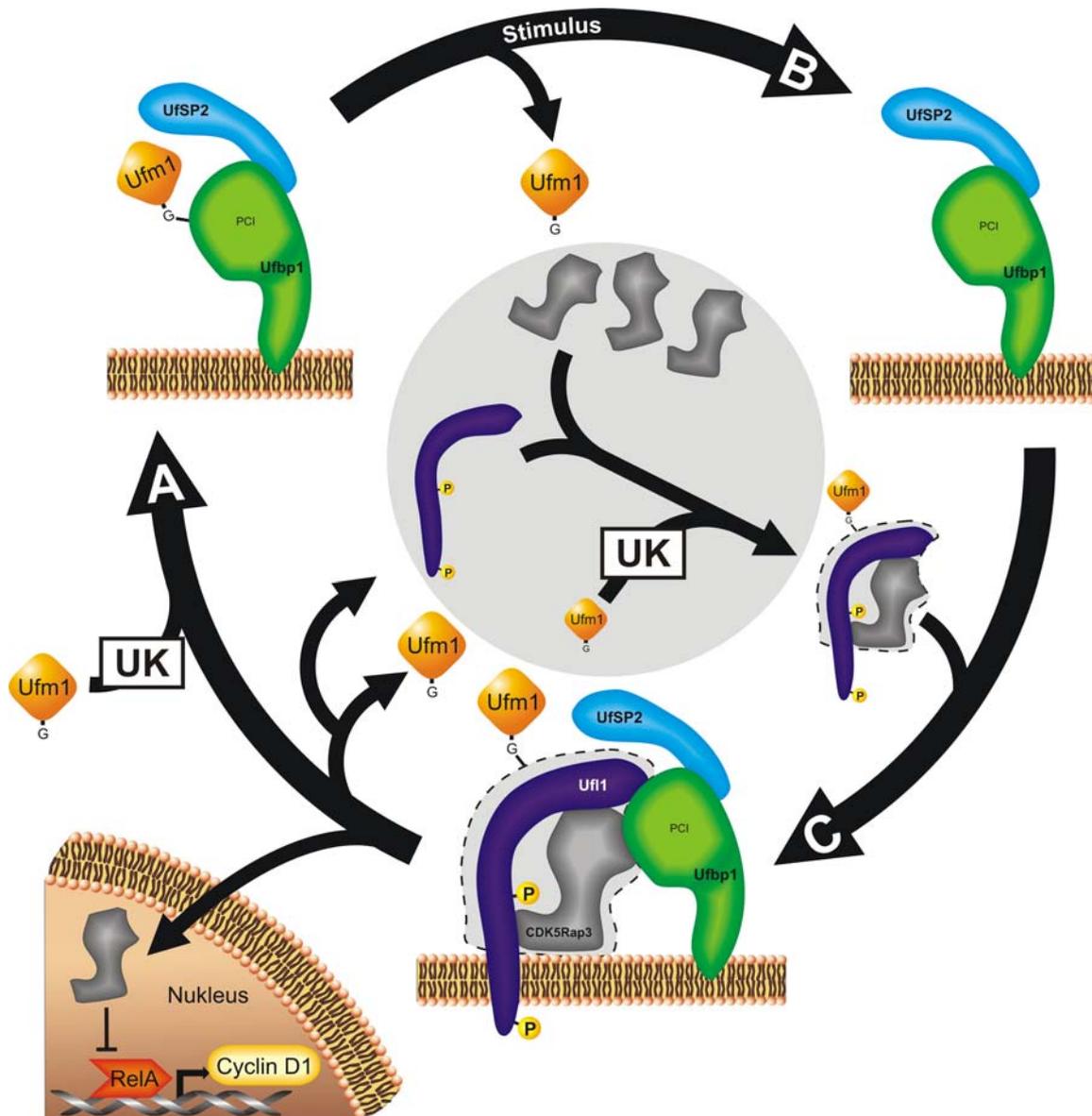


Abb. 56: Hypothetisches Modell zur ER-Komplexbildung und möglichen Regulation durch Ufm1.

(A) Die Ufm1-Kaskade (UK) überträgt Ufm1 auf das an der ER-Membran gebundene Ufbp1. Die Ufm1-Konjugation erfolgt dabei an Lys²⁶⁷ des hochkonservierten DDRGK-Motivs innerhalb der PCI-Domäne und wirkt zunächst blockierend für weitere Bindungen des Komplexes. Die Ufm1-spezifische Protease UfSP2 ist auf Grund der Bindung an Ufbp1 ebenfalls am ER lokalisiert. (B) UfSP2 kann nach einem entsprechenden Stimulus die Ufm1-Dekonjugation von Ufbp1 katalysieren. (C) Die freiliegende PCI-Domäne ist nun fähig den durch Ufm1 stabilisierten Komplex Uf1-CDK5Rap3 zu binden. Der Komplex bestehend aus UfSP2, Ufm1, Uf1, Ufbp1 und CDK5Rap3 bleibt stabil an der ER-Membran gebunden bis eine Dissoziation eingeleitet wird. An dieser Stelle wirkt UfSP2 auf die Ufmylierung ein und destabilisiert die Komplexpartner. Als destabilisierende Signale wären Auto-Ubiquitinierungsstellen oder die 2 Phosphorylierungspositionen von Uf1 denkbar. Eine Maskierung der destabilisierenden Signale des Komplexes durch Ufm1 wird hierbei angenommen. Eine Freilegung der Phosphorylierungsstellen bzw. Ubiquitinierungsstellen durch die UfSP2 vermittelte De-Ufmylierung nach einem entsprechenden Stimulus führt zum Zerfall des Komplexes an der ER-Membran. Als Folge transloziert CDK5Rap3 in den Zellkern und reguliert negativ die Mitose. Ufbp1 wird erneut mit Ufm1 an der PCI-Domäne konjugiert, während Uf1 im Cytosol CDK5Rap3 aus einem Pool an Proteinen binden kann. Die Stabilisierung dieses Komplexes erfolgt im Cytosol, anschließend bindet der Uf1-CDK5Rap3 erneut an die PCI-Domäne von Ufbp1. Nach diesem Modell nimmt die Protease UfSP2 eine zentrale Rolle in der regulatorischen Funktion dieses Komplexes ein.

4.2 Expressionsanalysen der Ufm1-Kaskade in *C. elegans*

Die Identifikation der räumlichen und zeitlichen Lokalisation der Ufm1-Kaskade sowie deren potentielle Partner aus den Interaktionsstudien erfolgte mittels Reporterstudie in *C. elegans*. Um Erkenntnisse über Wirkungsorte der Ufm1-Kaskade zu erlangen wurden sowohl Überexpressionsstudien als auch ausschließlich Promotoranalysen durchgeführt.

Zur Lokalisation der Ufm1-Konjugation in *C. elegans* ist zu berücksichtigen, dass insbesondere das Expressionsmuster von Ufm1 beschränkend auf das Wirkungsfeld der Ufm1-Konjugation wirkt (Abb. 26, Abb. 27). Die Expressionsmuster aller hier untersuchten Komponenten der Ufm1-Kaskade sowie die der potentiellen Interaktionspartner weisen eine gemeinsame Lokalisation im Darm von *C. elegans* auf. Unter Berücksichtigung der nahezu ausschließlich auf den Darm begrenzten Expression des Ufm1-aktivierenden Enzyms Uba5 und der Ufm1 Ligase Ufl1 stellt der Darm den Ort mit der größten Wahrscheinlichkeit zur Ufm1-Konjugation dar (Abb. 28, Abb. 30). Der *C. elegans*-Darm vereint in sich die Funktionen von Leber und Niere (Corsi 2006). Verschiedenste Veröffentlichungen haben im Säuger eine verstärkte Expression der Ufm1-Komponenten in der Leber, der Niere und im Gehirn festgestellt (Komatsu *et al.* 2004, Kang *et al.* 2007, Tatsumi *et al.* 2010).

Des Weiteren konnten Unterschiede im Expressionsmuster der Vorstufe und der prozessierten Form von Ufm1 in adulten Hermaphroditen ermittelt werden und lassen einen erweiterten Funktionsbereich nach der Prozessierung erahnen. Neben einem abweichenden Expressionsmuster in den Neuronen wurde eine zusätzliche Expression im exkretorischen Kanal der H-Zelle und der Vulva von *matUfm1* beobachtet (Abb. 27). Diese Unterschiede erscheinen ungewöhnlich, da *proUfm1* durch UfSP2 zumindest im Darm prozessiert werden müsste und anschließend ein identisches Muster zu *matUfm1* aufzeigen sollte. Möglicherweise ist dies auf die geringe Menge an UfSP2 im Darm zurückzuführen (Abb. 25) (Kang *et al.* 2007, Tatsumi *et al.* 2010). Die Prozessierung der zusätzlich eingebrachten Überexpression neben dem nativ vorkommenden *proUfm1* würde möglicherweise unter diesen Bedingungen die katalytische Aktivität von UfSP2 übersteigen. Denkbar wäre weiterhin, dass ein Stimulus zur Aktivitätssteigerung der Protease führen kann und die vermehrte Reifung von Ufm1 bedingt.

Eine Expression im exkretorischen Kanal der H-Zelle konnte ausschließlich von *matUfm1* beobachtet werden (Abb. 27). So bildet die H-förmige exkretorische Zelle zwei laterale Kanäle aus, die sich über die gesamte Länge des Wurmes ziehen (Buechner 2002). Die Vergrößerung eines exkretorischen Kanals (Abb. 27, F) zeigt, dass die Fluoreszenz parietal lokalisiert ist. Man geht davon aus, dass die zentralen Funktionen des exkretorischen Systems

die Osmoregulation ist (Strange 2003). Da *matUfm1* nicht im Lumen, sondern im Cytoplasma des exkretorischen Kanals lokalisiert ist, ist von einer Sekretion nach Prozessierung durch UfSP2 vermutlich nicht auszugehen. Welche genaue Funktion hierbei durch *matUfm1* eingenommen wird, ist nicht zu sagen.

Neben der bereits beschriebenen Darmexpression, die allen untersuchten Komponenten gemeinsam ist, zeigten die Promotorstudien von UfSP2 und Ufbp1 interessanterweise ein identisches Expressionsmuster in den chemosensorischen Amphid-Neuronen (Abb. 25, Abb. 31). Diese Lokalisationsübereinstimmung unterstützt die UfSP2-Ufbp1 Interaktionsergebnisse von Ha *et al.* (2011) und könnte als Grundlage zur Interaktion dieser Proteine in *C. elegans* betrachtet werden.

Eine ER-Lokalisation von Komponenten der Ufm1-Kaskade soll basierend auf diversen Untersuchungen bei UfSP2, Ufl1, Ufbp1 und CDK5Rap3 vorliegen (Shiwaku *et al.* 2010, Tatsumi *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010, Ha *et al.* 2011). Diese Lokalisationen konnten allerdings im Rahmen unserer Reportergeranalysen nicht näher untersucht werden (Abb. 25, Abb. 30, Abb. 31, Abb. 33). Denn neben gleichzeitiger cytosolischer Expression ist eine distinkte ER-Assoziation nicht erkennbar (Abb. 26 - Abb. 29).

Die Expression von Kel-8, einem Adapterprotein einer Cullin-E3-Ligase im Darm, konnte ebenfalls in den Kopf-Neuronen und im Nervensystem der ventralen Motoneuronen beobachtet werden (Abb. 32). Diese neuronale Expression ist neben einer potentiellen Beteiligung an der Ufm1-Kaskade höchstwahrscheinlich auf die beschriebene Wirkung beim Ubiquitin-vermittelten Abbau von Rapsyn und der GLR-1 Untereinheit des Glutamatrezeptors AMPAR in Postsynapsen von *C. elegans* zurückzuführen (Schaefer und Rongo 2006, Nam *et al.* 2009).

Expressionsanalysen der CDK5Rap3-Promotorregion lässt zusätzlich zum Darm eine GFP-Lokalisation in den Kopfneuronen und im Nervensystem der ventralen Motoneuronen erkennen (Abb. 33). Diese Expression ist möglicherweise auf die beschriebene CDK5-Bindung durch CDK5Rap3 zurückzuführen. Abweichend zu anderen CDKs nimmt CDK5 nicht ausschließlich eine Funktion bei der Zellteilung ein, sondern wirkt auch regulierend in der neuronalen Differenzierung und in der neurocytoskelettalen Dynamik (Ching *et al.* 2002). Da die Expressionsanalysen ein teilweise sehr unterschiedliches Lokalisationsmuster der einzelnen Ufm1-Komponenten in *C. elegans* aufzeigen, ist von einer nicht ausschließlich beschränkten Funktion der einzelnen Komponenten innerhalb dieses Signalwegs auszugehen. Unterstützend für diese Annahme wirkt die starke ubiquitäre Expression von Ufc1 (Abb. 29),

welche typisch für E2-Enzyme ist und deren weitreichende Funktionen unterstreicht (van Wijk und Timmers 2010).

Zusammenfassend lassen die Lokalisationsstudien eine zum Teil starke und ubiquitäre Expression der Ufm1-Kaskade und deren potentiellen Bindungspartner erkennen.

4.3 Phänotypisierung der Deletionsmutante *uba5(ok3364)*

Die verwendete *knock-out* Mutante *uba5(ok3364)* ist gekennzeichnet durch den Verlust des aktiven Zentrum bildenden Cys²⁵⁰ (Abb. 34). Es erfolgte die Charakterisierung von *uba5(ok3364)* hinsichtlich der Morphologie, Reproduktionsrate, adulten Lebensdauer, larvalen Entwicklung und Stressresistenz. Zudem wurden einleitende Studien bezüglich der Unterschiede auf Proteom- und Transkriptom-Ebene durchgeführt, um Rückschlüsse auf die potentielle Funktion der Ufm1-Kaskade in dem Nematoden *C. elegans* zu ermöglichen.

Die *uba5*-Deletion führt zum Funktionsverlust des Ufm1-aktivierenden Enzyms und bedingt somit den Stopp der Ufm1-Kaskade. In der Embryonalphase der Maus ist die *uba5*-Deletion letal, da Uba5 dort an der Bildung roter Blutzellen während der Hämatopoese beteiligt ist (Tatsumi *et al.* 2010, Tatsumi *et al.* 2011). Die Aktivierung von SUMO2 und Ufm1 durch Uba5 konnte in der Vergangenheit gezeigt werden (Zheng *et al.* 2008) und lässt den beobachteten Maus Phänotyp nicht zweifelsfrei auf die Ufm1-Kaskade zurückführen. Allerdings konnte nach Untersuchungen von Tatsumi *et al.* (2011) keine Aktivierung von SUMO2 durch Uba5 ermittelt werden. Inwieweit diese unterschiedlichen Ergebnisse Einfluss auf den Phänotyp nehmen, muss noch geklärt werden, denn die regulatorische Funktion eines der SUMO-Proteine (SUMO1) ist während der Hämatopoese bereits erforscht und könnte auch für das in der Maus vorkommende SUMO2 zutreffen (Collavin *et al.* 2004, Lee *et al.* 2009, Tatsumi *et al.* 2011). Nematoden besitzen kein SUMO2 (Ye und Rape 2009) und unter Umständen ist darin die Vitalität der *C. elegans* Deletionsmutante *uba5(ok3364)* begründet, wodurch die Charakterisierung von Uba5 bzw. der Ufm1-Kaskade über die gesamten Entwicklungsstadien ermöglicht wird. Die Phänotypisierung von *uba5(ok3364)* kann hier allein auf den Verlust der Aktivierung in der Ufm1-Kaskade zurückgeführt werden.

Im Folgenden werden die ermittelten Unterschiede in der Phänotypisierung der Mutante *uba5(ok3364)* mit den anfänglichen Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen diskutiert. Da diese Ergebnisse aber noch durch RT-PCR verifiziert werden müssen, dienen sie nur als Hinweise für weiterführende Studien.

Unterschiede auf Transkriptomebene der *uba5(ok3364)*-Mutante im Vergleich zum Wt wurden unter allen untersuchten Bedingungen ermittelt (Abb. 49). Einen wesentlich größeren

Einfluss auf das Transkriptom wurde dem Genotyp als den entsprechenden Kultivierungsbedingungen zugewiesen.

4.3.1 Morphologie & Reproduktionsrate

Die Morphologie der *uba5(ok3364)*-Mutante wies, im Vergleich zum Wt, häufig Unterschiede durch einen gedrungenen Körperbau und einen veränderten Pharynxbereich auf. Diese Unterschiede traten aber nicht konstant auf. In diesem Zusammenhang ist die erhöhte Expression von Aktinen, Myosinen und Tubulinen nach einleitenden LC-MS Analysen auf Proteomebene zu nennen (Tab. 15 siehe Anhang).

Bislang ist nur eine genetische Erkrankung (Hüftfehlbildung; *Beukes Familial Hip Dysplasia*) im Menschen bekannt, die auf eine Mutation der Ufm1-Kaskade (UfSP2) zurückzuführen ist (Ha *et al.* 2011). Diese Form der Fehlbildung ist mit dem Collagen Col2A1 assoziiert (Beighton *et al.* 1994). Interessanterweise wurde in den Microarray-Untersuchungen der Deletionsmutante neben einer verminderten *ufsp2* Expression eine drastische Collagen-Veränderung beschrieben. So konnte beispielsweise eine 54-fach verstärkte Expression des Collagens *col-74* ermittelt werden.

Eine signifikant verminderte Reproduktionsrate der Mutante *uba5(ok3364)* konnte unter Standardkultivierung (20°C) und leichtem Hitzestress (25°C) beobachtet werden (Abb. 35). Die verringerte Reproduktionsrate der Deletionsmutante lässt vermuten, dass die Ufm1-Kaskade in *C. elegans* möglicherweise an der Produktion oder Reifung der Eier beteiligt ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die ermittelte Reduktion von Vitellogeninen auf Proteom-Ebene (Tab. 15 siehe Anhang). Die Regulation dieser Proteine ist entscheidend, da Vitellogene Eidotterproteine sind und damit die Reproduktion maßgeblich beeinflussen (Spieth und Blumenthal 1985).

4.4 Stress-Untersuchungen zur Ufm1-Kaskade

4.4.1 ER-Stress

Assoziationen der Ufm1-Kaskade zum ER liegen durch die bereits beschriebene Komplexbildung an der ER-Membran vor (Azfer *et al.* 2006, Shiwaku *et al.* 2010, Tatsumi *et al.* 2010, Wu *et al.* 2010). Zur Identifizierung einer möglichen Beteiligung der Ufm1-Kaskade bei ER-Stressbedingungen wurde die Reporter-Linie *hsp4-GFP(zcIs4)V* verwendet. Zuerst wurde untersucht, ob der RNAi vermittelte *knock-down* einzelner Komponenten der Ufm1-Kaskade zu ER-Stress führt. Eine ausbleibende *hsp4*-Expression lässt annehmen, dass der *knock-down* der Ufm1-Kaskade selbst keinen ER-Stress auslöst (Daten nicht gezeigt). Zudem

wurde überprüft, ob unter ER-Stress der *knock-down* der Ufm1-Kaskade Einfluss auf die *hsp4*-Expression nimmt (Abb. 40). Dabei konnte eine vergleichsweise stark erhöhte *hsp4*-Expression nach *knock-down* von *ufm1* und *uba5* festgestellt werden. Folglich konnten *in vivo* Unterschiede in der *hsp4*-Expression unter Stressbedingungen ermittelt werden, die auf Komponenten der Ufm1-Kaskade in *C. elegans* zurückzuführen sind.

Die Deletionsmutante *uba5(ok3364)* wurde in die *hsp4*-GFP(*zIs4*)V *C. elegans*-Linie eingekreuzt (*uba5(ok3364)::hsp4*-GFP). Damit war es möglich in Stresstoleranzuntersuchungen, den Einfluss des *uba5 knock-outs* unter verschiedenen Stressoren direkt mit der *hsp4*-Expression bzw. ER-Stress zu beobachten. Zunächst wurde erneut geprüft, ob statt eines *knock-down* ein *knock-out* von *uba5* ER-Stress bedingt. Hierbei konnte lediglich eine minimale Fluoreszenz-Steigerung der *hsp4*-Expression beobachtet werden (Abb. 41, K). Somit führt auch hier der Stopp der Ufm1-Kaskade zu keinem oder sehr geringem ER-Stress. Die Kreuzung (*uba5(ok3364)::hsp4*-GFP) wurde mit der *hsp4*-GFP Linie (Kontrolle) unter dem Einfluss von Stressoren, die direkt (Tunicamycin und DTT) und indirekt (Hitze- und Osmo-Stress) im ER Stress auslösen, verglichen. Diese Stressoren induzieren auf unterschiedliche Weise Stressbedingungen im ER. So bewirkt das Antibiotikum Tunicamycin die Inhibierung der Glykosylierung im ER, während DTT im ER die Ausbildung von Disulfidbrücken verhindert (Shen und Prywes 2005, Darom *et al.* 2010). Obwohl Hitze die Denaturierung von Proteinen und somit ER-Stress durch eine gesteigerte Proteotoxizität beinhaltet, werden auch viele temperaturabhängige Prozesse beeinflusst (Shen *et al.* 2001). Die Expression von *hsps* wird dabei induziert, welche oft unter der Kontrolle der UPR steht (Mori 2009). Osmotischer Stress hingegen verändert den pH-Wert in der Zelle und kann den Transport von Substraten und Co-Faktoren zur korrekten Proteinfaltung stören. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen osmotischen Schock und der Chaperon Expression beschrieben (Ho 2006). Auch diese Stressoren können die Proteinlast indirekt im ER erhöhen. Die *hsp4*-Expression war in den *uba5 knock-out* Würmern unter Tunicamycin-, Hitze- und Osmo-Stress stark erhöht (Abb. 41, Abb. 44). Stressinduktion durch DTT zeigte bei den *uba5 knock-out* Würmern hingegen keine einheitliche Stressantwort im *hsp4*-Expressions Level, wobei aber in den *uba5 knock-out* Würmern die *hsp4*-Expressionn deutlich erhöht vorlag (Abb. 41).

Somit konnte eine Abhängigkeit der *hsp4*-Expression vom Ufm1-aktivierenden Enzym Uba5 unter dem Einfluss von direkten und indirekten ER-Stressoren aufgezeigt werden.

Weiterführend wurde die Überlebensrate zwischen Kreuzung und Kontrolle miteinander verglichen, wobei die Stressoren Tunicamycin, DTT und Hitze eingesetzt wurden (Abb. 38,

Abb. 42). In diesem Fall zeigte sich bei allen drei ER-Stressoren eine hoch signifikant gesteigerte Überlebensrate bzw. Stresstoleranz nach *uba5 knock-out* gegenüber der Kontrolle. Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit begonnenen Microarray Studien zeigten, dass unter leichtem Hitze-Stress keine gesteigerte Expression von *hsps* vorliegt. Ein alternativer Mechanismus, den ER-Stress zu bewältigen, stellt der ABU-Weg dar, der bei einer gestörten UPR aktiviert wird (Urano *et al.* 2002). Die Microarray-Analysen lassen eine reduzierte Genexpression der sieben in den Analysen berücksichtigten *abu*-Gene in der Deletionsmutante erkennen (Tab. 13). Diese Hinweise müssen allerdings noch durch quantitative PCRs verifiziert werden.

4.4.1.1 Identifizierung des UPR Signaltransduktors Pek-1

Die ermittelten Ergebnisse bezüglich der *hsp4*-Expression (Abb. 40, Abb. 41) und die gesteigerte Überlebensrate unter ER-Stress der *uba5(ok3364)*-Mutante (Abb. 42) ließen die Annahme zu, dass die ER-Signaltransduktoren der UPR durch die Ufm1-Kaskade beeinflusst bzw. reguliert werden könnten.

Zur Identifizierung einer Abhängigkeit zwischen UPR Signalweg und der Ufm1-Kaskade wurde ein Tunicamycin-Sensitivitäts-assay durchgeführt. Die *C. elegans* Entwicklung wurde unter dem Einfluss des ER-Stressors Tunicamycin nach *knock-down* der Ufm1-Kaskaden Komponenten *ufm1*, *uba5*, *uf11* und *ufbp1* im Vergleich zur Kontrolle (L4440) untersucht. Diese Analysen erfolgten im Wt (N2) (Abb. 45) als auch in den drei Deletionsmutanten der UPR-Signaltransduktoren *ire-1(v33)* (Abb. 46), *pek-1(ok275)* (Abb. 48) und *atf-6(ok551)* (Abb. 47). Einzig in der Deletionsmutante *pek-1(ok275)* konnte kein nennenswerter Verhältnisunterschied in der Entwicklung beim *knock-down* von *ufm1*, *uba5* und *uf11* im Vergleich zur Kontrolle (L4440) dokumentiert werden (Abb. 48). Ein deutlicher Verhältnisunterschied lag hingegen nach *ufbp1 knock-down* in *pek-1(ok275)* vor. Da es sich bei Ufbp1 um ein Zielprotein der Ufm1-Kaskade handelt und nicht um ein Kernelement des Ufm1-Signalwegs, ist ein abweichendes Verhalten durchaus möglich. So besitzt Ufbp1 höchstwahrscheinlich neben einer auf die Ufm1-Kaskade beschränkten Funktion weitere durch die PCI-Domäne vermittelte Aufgaben innerhalb großer Proteinkomplexe (Neziri *et al.* 2010, Tatsumi *et al.* 2010). Die weiteren verwendeten *C. elegans* Stämme Wt, *ire-1(v33)* und *atf-6(ok551)*, wiesen alle eine deutliche Veränderung in der Entwicklung nach *knock-down* einer der Ufm1-Komponenten im Vergleich zur Kontrolle auf.

Somit lässt sich festhalten, dass die Inhibierung von zentralen Komponenten der Ufm1-Kaskade in *pek-1(ok275)* Null-Mutanten zu keiner Sensitivitätsveränderung gegenüber

Tunicamycin im Vergleich zu *pek-1(ok275)* Null-Mutanten alleine führten. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Ufm1-Kaskade und dem ER-Signaltransduktors Pek-1 unter Tunicamycin-Stress konnte daher aufgezeigt werden. Nach diesen Ergebnissen scheint die Ufm1-Kaskade in *C. elegans* im gleichen genetischen Signalweg zu agieren wie Pek-1.

In der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* scheint der ER-Stress trotz verstärkter *hsp4*-Expression nicht größer zu sein und nicht schädigender zu wirken, da die Überlebensrate sonst reduziert und nicht gesteigert wäre. Somit scheint die Regulation der UPR unter Stress mit hoher Wahrscheinlichkeit gestört. Es ist anzunehmen, dass verhältnismäßig wenig Stress bereits eine hohe Stress-Antwort in der Mutante *uba5(ok3364)* auslöst. Durch die erhöhte *hsp4*-Expression sind die angelegten Stressoren weniger schädigend, wodurch sich wiederum die Stresstoleranz erhöht.

Die feine Regulation von Chaperonen, wie *hsp4*, ist essentiell für einen Organismus. So wirkt die Überexpression von ER-Chaperonen in der Abwesenheit von ER-Stress toxisch auf die Zelle und führt zu einer verminderten Zell-Teilung (Mori *et al.* 2000, Okada *et al.* 2002). Somit könnte die postulierte Unverhältnismäßigkeit in der Stressantwort durch die vermehrte Expression von Chaperonen (*hsp4*-Expression) die verzögerte Entwicklung und verkürzte Lebensdauer der *knock-out* Mutante *uba5(ok3364)* erklären. Des Weiteren weist ein Organismus unter natürlichen Bedingungen in seiner Entwicklung häufig ein basales ER-Stress-Level auf (Wu und Kaufman 2006). In Kombination mit der postulierten Unverhältnismäßigkeit der ER-Stressantwort stellt dies vermutlich den Grund für die leicht erhöhte *hsp4*-Expression ohne Stressoren in der *uba5 knock-out* Mutante dar (Abb. 41, K).

Inwieweit die Ufm1-Kaskade den UPR-Signaltransduktor Pek-1 beeinflussen könnte, wird im Folgenden diskutiert. So vermittelt Pek-1 nicht nur den allgemeinen Translationsstopp bei ER-Stress, sondern führt auch zur Synthese des Transkriptionsfaktors ATF4, welcher die Gen-Expression von beispielsweise Proteinen zur Glutathion-Biosynthese und zur Resistenz gegenüber oxidativem Stress induziert (Harding *et al.* 2000, Mori 2009). Allerdings wird der Transkriptionsfaktor ATF4 nur synthetisiert, wenn der Translationsstopp durch die Pek-1 vermittelte Phosphorylierung von eIF2 α erfolgt ist. Beim Pek-1 induzierten Translationsstopp handelt es sich um einen fein regulierten Prozess. So synthetisiert ATF4 unter anderem auch GADD34, was wiederum die Phosphorylierung von eIF2 α aufhebt und somit einen negativen *feedback-loop* bildet, denn eine fehlerhafte Regulation bezüglich des Translationsstopps kann äußerst schädlich sein (Mori *et al.* 2000, Okada *et al.* 2002). So ist unter Berücksichtigung der verbesserten Überlebensrate der *knock-out* Mutante unter Stress eine veränderte Regulation des Translationsstopps innerhalb dieses Signalwegs durch die Ufm1-Kaskade damit eher

unwahrscheinlich. Vielmehr sind mögliche *crosstalks* zwischen den einzelnen Signaltransduktoren wahrscheinlich. Da die Expression von *hsp4* in *C. elegans* über Ire-1 bzw. den nachfolgenden Transkriptionsfaktor Xbp-1 geschieht, ist eine Ire-1/Xbp-1 Regulation über Pek-1 denkbar. Hierzu ist zu erwähnen, dass Ire-1 und Xbp-1 auch separate Signalwege aufweisen. So wird beispielsweise die Biogenese der ER-Membran durch Xbp-1 in Ire-1 unabhängiger Weise reguliert (Sriburi *et al.* 2004, Wu und Kaufman 2006, Rasheva und Domingos 2009). Dies ist besonders interessant in Bezug auf die gestörte ER-Membranbiogenese nach Ufbp1-Überexpression und könnte eine mögliche Verbindung von Pek-1 zu Xbp-1 aufzeigen (Shiwaku *et al.* 2010).

4.4.2 Oxidativer Stress

In der *uba5 knock-out* Mutante wurde die Wirkung von oxidativem Stress auf die *hsp4*-Expression geprüft. Hierbei erfolgte die Exposition der Kreuzung (*uba5(ok3364)::hsp4-GFP*) und der Kontrolle (*hsp4-GFP*) gegenüber Juglon, Paraquat und t-BOOH (Abb. 43). Es konnte eine Zunahme der *hsp4*-Expression bei den verwendeten Stressoren auf Grund des *uba5 knock-out* beobachtet werden. Die hier ermittelten Ergebnisse verdeutlichen, dass Uba5 in der Abwehr von Juglon, Paraquat und t-BOOH induziertem oxidativen Stress eine essentielle Rolle zu spielen scheint. Den stärksten Effekt wies dabei Juglon auf (Abb. 43, J) und veranschaulicht die hohe Sensitivität von *C. elegans* gegenüber diesem toxischen Stressor. Juglon ist stabiler als H₂O₂ und toxischer als Paraquat und kann auf Grund seiner Molekülgröße leicht über die Cuticula aufgenommen werden (Blum und Fridovich 1983).

Allen hier verwendeten Stressoren ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gemein. ROS können mit Proteinen direkt interagieren und deren dreidimensionale Struktur verändern, indem beispielsweise funktionelle Gruppen oxidiert oder Proteinmodifikationen wie Phosphorylierung und Acetylierung gestört werden. Eine solche Veränderung führt häufig zur Proteinaggregation und dem Ubiquitin-abhängigen Abbau im Proteasom, wenn eine korrekte Faltung durch den Einsatz von beispielsweise Chaperonen im ER ausbleibt (Davies 1987, Kerscher *et al.* 2006). Des Weiteren können ROS aber auch durch Angreifen der DNA, die Oxidation, Nitrierung, Depurinierung, Methylierung und Deaminierung von Basen induzieren. Die Entfernung solcher Mutationen durch DNA-Reparaturmechanismen, wie beispielsweise NER (*Nucleotide Excision Repair*), ist essentiell. Eine fehlerhafte Translation und damit eine veränderte dreidimensionale Struktur wäre die Folge (Wood 1997, Kerscher *et al.* 2006). ROS stellt somit für die Zelle einen erheblichen Stressfaktor dar und kann auch ER-Stress bedingen.

Auch wurde die Überlebensrate der *C. elegans*-Linie *uba5(ok3364)::hsp4-GFP* geprüft. Hierzu wurde selektiv als Repräsentant der oxidative Stressor Juglon verwendet. Eine signifikant erhöhte Überlebensrate durch den *uba5 knock-out* konnte unter Juglon-Stress ermittelt werden (Abb. 38). Eine Abhängigkeit zwischen gesteigerter *hsp4*-Expression und besserer Überlebensrate unter oxidativem Stress nach *uba5 knock-out* ist anzunehmen. Nachdem ein *uba5 knock-out* zu einer erhöhten Stressresistenz führt, wurde geprüft, inwieweit eine Überexpression von Uba5 Einfluss auf die Juglonstressresistenz nimmt. Hierbei konnte keine veränderte Stresstoleranz im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden (Abb. 39).

Zur Bewältigung von oxidativem Stress nimmt der Daf-2 Signalweg (*insulin-like-pathway*) eine zentrale Position ein. Zusätzlich spielt dieser Signalweg eine wichtige Rolle in Bezug auf Langlebigkeit, UV-Resistenz, Thermotoleranz und Schwermetallresistenz (Barsyte *et al.* 2001, Yanase *et al.* 2002, de Castro *et al.* 2004). Unter Stressbedingungen bleibt die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Daf-16 im Daf-2 Signalweg aus. Daraufhin transloziert Daf-16 in den Zellkern und induziert die Expression von Stressantwort-Genen (Barbieri *et al.* 2003). Zur Ermittlung eines Zusammenhangs zwischen dem Daf-2 Signalweg und der Ufm1-Kaskade wurde die *C. elegans*-Linie *daf-16::GFP(zIs356)IV* (CGC; Stamm TJ356) verwendet (Henderson und Johnson 2001). Dabei wurde untersucht wie sich der RNAi vermittelte *knock-down* der Ufm1-Komponenten (*ufsp2*, *ufm1*, *uba5*, *ufc1*, *ufl1* und *ufbp1*) auf die Kerntranslokation von Daf-16 auswirkt. Es konnte keine Daf-16 Lokalisationsänderung identifiziert werden, die auf eine veränderte Aktivität des Daf-2 Signalwegs schließen lässt (Daten nicht gezeigt).

4.4.3 B. thuringiensis - Stressresistenz

Das Bakterium *Bacillus thuringiensis* wird als Toxin häufig in der Landwirtschaft eingesetzt. Dabei bilden manche Bakterien-Stämme das kristalline *Cry*-Protein (BT-Toxin), das selektiv hoch toxisch gegenüber Insekten und Nematoden wirkt. Die *Cry*-Proteine werden zur Gruppe der PFTs (*pore-forming toxins*) gezählt und binden an der Darmwand, wobei die Plasmamembran der Intestinalzellen permeabilisiert wird. *C. elegans* ist ein gutes Modellsystem zur Untersuchung der angeborenen Immunabwehr gegen pathogen wirkende Substanzen (Gravato-Nobre und Hodgkin 2005, Chen *et al.* 2010).

Eine hoch signifikant verbesserte Überlebensrate der *uba5(ok3364)*-Mutante konnte unter *B. thuringiensis*-Stress beobachtet werden (Abb. 38). Diverse Signalwege vermitteln die Resistenz gegenüber *Cry*-Proteinen in *C. elegans*. So wird beispielsweise die Ubiquitin E3

Ligase WWP-1 unter *B. thuringiensis*-Stress durch den Daf-2 Signalweg aktiviert und sorgt für eine erhöhte Pathogen-Resistenz (Chen *et al.* 2010). Auch eine generelle Immunantwort auf Proteine der PFT-Gruppe erfolgt durch die MAPK-Weg (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) vermittelte Aktivierung der UPR-Signaltransduktoren Ire-1 und ATF6 (Bischof *et al.* 2008). Als weiterer Mechanismus zur BT-Stressresistenz erfolgt die UPR-Aktivierung, im Besonderen über den ABU-Weg, durch CED-1 (Haskins *et al.* 2008). Die ermittelte verbesserte Toleranz der *uba5(ok3364)*-Mutante gegenüber *B. thuringiensis*-Stress lässt sich auf Grund uneinheitlicher und wenig aussagekräftiger Ergebnisse nicht durch die begonnenen Microarray-Studien klären. Weiterführende Untersuchungen sind daher notwendig.

4.4.4 Metall-Stress

Hefe-Zwei-Hybrid Analysen konnten wie bereits beschrieben im Rahmen dieser Arbeit auf eine Interaktion zwischen UfSP2 und Kel-8 hinweisen und lassen so eine Funktion von Kel-8 in der Ufm1-Kaskade annehmen (Abb. 20). In diesem Zusammenhang ist die identifizierte erhöhte Cadmium-Sensitivität nach RNAi vermitteltem *knock-down* von *kel-8* in *C. elegans* zu erwähnen (Cui *et al.* 2007). Als Stressor führt Cadmium wie auch andere Schwermetalle zu oxidativem Stress, Lipidperoxidation und wird als Mutagen eingeordnet (Baudouin-Cornu und Labarre 2006). Eine direkte proteinschädigende Wirkung konnte durch die Cadmiumbindung an Sulfhydrylgruppen von Proteinen identifiziert werden (Figueiredo-Pereira *et al.* 1998).

Zur Untersuchung einer Kel-8 Beteiligung in der Ufm1-Kaskade wurde daher die Überlebensrate der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* unter Cadmiumstress untersucht. Dabei zeigte sich abweichend zu allen zuvor untersuchten Stressoren eine signifikant reduzierte Überlebensrate durch den *uba5 knock-out* (Abb. 38). Da die zuvor beschriebenen Untersuchungen zu oxidativem Stress und ER-Stress einen gegenteiligen Effekt in der Überlebensrate aufwiesen, muß der Einfluss allein auf die Wirkung von Cadmium als Metallstressor zurückzuführen sein. Hierzu ist zu sagen, dass Kel-8 *C. elegans* vor der toxikologischen Wirkung von Cadmium in MEK-1 (MAPK) abhängiger Weise schützt. Der MAP Kinase-Weg ist Teil der Schwermetall Antwort in *C. elegans* und Kel-8 interagiert mit den daran beteiligten Komponenten MEK-1, PMK-1, MPK-1 und MKK-4 (Cui *et al.* 2007).

Nach einleitenden Microarray Untersuchungen konnte eine reduzierte Gen-Expression von *kel-8* und *mek-1* in der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* beobachtet werden. Der beobachtete Phänotyp sowie die ermittelte Interaktion zu Kel-8 stützt eine mögliche Beteiligung von Kel-8 in der Ufm1-Kaskade.

4.4.5 Regulation der Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Wegs

Wie bereits diskutiert wurden anfängliche Transkriptom- und Proteom-Analysen der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* durchgeführt um Mechanismen aufzudecken, welche sowohl die Funktion der Ufm1-Kaskade als auch die erhöhte Stressresistenz in *C. elegans* darlegen.

Einleitende Proteom-Analysen der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* erfolgten mittels LC-MS und wurden mit dem *C. elegans* Wt (N2) unter Standardkultivierungsbedingungen verglichen (Tab. 15 siehe Anhang). Wie bereits durch diverse Studien gezeigt werden konnte, sind die Anpassungen auf Transkriptom- und Proteom-Ebene verschiedenster Organismen bei genetischer Störung oder Veränderung des Umfelds teilweise verhältnismäßig gering. Zudem ist die Synthese von Enzymen, die ROS neutralisieren, unter oxidativem Stress nicht generell erhöht (Desaint *et al.* 2004, Ishii *et al.* 2007). Vergleichbares wurde in der vorläufigen Proteom-Analyse der *uba5 knock-out* Mutante ermittelt. So konnten weder direkt an der Neutralisierung von Stress beteiligte als auch die Entwicklung beeinflussende Proteine identifiziert werden.

Interessanterweise kam es zu einer starken Verringerung aller vier in *C. elegans* bekannten GAPDHs (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) (Tab. 15 siehe Anhang). GAPDH stellt ein Enzym der Glykolyse dar und katalysiert die reversible oxidative Phosphorylierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat (Ralser *et al.* 2007). Eine Inaktivierung und der Transport in den Zellkern von GAPDH kann durch den Einfluss verschiedenster Oxidationsmittel (ROS) erfolgen, wobei GAPDH unter diesen oxidativen Bedingungen S-nitrosyliert, S-thioliert, S-glutathionyliert, carboxyliert und ADP-ribosyliert werden kann (Ravichandran *et al.* 1994, Colussi *et al.* 2000, Dastoor und Dreyer 2001, Shenton und Grant 2003, Chuang *et al.* 2005, Newman *et al.* 2007). Als Folge dieser Inaktivierung und Lokalisationsänderung von GAPDH werden dem Pentose-Phosphat-Weg (PPP) vermehrt Kohlenwasserstoffverbindungen zugeführt. Die daraufhin gesteigerte Aktivität dieses Stoffwechselwegs führt zur vermehrten NADPH-Bildung und erhöht damit die Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Vergleichbares konnte nach *tpi* (Triosephosphat Isomerase) *knock-out* in *C. elegans* beobachtet werden. Hierbei führte die Reduktion von GAPDH zur Erhöhung des PPP (Nogae und Johnston 1990, Pollak *et al.* 2007, Ralser *et al.* 2007). Somit ist die gesteigerte Stressresistenz der Deletionsmutante *uba5(ok3364)* unter Umständen auf die Aktivitätssteigerung des PPP zurückzuführen. Möglicherweise beeinflusst dies auch die signifikant reduzierte Lebensdauer von *uba5(ok3364)* im Vergleich zum Wt (Abb. 36). Wie bereits durch verschiedene Studien gezeigt werden konnte, ist die normale

Aktivität des PPP zentral für eine natürliche Lebensspanne eukaryotischer Organismen (Gnerer *et al.* 2006, Ralser *et al.* 2007). Die Transkriptom-Analysen der *uba5(ok3364)*-Mutante unterstützen die LC-MS Ergebnisse und lassen eine Reduzierung der Genexpression von *tpi-1*, *gpd-1* und *gpd-3* erkennen (Abb. 54). Bekannt ist auch eine Beteiligung der *C. elegans* GAPDH Proteine Gpd-1 und Gpd-4 in der embryonalen Entwicklung und in der Ausbildung der Körperstruktur (Yarbrough und Hecht 1984, Huang *et al.* 1989). Somit könnte die erhöhte Stress-Resistenz der Mutante *uba5(ok3364)* wie auch die Entwicklungsverzögerung, die verringerte Lebensdauer und Reproduktionsrate auf eine veränderte GAPDH-Regulation und im speziellen dem Pentose-Phosphat-Weg begründet sein. Dies sollte in den weiterführenden Studien untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Veränderungen der Aktivität, Stabilität und intrazellulären Lokalisation von Proteinen sind für viele zelluläre und für den Organismus lebensnotwendige Prozesse erforderlich. Die Variabilität im Proteom kann durch gezielte Protein-Veränderungen nach der Translation erfolgen. Diese werden als posttranslationale Modifikationen bezeichnet und umfassen das Anheften von Molekülen bzw. funktionellen Gruppen an spezifische Aminosäuren der Proteine. Im Gegensatz zu niedermolekularen Modifikationen ermöglicht das Anheften von kleinen Proteinen auf Grund der Polypeptidstruktur eine höhere chemische Variation der konjugierten Proteine. Hier ist der wohl bekannteste Vertreter das Ubiquitin, welches sequentiell durch eine Kaskade bestehend aus E1-, E2- und E3-Enzym kovalent an ein entsprechendes Zielprotein konjugiert wird.

Seit der Entdeckung von Ubiquitin (1974) wurden diverse Proteine identifiziert, die eine strukturelle Homologie zu Ubiquitin aufweisen und ebenfalls an ein Zielprotein konjugiert werden, die sogenannten UBLs. Das zuletzt identifizierte und bisher wenig erforschte UBL Ufm1 (*Ubiquitin-fold modifier 1*) (Komatsu *et al.* 2004) steht im Zentrum dieser Arbeit.

Eine Funktion der Ufm1-Kaskade ist bisher nicht eindeutig zugeordnet. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde daher die Ufm1-Kaskade des Modellorganismus *C. elegans* funktionell charakterisiert. Mittels *in vitro* und *in vivo* Interaktionsstudien wurde der gesamte Aufbau der Ufm1-Kaskade in *C. elegans* erstmalig untersucht. Durchgeführte Lokalisationsstudien zeigten eine starke Expression der Ufm1-Kaskade und deren potentiellen Bindungspartnern hauptsächlich im Darm und in verschiedenen Neuronen auf.

Weiterführend erfolgte die Phänotypisierung der Deletionsmutante *uba5(ok3364)*, wobei eine reduzierte adulte Lebensdauer, Reproduktionsrate, larvale Entwicklung und Resistenz gegenüber Cadmium ermittelt wurde. Hingegen zeigte sich eine verbesserte Stresstoleranz gegenüber oxidativem-, ER-Stress und pathogen wirkende Substanzen.

Ein Zusammenhang zwischen der Ufm1-Kaskade und ER-Stress konnte mittels *knock-down* und *knock-out* Untersuchungen aufgezeigt werden. Hierbei lag eine erhöhte Chaperon-Expression (*hsp4*-Reportergergen) unter ER-Stressbedingungen nach Funktionsverlust der Ufm1-Kaskade vor. Zudem konnte gezeigt werden, dass unter Tunicamycin-Stress ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Ufm1-Kaskade und dem ER-Signaltransduktor Pek-1 besteht.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Ufm1-Kaskade physiologisch von zentraler Bedeutung für *C. elegans* ist. Eine regulatorische Funktion der Ufm1-Kaskade in der ER-Stressantwort konnte gezeigt werden.

6.2 Ergebnisse der LC-MS Analyse**Tab. 15: Ergebnisse der LC-MS Analyse. (4)**

Bezeichnung	Beschreibung	wt:uba_Ratio
A7LPD7_CAEEL	Vitellogenin structural genes (Yolk protein genes) protein 2, isoform b OS=C. elegans GN=vit-2 PE=4 SV=1	0,44
VIT3_CAEEL	Vitellogenin-3 OS=C. elegans GN=vit-3 PE=1 SV=1	0,45
VIT4_CAEEL	Vitellogenin-4 OS=C. elegans GN=vit-4 PE=1 SV=3	0,46
VIT5_CAEEL	Vitellogenin-5 OS=C. elegans GN=vit-5 PE=2 SV=2	0,49
MYO2_CAEEL	Myosin-2 OS=C. elegans GN=myo-2 PE=2 SV=2	0,58
TBB1_CAEEL	Tubulin beta-1 chain OS=C. elegans GN=mec-7 PE=2 SV=1	0,58
SAHH_CAEEL	Adenosylhomocysteinase OS=C. elegans GN=ahcy-1 PE=1 SV=1	0,64
HSP7D_CAEEL	Heat shock 70 kDa protein D OS=C. elegans GN=hsp-4 PE=1 SV=2	0,65
ACT1_CAEEL	Actin-1/3 OS=C. elegans GN=act-1 PE=1 SV=2	0,7
HSP7C_CAEEL	Heat shock 70 kDa protein C OS=C. elegans GN=hsp-3 PE=1 SV=2	0,7
VIT2_CAEEL	Vitellogenin-2 OS=C. elegans GN=vit-2 PE=1 SV=5	0,73
EF1A_CAEEL	Elongation factor 1-alpha OS=C. elegans GN=eft-3 PE=2 SV=1	0,73
MMSA_CAEEL	Probable methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, OS=C. elegans GN=alh-8 PE=1 SV=1	0,76
VIT6_CAEEL	Vitellogenin-6 OS=C. elegans GN=vit-6 PE=1 SV=5	0,79
O45815_CAEEL	Protein T25C8.2, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=act-5 PE=2 SV=1	0,79
TCPT_CAEEL	Translationally-controlled tumor protein homolog OS=C. elegans GN=tct-1 PE=1 SV=1	0,79
RS17_CAEEL	40S ribosomal protein S17 OS=C. elegans GN=rps-17 PE=2 SV=2	0,79
Q7JK11_CAEEL	Protein R11A5.4b, partially confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=R11A5.4 PE=2 SV=1	0,8
TBB2_CAEEL	Tubulin beta-2 chain OS=C. elegans GN=tbb-2 PE=2 SV=1	0,82
Q18817_CAEEL	Protein C54C6.2, partially confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=ben-1 PE=2 SV=3	0,82
O17921_CAEEL	Protein K01G5.7, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=tbb-1 PE=2 SV=1	0,83
MYO4_CAEEL	Myosin-4 OS=C. elegans GN=unc-54 PE=1 SV=1	0,84
Q7JK12_CAEEL	Protein R11A5.4d, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=R11A5.4 PE=2 SV=1	0,84
O02286_CAEEL	Protein R11A5.4a, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=R11A5.4 PE=2 SV=1	0,84
ACT2_CAEEL	Actin-2 OS=C. elegans GN=act-2 PE=2 SV=3	0,85

ANHANG

ACT4_CAEEL	Actin-4 OS=C. elegans GN=act-4 PE=2 SV=2	0,86
ATP_CAEEL	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=C. elegans GN=atp-2 PE=1 SV=2	0,88
Q86NF5_CAEEL	Elongation factor 1-alpha OS=C. elegans GN=eef-1a.2 PE=1 SV=1	0,88
Q7JK13_CAEEL	Protein R11A5.4c, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=R11A5.4 PE=2 SV=1	0,89
TBA2_CAEEL	Tubulin alpha-2 chain OS=C. elegans GN=tba-2 PE=2 SV=1	0,92
RSSA_CAEEL	40S ribosomal protein SA OS=C. elegans GN=rps-0 PE=1 SV=3	0,92
O18154_CAEEL	Protein T28D6.2, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=tba-7 PE=2 SV=1	0,93
Q17409_CAEEL	Alpha-1 tubulin OS=C. elegans GN=tba-1 PE=2 SV=1	0,93
Q7JM11_CAEEL	Protein F13D12.4b, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=alh-8 PE=2 SV=1	1,14
Q93576_CAEEL	Nucleoside diphosphate kinase OS=C. elegans GN=F25H2.5 PE=2 SV=1	1,15
MYSP_CAEEL	Paramyosin OS=C. elegans GN=unc-15 PE=1 SV=1	1,2
HSP7A_CAEEL	Heat shock 70 kDa protein A OS=C. elegans GN=hsp-1 PE=1 SV=2	1,2
A8DYR6_CAEEL	Peroxiredoxin protein 2, isoform b OS=C. elegans GN=prdx-2 PE=4 SV=1	1,21
Q8IG31_CAEEL	Peroxiredoxin protein 2, isoform a OS=C. elegans GN=prdx-2 PE=2 SV=1	1,22
CH60_CAEEL	Chaperonin homolog Hsp-60, mitochondrial OS=C. elegans GN=hsp-60 PE=1 SV=2	1,23
RL19_CAEEL	60S ribosomal protein L19 OS=C. elegans GN=rpl-19 PE=2 SV=1	1,23
O45904_CAEEL	Protein W09H1.6b, partially confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=lec-1 PE=1 SV=1	1,23
RLA0_CAEEL	60S acidic ribosomal protein P0 OS=C. elegans GN=rpa-0 PE=1 SV=3	1,25
ENO_CAEEL	Enolase OS=C. elegans GN=enol-1 PE=1 SV=3	1,26
LECI_CAEEL	32 kDa beta-galactoside-binding lectin OS=C. elegans GN=lec-1 PE=1 SV=1	1,28
ACON_CAEEL	Probable aconitate hydratase, mitochondrial OS=C. elegans GN=aco-2 PE=1 SV=2	1,3
G3P1_CAEEL	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 OS=C. elegans GN=gpd-1 PE=1 SV=1	1,34
RS3A_CAEEL	40S ribosomal protein S3a OS=C. elegans GN=rps-1 PE=1 SV=2	1,34
VIT1_CAEEL	Vitellogenin-1 OS=C. elegans GN=vit-1 PE=1 SV=2	1,38
CYP7_CAEEL	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 7 OS=C. elegans GN=cyn-7 PE=1 SV=2	1,38
Q9GNP7_CAEEL	Galectin LEC-2 OS=C. elegans GN=lec-2 PE=2 SV=1	1,4
RLA1_CAEEL	60S acidic ribosomal protein P1 OS=C. elegans GN=rpl-1 PE=1 SV=2	1,42
O45246_CAEEL	Protein C12C8.1, partially confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=hsp-70 PE=2 SV=1	1,46
Q9XTL8_CAEEL	Protein F44E5.4, partially confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=F44E5.4 PE=1 SV=1	1,57

ANHANG

O01869_CAEEL	Ribosomal protein, small subunit protein 10 OS=C. elegans GN=rps-10 PE=1 SV=1	1,68
G3P4_CAEEL	Glycerlaldehyde-3-phosphate dehydrogenase 4 OS=C. elegans GN=gpd-4 PE=2 SV=1	2,1
Q9XVE9_CAEEL	Protein C04F12.4, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=rp1-14 PE=2 SV=1	2,23
G3P2_CAEEL	Glycerlaldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 OS=C. elegans GN=gpd-2 PE=1 SV=2	2,61
G3P3_CAEEL	Glycerlaldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 OS=C. elegans GN=gpd-3 PE=2 SV=1	2,64
CYP1_CAEEL	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1 OS=C. elegans GN=cyn-1 PE=2 SV=1	uba
IF4A_CAEEL	Eukaryotic initiation factor 4A OS=C. elegans GN=inf-1 PE=2 SV=1	wt
Q9UQA6_CAEEL	Rab family protein 1 OS=C. elegans GN=rab-1 PE=2 SV=1	wt
Q8IG19_CAEEL	Aldehyde dehydrogenase protein 1, isoform b, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=alh-1 PE=2 SV=1	wt
O44906_CAEEL	Putative uncharacterized protein W05G11.6 OS=C. elegans GN=W05G11.6 PE=2 SV=2	wt
RLA2_CAEEL	60S acidic ribosomal protein P2 OS=C. elegans GN=rpa-2 PE=1 SV=2	wt
O17908_CAEEL	CeERp57 OS=C. elegans GN=pdi-3 PE=2 SV=1	wt
RS9_CAEEL	40S ribosomal protein S9 OS=C. elegans GN=rps-9 PE=2 SV=1	wt
RL18_CAEEL	60S ribosomal protein L18 OS=C. elegans GN=rpl-18 PE=3 SV=1	wt
RS7_CAEEL	40S ribosomal protein S7 OS=C. elegans GN=rps-7 PE=2 SV=1	wt
TBB4_CAEEL	Tubulin beta-4 chain OS=C. elegans GN=tbb-4 PE=2 SV=1	wt
Q20780_CAEEL	Aldehyde dehydrogenase protein 1, isoform a, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=alh-1 PE=2 SV=3	wt
Q17407_CAEEL	ADP/ATP translocase OS=C. elegans PE=2 SV=1	wt
Q8MNT7_CAEEL	Putative uncharacterized protein OS=C. elegans GN=F09F7.4 PE=2 SV=1	wt
Q9N384_CAEEL	Galectin protein 6, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=lec-6 PE=2 SV=1	wt
O18240_CAEEL	Protein Y57G11C.16, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=rps-18 PE=3 SV=1	wt
B4YEQ8_CAEEL	Mitochondrial adenine nucleotide translocase 1.2 (Fragment) OS=C. elegans PE=2 SV=1	wt
P91410_CAEEL	Mitochondrial adenine nucleotide translocase 1.4 OS=C. elegans GN=ant-1.4 PE=2 SV=1	wt
Q95XJ0_CAEEL	ATP synthase gamma chain OS=C. elegans GN=Y69A2AR.18 PE=2 SV=1	wt
MDHM_CAEEL	Probable malate dehydrogenase, mitochondrial OS=C. elegans GN=mdh-1 PE=2 SV=1	wt
O01813_CAEEL	Putative uncharacterized protein W02D3.6 OS=C. elegans GN=ant-1.2 PE=2 SV=1	wt
Q8ITY2_CAEEL	Putative uncharacterized protein W05G11.6 OS=C. elegans GN=W05G11.6 PE=2 SV=1	wt

ANHANG

CALR_CAEEL	Calreticulin OS=C. elegans GN=crt-1 PE=1 SV=1	wt
Q8ITY0_CAEEL	Putative uncharacterized protein W05G11.6 OS=C. elegans GN=W05G11.6 PE=2 SV=1	wt
Q22979_CAEEL	Histone protein 39 OS=C. elegans GN=his-39 PE=2 SV=2	wt
HSP7F_CAEEL	Heat shock 70 kDa protein F, mitochondrial OS=C. elegans GN=hsp-6 PE=1 SV=2	wt
O45865_CAEEL	Protein T27E9.1a, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=ant-1.1 PE=2 SV=1	wt
SIP1_CAEEL	Stress-induced protein 1 OS=C. elegans GN=sip-1 PE=1 SV=1	wt
Q8MNU1_CAEEL	Fructose-bisphosphate aldolase OS=C. elegans GN=aldo-2 PE=2 SV=1	wt
H2B3_CAEEL	Probable histone H2B 3 OS=C. elegans GN=his-41 PE=2 SV=3	wt
H2B4_CAEEL	Probable histone H2B 4 OS=C. elegans GN=his-48 PE=2 SV=3	wt
Q21103_CAEEL	Mitochondrial adenine nucleotide translocase 1.3 OS=C. elegans GN=ant-1.3 PE=2 SV=1	wt
Q9XW17_CAEEL	Protein Y18D10A.17, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=car-1 PE=1 SV=1	wt
O17759_CAEEL	Protein F01G10.1, confirmed by transcript evidence OS=C. elegans GN=kt-1 PE=4 SV=1	wt
ALF2_CAEEL	Fructose-bisphosphate aldolase 2 OS=C. elegans GN=aldo-2 PE=1 SV=1	wt
Q19278_CAEEL	Putative uncharacterized protein OS=C. elegans GN=F09F7.4 PE=2 SV=1	wt
H2B1_CAEEL	Histone H2B 1 OS=C. elegans GN=his-11 PE=1 SV=4	wt
H2B2_CAEEL	Histone H2B 2 OS=C. elegans GN=his-4 PE=1 SV=3	wt

7 Literaturverzeichnis

- Adams J., R. Kelso, L. Cooley. 2000. The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends in cell biology* **10**:17-24.
- Adhikari A., Z. J. Chen. 2009. Diversity of polyubiquitin chains. *Developmental cell* **16**:485-486.
- An J. H., T. K. Blackwell. 2003. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes & development* **17**:1882-1893.
- Azfer A., J. Niu, L. M. Rogers, F. M. Adamski, P. E. Kolattukudy. 2006. Activation of endoplasmic reticulum stress response during the development of ischemic heart disease. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **291**:H1411-20.
- Bacik J. P., J. R. Walker, M. Ali, A. D. Schimmer, S. Dhe-Paganon. 2010. Crystal structure of the human ubiquitin-activating enzyme 5 (UBA5) bound to ATP: mechanistic insights into a minimalistic E1 enzyme. *The Journal of biological chemistry* **285**:20273-20280.
- Barbieri M., M. Bonafe, C. Franceschi, G. Paolisso. 2003. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **285**:E1064-71.
- Barriere A., M. A. Felix. 2005. High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Current biology : CB* **15**:1176-1184.
- Barsyte D., D. A. Lovejoy, G. J. Lithgow. 2001. Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**:627-634.
- Batistic O., J. Kudla. 2004. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* **219**:915-924.
- Baudouin-Cornu P., J. Labarre. 2006. Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells. *Biochimie* **88**:1673-1685.
- Bayer P., A. Arndt, S. Metzger, R. Mahajan, F. Melchior, R. Jaenicke, J. Becker. 1998. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *Journal of Molecular Biology* **280**:275-286.
- Bedford L., J. Lowe, L. R. Dick, R. J. Mayer, J. E. Brownell. 2011. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nature reviews. Drug discovery* **10**:29-46.
- Beighton P., H. J. Cilliers, R. Ramesar. 1994. Autosomal dominant (Beukes) premature degenerative osteoarthropathy of the hip joint unlinked to COL2A1. *American Journal of Medical Genetics* **53**:348-351.

- Bertolotti A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding, D. Ron. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* **2**:326-332.
- Birnboim H. C., J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**:1513-1523.
- Bischof L. J., C. Y. Kao, F. C. Los, M. R. Gonzalez, Z. Shen, S. P. Briggs, F. G. van der Goot, R. V. Aroian. 2008. Activation of the unfolded protein response is required for defenses against bacterial pore-forming toxin in vivo. *PLoS pathogens* **4**:e1000176.
- Blanchard D., H. Hutter, J. Fleenor, A. Fire. 2006. A differential cytolocalization assay for analysis of macromolecular assemblies in the eukaryotic cytoplasm. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**:2175-2184.
- Blaxter M. 1998. *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science (New York, N.Y.)* **282**:2041-2046.
- Blum J., I. Fridovich. 1983. Superoxide, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity in two free-living nematode species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **222**:35-43.
- Bonifacino J. S., A. M. Weissman. 1998. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **14**:19-57.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Braeckman B. P., K. Houthoofd, J. R. Vanfleteren. 2001. Insulin-like signaling, metabolism, stress resistance and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of ageing and development* **122**:673-693.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**:71-94.
- Bruckner A., C. Polge, N. Lentze, D. Auerbach, U. Schlattner. 2009. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences* **10**:2763-2788.
- Buechner M. 2002. Tubes and the single *C. elegans* excretory cell. *Trends in cell biology* **12**:479-484.
- Burnette W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* **112**:195-203.
- C. *elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)* **282**:2012-2018.

- Cai R., P. Kwon, Y. Yan-Neale, L. Sambucetti, D. Fischer, D. Cohen. 2001. Mammalian histone deacetylase 1 protein is posttranslationally modified by phosphorylation. *Biochemical and biophysical research communications* **283**:445-453.
- Calfon M., H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark, D. Ron. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**:92-96.
- Canning M., C. Boutell, J. Parkinson, R. D. Everett. 2004. A RING finger ubiquitin ligase is protected from autocatalyzed ubiquitination and degradation by binding to ubiquitin-specific protease USP7. *The Journal of biological chemistry* **279**:38160-38168.
- Cao Y., G. Bonizzi, T. N. Seagroves, F. R. Greten, R. Johnson, E. V. Schmidt, M. Karin. 2001. IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell* **107**:763-775.
- Cardenas M. E., C. Hemenway, R. S. Muir, R. Ye, D. Fiorentino, J. Heitman. 1994. Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *The EMBO journal* **13**:5944-5957.
- Chalfie M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)* **263**:802-805.
- Chen B., J. Mariano, Y. C. Tsai, A. H. Chan, M. Cohen, A. M. Weissman. 2006. The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:341-346.
- Chen C. S., A. Bellier, C. Y. Kao, Y. L. Yang, H. D. Chen, F. C. Los, R. V. Aroian. 2010. WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS one* **5**:e9494.
- Chen H., L. Qi. 2010. SUMO modification regulates the transcriptional activity of XBP1. *The Biochemical journal* **429**:95-102.
- Ching Y. P., A. S. Pang, W. H. Lam, R. Z. Qi, J. H. Wang. 2002. Identification of a neuronal Cdk5 activator-binding protein as Cdk5 inhibitor. *The Journal of biological chemistry* **277**:15237-15240.
- Ching Y. P., Z. Qi, J. H. Wang. 2000. Cloning of three novel neuronal Cdk5 activator binding proteins. *Gene* **242**:285-294.
- Chuang D. M., C. Hough, V. V. Senatorov. 2005. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**:269-290.

- Chung C. H., S. H. Baek. 1999. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochemical and biophysical research communications* **266**:633-640.
- Ciechanover A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews.Molecular cell biology* **6**:79-87.
- Clague M. J., S. Urbe. 2006. Endocytosis: the DUB version. *Trends in cell biology* **16**:551-559.
- Clos J., S. Brandau. 1994. pJC20 and pJC40--two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* **5**:133-137.
- Cohen M., F. Stutz, N. Belgareh, R. Haguenaer-Tsapis, C. Dargemont. 2003. Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nature cell biology* **5**:661-667.
- Collavin L., M. Gostissa, F. Avolio, P. Secco, A. Ronchi, C. Santoro, G. Del Sal. 2004. Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:8870-8875.
- Colussi C., M. C. Albertini, S. Coppola, S. Rovidati, F. Galli, L. Ghibelli. 2000. H₂O₂-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**:2266-2276.
- Cook W. J., L. C. Jeffrey, E. Kasperek, C. M. Pickart. 1994. Structure of tetraubiquitin shows how multiubiquitin chains can be formed. *Journal of Molecular Biology* **236**:601-609.
- Corsi A. K. 2006. A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. *Analytical Biochemistry* **359**:1-17.
- Cort J. R., Y. Chiang, D. Zheng, G. T. Montelione, M. A. Kennedy. 2002. NMR structure of conserved eukaryotic protein ZK652.3 from *C. elegans*: a ubiquitin-like fold. *Proteins* **48**:733-736.
- Coux O., K. Tanaka, A. L. Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry* **65**:801-847.
- Credle J. J., J. S. Finer-Moore, F. R. Papa, R. M. Stroud, P. Walter. 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:18773-18784.
- Cui Y., S. J. McBride, W. A. Boyd, S. Alper, J. H. Freedman. 2007. Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome biology* **8**:R122.

- Culetto E., D. B. Sattelle. 2000. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Human molecular genetics* **9**:869-877.
- Dantuma N. P., C. Heinen, D. Hoogstraten. 2009. The ubiquitin receptor Rad23: at the crossroads of nucleotide excision repair and proteasomal degradation. *DNA repair* **8**:449-460.
- Darom A., U. Bening-Abu-Shach, L. Broday. 2010. RNF-121 is an endoplasmic reticulum-membrane E3 ubiquitin ligase involved in the regulation of beta-integrin. *Molecular biology of the cell* **21**:1788-1798.
- Dastoor Z., J. L. Dreyer. 2001. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *Journal of cell science* **114**:1643-1653.
- Davies K. J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *The Journal of biological chemistry* **262**:9895-9901.
- de Castro E., S. Hegi de Castro, T. E. Johnson. 2004. Isolation of long-lived mutants in *Caenorhabditis elegans* using selection for resistance to juglone. *Free radical biology & medicine* **37**:139-145.
- Desaint S., S. Luriau, J. C. Aude, G. Rousselet, M. B. Toledano. 2004. Mammalian antioxidant defenses are not inducible by H₂O₂. *The Journal of biological chemistry* **279**:31157-31163.
- Dornan D., H. Shimizu, A. Mah, T. Dudhela, M. Eby, K. O'rourke, S. Seshagiri, V. M. Dixit. 2006. ATM engages autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1 after DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* **313**:1122-1126.
- Dorner A. J., L. C. Wasley, R. J. Kaufman. 1992. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *The EMBO journal* **11**:1563-1571.
- Dou T., S. Gu, J. Liu, F. Chen, L. Zeng, L. Guo, Y. Xie, Y. Mao. 2005. Isolation and characterization of ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1, UBE1DC1. *Molecular biology reports* **32**:265-271.
- Edgar R. S., W. B. Wood. 1977. The nematode *Caenorhabditis elegans*: a new organism for intensive biological study. *Science (New York, N.Y.)* **198**:1285-1286.
- Eletr Z. M., D. T. Huang, D. M. Duda, B. A. Schulman, B. Kuhlman. 2005. E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nature structural & molecular biology* **12**:933-934.
- Ewing R. M., P. Chu, F. Elisma, H. Li, P. Taylor, S. Climie, L. McBroom-Cerajewski, M. D. Robinson, L. O'Connor, M. Li, R. Taylor, M. Dharsee, Y. Ho, A. Heilbut, L. Moore, S. Zhang, O. Ornatsky, Y. V. Bukhman, M. Ethier, Y. Sheng, J. Vasilescu, M. Abu-Farha, J. P. Lambert, H. S. Duewel, I. I. Stewart, B. Kuehl, K. Hogue, K. Colwill, K. Gladwish, B.

- Muskat, R. Kinach, S. L. Adams, M. F. Moran, G. B. Morin, T. Topaloglou, D. Figeys. 2007. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Molecular systems biology* **3**:89.
- Fang S., K. L. Lorick, J. P. Jensen, A. M. Weissman. 2003. RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer. *Seminars in cancer biology* **13**:5-14.
- Fearon P., O. Cohen-Fix. 2008. The endoplasmic reticulum takes center stage in cell cycle regulation. *Science signaling* **1**:pe4.
- Fields S., O. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
- Figueiredo-Pereira M. E., S. Yakushin, G. Cohen. 1998. Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* **273**:12703-12709.
- Foster D. B., J. E. Van Eyk, E. Marban, B. O'Rourke. 2009. Redox signaling and protein phosphorylation in mitochondria: progress and prospects. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **41**:159-168.
- Gallagher E., M. Gao, Y. C. Liu, M. Karin. 2006. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:1717-1722.
- Gems D., D. L. Riddle. 2000. Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **154**:1597-1610.
- Gems D., A. J. Sutton, M. L. Sundermeyer, P. S. Albert, K. V. King, M. L. Edgley, P. L. Larsen, D. L. Riddle. 1998. Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **150**:129-155.
- Gilmore T. D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**:6680-6684.
- Gnerer J. P., R. A. Kreber, B. Ganetzky. 2006. wasted away, a *Drosophila* mutation in triosephosphate isomerase, causes paralysis, neurodegeneration, and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:14987-14993.
- Gonczy P., C. Echeverri, K. Oegema, A. Coulson, S. J. Jones, R. R. Copley, J. Duperon, J. Oegema, M. Brehm, E. Cassin, E. Hannak, M. Kirkham, S. Pichler, K. Flohrs, A. Goessen, S. Leidel, A. M. Alleaume, C. Martin, N. Ozlu, P. Bork, A. A. Hyman. 2000. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature* **408**:331-336.

- Gonzalez-Serricchio A. S., P. W. Sternberg. 2006. Visualization of *C. elegans* transgenic arrays by GFP. *BMC genetics* **7**:36.
- Granato M., H. Schnabel, R. Schnabel. 1994. *pha-1*, a selectable marker for gene transfer in *C. elegans*. *Nucleic acids research* **22**:1762-1763.
- Gravato-Nobre M. J., J. Hodgkin. 2005. *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. *Cellular microbiology* **7**:741-751.
- Grishok A., H. Tabara, C. C. Mello. 2000. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)* **287**:2494-2497.
- Ha B. H., Y. J. Jeon, S. C. Shin, K. Tatsumi, M. Komatsu, K. Tanaka, C. M. Watson, G. Wallis, C. H. Chung, E. E. Kim. 2011. Structure of Ubiquitin-fold modifier 1 specific protease, UfSP2. *The Journal of biological chemistry* .
- Ha B. H., H. C. Ahn, S. H. Kang, K. Tanaka, C. H. Chung, E. E. Kim. 2008. Structural basis for Ufm1 processing by UfSP1. *The Journal of biological chemistry* **283**:14893-14900.
- Hardie D. G. 2003. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* **144**:5179-5183.
- Harding H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calton, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paules, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden, D. Ron. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell* **11**:619-633.
- Harding H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, D. Ron. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell* **6**:1099-1108.
- Haskins K. A., J. F. Russell, N. Gaddis, H. K. Dressman, A. Aballay. 2008. Unfolded protein response genes regulated by CED-1 are required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Developmental cell* **15**:87-97.
- Hatakeyama S., M. Yada, M. Matsumoto, N. Ishida, K. I. Nakayama. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *The Journal of biological chemistry* **276**:33111-33120.
- Hendershot L., J. Wei, J. Gaut, J. Melnick, S. Aviel, Y. Argon. 1996. Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:5269-5274.
- Henderson S. T., T. E. Johnson. 2001. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current biology : CB* **11**:1975-1980.

- Herrmann J., L. O. Lerman, A. Lerman. 2007. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circulation research* **100**:1276-1291.
- Hershko A., A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* **67**:425-479.
- Ho S. N. 2006. Intracellular water homeostasis and the mammalian cellular osmotic stress response. *Journal of cellular physiology* **206**:9-15.
- Hochstrasser M. 2004. Ubiquitin signalling: what's in a chain? *Nature cell biology* **6**:571-572.
- Hochstrasser M. 1996. Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* **84**:813-815.
- Hoeller D., C. M. Hecker, S. Wagner, V. Rogov, V. Dotsch, I. Dikic. 2007. E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. *Molecular cell* **26**:891-898.
- Hofmann K., P. Bucher. 1998. The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends in biochemical sciences* **23**:204-205.
- Hoppe T. 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends in biochemical sciences* **30**:183-187.
- Huang D. T., A. Paydar, M. Zhuang, M. B. Waddell, J. M. Holton, B. A. Schulman. 2005. Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1. *Molecular cell* **17**:341-350.
- Huang K., S. Sanders, R. Singaraja, P. Orban, T. Cijssouw, P. Arstikaitis, A. Yanai, M. R. Hayden, A. El-Husseini. 2009. Neuronal palmitoyl acyl transferases exhibit distinct substrate specificity. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**:2605-2615.
- Huang L., E. Kinnucan, G. Wang, S. Beaudenon, P. M. Howley, J. M. Huibregtse, N. P. Pavletich. 1999. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science (New York, N.Y.)* **286**:1321-1326.
- Huang X. Y., L. A. Barrios, P. Vonkhorporn, S. Honda, D. G. Albertson, and R. M. Hecht. 1989. Genomic organization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology* **206**:411-424.
- Huen M. S., J. Chen. 2008. The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell research* **18**:8-16.
- Huibregtse J. M., M. Scheffner, S. Beaudenon, P. M. Howley. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:5249.

- Hunter T. 2007. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular cell* **28**:730-738.
- Hurley J. H., S. Lee, G. Prag. 2006. Ubiquitin-binding domains. *The Biochemical journal* **399**:361-372.
- Ishii N., K. Nakahigashi, T. Baba, M. Robert, T. Soga, A. Kanai, T. Hirasawa, M. Naba, K. Hirai, A. Hoque, P. Y. Ho, Y. Kakazu, K. Sugawara, S. Igarashi, S. Harada, T. Masuda, N. Sugiyama, T. Togashi, M. Hasegawa, Y. Takai, K. Yugi, K. Arakawa, N. Iwata, Y. Toya, Y. Nakayama, T. Nishioka, K. Shimizu, H. Mori, M. Tomita. 2007. Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science (New York, N.Y.)* **316**:593-597.
- James P., J. Halladay, E. A. Craig. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**:1425-1436.
- Jentsch S., G. Pyrowolakis. 2000. Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends in cell biology* **10**:335-342.
- Jiang F., R. Basavappa. 1999. Crystal structure of the cyclin-specific ubiquitin-conjugating enzyme from clam, E2-C, at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **38**:6471-6478.
- Jiang H., J. Wu, C. He, W. Yang, H. Li. 2009. Tumor suppressor protein C53 antagonizes checkpoint kinases to promote cyclin-dependent kinase 1 activation. *Cell research* **19**:458-468.
- Jiang H., S. Luo, H. Li. 2005. Cdk5 activator-binding protein C53 regulates apoptosis induced by genotoxic stress via modulating the G2/M DNA damage checkpoint. *The Journal of biological chemistry* **280**:20651-20659.
- Jiang H. Y., S. A. Wek, B. C. McGrath, D. Lu, T. Hai, H. P. Harding, X. Wang, D. Ron, D. R. Cavener, R. C. Wek. 2004. Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Molecular and cellular biology* **24**:1365-1377.
- Joazeiro C. A., A. M. Weissman. 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**:549-552.
- Kaletta T., M. O. Hengartner. 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature reviews. Drug discovery* **5**:387-398.
- Kamath R. S., J. Ahringer. 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods (San Diego, Calif.)* **30**:313-321.
- Kang S. H., G. R. Kim, M. Seong, S. H. Baek, J. H. Seol, O. S. Bang, H. Ova, K. Tatsumi, M. Komatsu, K. Tanaka, C. H. Chung. 2007. Two novel ubiquitin-fold modifier 1 (Ufm1)-specific proteases, UfSP1 and UfSP2. *The Journal of biological chemistry* **282**:5256-5262.

- Karin M., Y. Cao, F. R. Greten, Z. W. Li. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews.Cancer* **2**:301-310.
- Kerscher O., R. Felberbaum, M. Hochstrasser. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**:159-180.
- Kimata Y., D. Oikawa, Y. Shimizu, Y. Ishiwata-Kimata, K. Kohno. 2004. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *The Journal of cell biology* **167**:445-456.
- Kiontke K., W. Sudhaus. 2006. Ecology of *Caenorhabditis* species. *WormBook : the online review of C.elegans biology* :1-14.
- Kipreos E. T. 2005. Ubiquitin-mediated pathways in *C. elegans*. *WormBook : the online review of C.elegans biology* :1-24.
- Koegl M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, and S. Jentsch. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**:635-644.
- Komander D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions* **37**:937-953.
- Komatsu M., T. Chiba, K. Tatsumi, S. Iemura, I. Tanida, N. Okazaki, T. Ueno, E. Kominami, T. Natsume, K. Tanaka. 2004. A novel protein-conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *The EMBO journal* **23**:1977-1986.
- Kramer J. M., R. P. French, E. C. Park, J. J. Johnson. 1990. The *Caenorhabditis elegans* rol-6 gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Molecular and cellular biology* **10**:2081-2089.
- Kwon J., H. J. Cho, S. H. Han, J. G. No, J. Y. Kwon, H. Kim. 2010. A novel LZAP-binding protein, NLBP, inhibits cell invasion. *The Journal of biological chemistry* **285**:12232-12240.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lake M. W., M. M. Wuebbens, K. V. Rajagopalan, H. Schindelin. 2001. Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature* **414**:325-329.
- Lee H. Y., K. D. Johnson, T. Fujiwara, M. E. Boyer, S. I. Kim, E. H. Bresnick. 2009. Controlling hematopoiesis through sumoylation-dependent regulation of a GATA factor. *Molecular cell* **36**:984-995.
- Li L., B. G. Kim, Y. H. Cheong, G. K. Pandey, S. Luan. 2006. A Ca(2)+ signaling pathway regulates a K(+) channel for low-K response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:12625-12630.

- Li M., D. Chen, A. Shiloh, J. Luo, A. Y. Nikolaev, J. Qin, W. Gu. 2002. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* **416**:648-653.
- Li S., C. M. Armstrong, N. Bertin, H. Ge, S. Milstein, M. Boxem, P. O. Vidalain, J. D. Han, A. Chesneau, T. Hao, D. S. Goldberg, N. Li, M. Martinez, J. F. Rual, P. Lamesch, L. Xu, M. Tewari, S. L. Wong, L. V. Zhang, G. F. Berriz, L. Jacotot, P. Vaglio, J. Reboul, T. Hirozane-Kishikawa, Q. Li, H. W. Gabel, A. Elewa, B. Baumgartner, D. J. Rose, H. Yu, S. Bosak, R. Sequerra, A. Fraser, S. E. Mango, W. M. Saxton, S. Strome, S. Van Den Heuvel, F. Piano, J. Vandenhaute, C. Sardet, M. Gerstein, L. Doucette-Stamm, K. C. Gunsalus, J. W. Harper, M. E. Cusick, F. P. Roth, D. E. Hill, M. Vidal. 2004. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)* **303**:540-543.
- Lin D., M. H. Tatham, B. Yu, S. Kim, R. T. Hay, Y. Chen. 2002. Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *The Journal of biological chemistry* **277**:21740-21748.
- Liu G., F. Forouhar, A. Eletsy, H. S. Atreya, J. M. Aramini, R. Xiao, Y. J. Huang, M. Abashidze, J. Seetharaman, J. Liu, B. Rost, T. Acton, G. T. Montelione, J. F. Hunt, T. Szyperski. 2009. NMR and X-RAY structures of human E2-like ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1 (UFC1) reveal structural and functional conservation in the metazoan UFM1-UBA5-UFC1 ubiquitination pathway. *Journal of structural and functional genomics* **10**:127-136.
- Liu G., J. Aramini, H. S. Atreya, A. Eletsy, R. Xiao, T. Acton, L. Ma, G. T. Montelione, T. Szyperski. 2005. GFT NMR based resonance assignment for the 21 kDa human protein UFC1. *Journal of Biomolecular NMR* **32**:261.
- Lu H., Y. Yang, E. M. Allister, N. Wijesekara, M. B. Wheeler. 2008. The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**:1434-1451.
- Ma Y., J. W. Brewer, J. A. Diehl, L. M. Hendershot. 2002. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *Journal of Molecular Biology* **318**:1351-1365.
- Madura K., R. J. Dohmen, A. Varshavsky. 1993. N-recognin/Ubc2 interactions in the N-end rule pathway. *The Journal of biological chemistry* **268**:12046-12054.
- Maeda I., Y. Kohara, M. Yamamoto, A. Sugimoto. 2001. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current biology : CB* **11**:171-176.
- Mayeur G. L., C. S. Fraser, F. Peiretti, K. L. Block, J. W. Hershey. 2003. Characterization of eIF3k: a newly discovered subunit of mammalian translation initiation factor eIF3. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**:4133-4139.
- Mayo L. D., D. B. Donner. 2001. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:11598-11603.

- Melchior F. 2000. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**:591-626.
- Mello C. C., J. M. Kramer, D. Stinchcomb, V. Ambros. 1991. Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *The EMBO journal* **10**:3959-3970.
- Mizushima T., K. Tatsumi, Y. Ozaki, T. Kawakami, A. Suzuki, K. Ogasahara, M. Komatsu, E. Kominami, K. Tanaka, T. Yamane. 2007. Crystal structure of Ufc1, the Ufm1-conjugating enzyme. *Biochemical and biophysical research communications* **362**:1079-1084.
- Mori K. 2009. Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *Journal of Biochemistry* **146**:743-750.
- Mori K., N. Ogawa, T. Kawahara, H. Yanagi, T. Yura. 2000. mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:4660-4665.
- Munro S., H. R. Pelham. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**:291-300.
- Nadanaka S., H. Yoshida, F. Kano, M. Murata, K. Mori. 2004. Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* **15**:2537-2548.
- Nakatsukasa K., J. L. Brodsky. 2008. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **9**:861-870.
- Nam S., K. Min, H. Hwang, H. O. Lee, J. H. Lee, J. Yoon, H. Lee, S. Park, J. Lee. 2009. Control of rapsyn stability by the CUL-3-containing E3 ligase complex. *The Journal of biological chemistry* **284**:8195-8206.
- Nathan J. A., S. Sengupta, S. A. Wood, A. Admon, G. Markson, C. Sanderson, P. J. Lehner. 2008. The ubiquitin E3 ligase MARCH7 is differentially regulated by the deubiquitylating enzymes USP7 and USP9X. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **9**:1130-1145.
- Newman S. F., R. Sultana, M. Perluigi, R. Coccia, J. Cai, W. M. Pierce, J. B. Klein, D. M. Turner, D. A. Butterfield. 2007. An increase in S-glutathionylated proteins in the Alzheimer's disease inferior parietal lobule, a proteomics approach. *Journal of neuroscience research* **85**:1506-1514.
- Neziri D., A. Ilhan, M. Maj, O. Majdic, S. Baumgartner-Parzer, G. Cohen, W. Base, L. Wagner. 2010. Cloning and molecular characterization of Dashurin encoded by C20orf116, a PCI-domain containing protein. *Biochimica et biophysica acta* **1800**:430-438.

- Nicholas W. L., E. C. Dougherty, E. L. Hansen. 2006. Axenic cultivation of *Caenorhabditis briggsae* (Nematoda: Rhabditidae) with chemically undefined supplements; comparative studies with related nematodes* *Annals of the New York Academy of Sciences* **77**:218-236.
- Nixon R. A., S. E. Lewis, C. A. Marotta. 1987. Posttranslational modification of neurofilament proteins by phosphate during axoplasmic transport in retinal ganglion cell neurons. *The Journal of neuroscience : The official journal of the Society for Neuroscience* **7**:1145-1158.
- Nogae I., M. Johnston. 1990. Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene* **96**:161-169.
- Ohmachi M., A. Sugimoto, Y. Iino, M. Yamamoto. 1999. *kel-1*, a novel Kelch-related gene in *Caenorhabditis elegans*, is expressed in pharyngeal gland cells and is required for the feeding process. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **4**:325-337.
- Oikawa D., Y. Kimata, K. Kohno. 2007. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *Journal of cell science* **120**:1681-1688.
- Okada T., H. Yoshida, R. Akazawa, M. Negishi, K. Mori. 2002. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *The Biochemical journal* **366**:585-594.
- Okamura K., Y. Kimata, H. Higashio, A. Tsuru, K. Kohno. 2000. Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and biophysical research communications* **279**:445-450.
- Orlicky S., X. Tang, A. Willems, M. Tyers, F. Sicheri. 2003. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell* **112**:243-256.
- Osaka F., H. Kawasaki, N. Aida, M. Saeki, T. Chiba, S. Kawashima, K. Tanaka, S. Kato. 1998. A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes & development* **12**:2263-2268.
- Palancade B., V. Doye. 2008. Sumoylating and desumoylating enzymes at nuclear pores: underpinning their unexpected duties? *Trends in cell biology* **18**:174-183.
- Perez-Torrado R., D. Yamada, P. A. Defossez. 2006. Born to bind: the BTB protein-protein interaction domain. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **28**:1194-1202.
- Petroski M. D. 2008. The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC biochemistry* **9** **Suppl 1**:S7.
- Pick E., K. Hofmann, M. H. Glickman. 2009. PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. *Molecular cell* **35**:260-264.

- Pickart C. M., M. J. Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1695**:55-72.
- Pickart C. M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* **70**:503-533.
- Pintard L., J. H. Willis, A. Willems, J. L. Johnson, M. Srayko, T. Kurz, S. Glaser, P. E. Mains, M. Tyers, B. Bowerman, M. Peter. 2003. The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* **425**:311-316.
- Pollak N., C. Dolle, M. Ziegler. 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *The Biochemical journal* **402**:205-218.
- Prag S., J. C. Adams. 2003. Molecular phylogeny of the kelch-repeat superfamily reveals an expansion of BTB/kelch proteins in animals. *BMC bioinformatics* **4**:42.
- Ralser M., M. M. Wamelink, A. Kowald, B. Gerisch, G. Heeren, E. A. Struys, E. Klipp, C. Jakobs, M. Breitenbach, H. Lehrach, S. Krobitsch. 2007. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of biology* **6**:10.
- Rasheva V. I., P. M. Domingos. 2009. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death* **14**:996-1007.
- Ravichandran V., T. Seres, T. Moriguchi, J. A. Thomas, R. B. Johnston Jr. 1994. S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by the phagocytosis-associated respiratory burst in blood monocytes. *The Journal of biological chemistry* **269**:25010-25015.
- Ravid T., M. Hochstrasser. 2007. Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nature cell biology* **9**:422-427.
- Reddy S. K., M. Rape, W. A. Margansky, M. W. Kirschner. 2007. Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* **446**:921-925.
- Reed S. I. 2003. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nature reviews.Molecular cell biology* **4**:855-864.
- Robinson P. A., H. C. Ardley. 2004. Ubiquitin-protein ligases. *Journal of cell science* **117**:5191-5194.
- Ross C. A., M. A. Poirier. 2005. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature reviews.Molecular cell biology* **6**:891-898.
- Ross C. A., C. M. Pickart. 2004. The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends in cell biology* **14**:703-711.
- Rotin D., S. Kumar. 2009. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature reviews.Molecular cell biology* **10**:398-409.

- Sasakawa H., E. Sakata, Y. Yamaguchi, M. Komatsu, K. Tatsumi, E. Kominami, K. Tanaka, K. Kato. 2006. Solution structure and dynamics of Ufm1, a ubiquitin-fold modifier 1. *Biochemical and biophysical research communications* **343**:21-26.
- Schaefer H., C. Rongo. 2006. KEL-8 is a substrate receptor for CUL3-dependent ubiquitin ligase that regulates synaptic glutamate receptor turnover. *Molecular biology of the cell* **17**:1250-1260.
- Schagger H., G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**:368-379.
- Schulman B. A., J. W. Harper. 2009. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nature reviews.Molecular cell biology* **10**:319-331.
- Schwartz D. C., M. Hochstrasser. 2003. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends in biochemical sciences* **28**:321-328.
- Sharp F. R., S. M. Massa, R. A. Swanson. 1999. Heat-shock protein protection. *Trends in neurosciences* **22**:97-99.
- Shen J., R. Prywes. 2005. ER stress signaling by regulated proteolysis of ATF6. *Methods (San Diego, Calif.)* **35**:382-389.
- Shen J., E. L. Snapp, J. Lippincott-Schwartz, R. Prywes. 2005. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Molecular and cellular biology* **25**:921-932.
- Shen J., X. Chen, L. Hendershot, R. Prywes. 2002. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental cell* **3**:99-111.
- Shen X., R. E. Ellis, K. Lee, C. Y. Liu, K. Yang, A. Solomon, H. Yoshida, R. Morimoto, D. M. Kurnit, K. Mori, R. J. Kaufman. 2001. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* **107**:893-903.
- Shenton D., C. M. Grant. 2003. Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal* **374**:513-519.
- Shiwaku H., N. Yoshimura, T. Tamura, M. Sone, S. Ogishima, K. Watase, K. Tagawa, H. Okazawa. 2010. Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. *The EMBO journal* **29**:2446-2460.
- Spieth J., T. Blumenthal. 1985. The *Caenorhabditis elegans* vitellogenin gene family includes a gene encoding a distantly related protein. *Molecular and cellular biology* **5**:2495-2501.

- Sriburi R., S. Jackowski, K. Mori, J. W. Brewer. 2004. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **167**:35-41.
- Stegmeier F., M. Rape, V. M. Draviam, G. Nalepa, M. E. Sowa, X. L. Ang, E. R. McDonald 3rd, M. Z. Li, G. J. Hannon, P. K. Sorger, M. W. Kirschner, J. W. Harper, S. J. Elledge. 2007. Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature* **446**:876-881.
- Stevens F. J., Y. Argon. 1999. Protein folding in the ER. *Seminars in cell & developmental biology* **10**:443-454.
- Stogios P. J., G. G. Prive. 2004. The BACK domain in BTB-kelch proteins. *Trends in biochemical sciences* **29**:634-637.
- Strange K. 2003. From genes to integrative physiology: ion channel and transporter biology in *Caenorhabditis elegans*. *Physiological Reviews* **83**:377-415.
- Studier F. W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification* **41**:207-234.
- Szczepanowski R. H., R. Filipek, M. Bochtler. 2005. Crystal structure of a fragment of mouse ubiquitin-activating enzyme. *The Journal of biological chemistry* **280**:22006-22011.
- Tatsumi K., H. Yamamoto-Mukai, R. Shimizu, S. Waguri, Y. S. Sou, A. Sakamoto, C. Taya, H. Shitara, T. Hara, C. H. Chung, K. Tanaka, M. Yamamoto, M. Komatsu. 2011. The Ufm1-activating enzyme Uba5 is indispensable for erythroid differentiation in mice. *Nature communications* **2**:181.
- Tatsumi K., Y. S. Sou, N. Tada, E. Nakamura, S. Iemura, T. Natsume, S. H. Kang, C. H. Chung, M. Kasahara, E. Kominami, M. Yamamoto, K. Tanaka, M. Komatsu. 2010. A novel type of E3 ligase for the Ufm1 conjugation system. *The Journal of biological chemistry* **285**:5417-5427.
- Tsang W. Y., L. Wang, Z. Chen, I. Sanchez, B. D. Dynlacht. 2007. SCAPER, a novel cyclin A-interacting protein that regulates cell cycle progression. *The Journal of cell biology* **178**:621-633.
- Tvermoes B. E., W. A. Boyd, J. H. Freedman. 2010. Molecular characterization of numr-1 and numr-2: genes that increase both resistance to metal-induced stress and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of cell science* **123**:2124-2134.
- Urano F., M. Calfon, T. Yoneda, C. Yun, M. Kiraly, S. G. Clark, D. Ron. 2002. A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *The Journal of cell biology* **158**:639-646.

- Van Criekinge W., R. Beyaert. 1999. Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online* **2**:1-38.
- van Wijk S. J., H. T. Timmers. 2010. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**:981-993.
- Varkey J. P., P. J. Muhlrud, A. N. Minniti, B. Do, S. Ward. 1995. The *Caenorhabditis elegans* spe-26 gene is necessary to form spermatids and encodes a protein similar to the actin-associated proteins kelch and scruin. *Genes & development* **9**:1074-1086.
- Verges E., N. Colomina, E. Gari, C. Gallego, M. Aldea. 2007. Cyclin Cln3 is retained at the ER and released by the J chaperone Ydj1 in late G1 to trigger cell cycle entry. *Molecular cell* **26**:649-662.
- Vijay-Kumar S., C. E. Bugg, K. D. Wilkinson, R. D. Vierstra, P. M. Hatfield, W. J. Cook. 1987. Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *The Journal of biological chemistry* **262**:6396-6399.
- Wang J., H. An, M. W. Mayo, A. S. Baldwin, W. G. Yarbrough. 2007. LZAP, a putative tumor suppressor, selectively inhibits NF-kappaB. *Cancer cell* **12**:239-251.
- Wang J., X. He, Y. Luo, W. G. Yarbrough. 2006. A novel ARF-binding protein (LZAP) alters ARF regulation of HDM2. *The Biochemical journal* **393**:489-501.
- Wang Y., I. Ladunga, A. R. Miller, K. M. Horken, T. Plucinak, D. P. Weeks, C. P. Bailey. 2008. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) and SUMO-conjugating system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **179**:177-192.
- Watson I. R., M. S. Irwin, M. Ohh. 2011. NEDD8 Pathways in Cancer, Sine Quibus Non. *Cancer cell* **19**:168-176.
- Wei N., X. W. Deng. 2003. The COP9 signalosome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **19**:261-286.
- Wilkinson K. D. 1997. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **11**:1245-1256.
- Wood R. D. 1997. Nucleotide excision repair in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **272**:23465-23468.
- Wu J., G. Lei, M. Mei, Y. Tang, H. Li. 2010. A novel C53/LZAP-interacting protein regulates stability of C53/LZAP and DDRGK domain-containing Protein 1 (DDRGK1) and modulates NF-kappaB signaling. *The Journal of biological chemistry* **285**:15126-15136.

- Wu J., R. J. Kaufman. 2006. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation* **13**:374-384.
- Wyndham A. M., R. T. Baker, G. Chelvanayagam. 1999. The Ubp6 family of deubiquitinating enzymes contains a ubiquitin-like domain: SUB. *Protein science : a publication of the Protein Society* **8**:1268-1275.
- Xie Y., A. Varshavsky. 1999. The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. *The EMBO journal* **18**:6832-6844.
- Xu L., Y. Wei, J. Reboul, P. Vaglio, T. H. Shin, M. Vidal, S. J. Elledge, J. W. Harper. 2003. BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* **425**:316-321.
- Yamakura F., H. Kawasaki. 2010. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochimica et biophysica acta* **1804**:318-325.
- Yanase S., K. Yasuda, N. Ishii. 2002. Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (*age-1*, *mev-1* and *daf-16*) that affect life span. *Mechanisms of ageing and development* **123**:1579-1587.
- Yang X. J., E. Seto. 2008. Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Molecular cell* **31**:449-461.
- Yarbrough P. O., R. M. Hecht. 1984. Two isoenzymes of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Caenorhabditis elegans*. Isolation, properties, and immunochemical characterization. *The Journal of biological chemistry* **259**:14711-14720.
- Ye Y., M. Rape. 2009. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nature reviews.Molecular cell biology* **10**:755-764.
- Young P., Q. Deveraux, R. E. Beal, C. M. Pickart, M. Rechsteiner. 1998. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *The Journal of biological chemistry* **273**:5461-5467.
- Yu H., P. L. Larsen. 2001. DAF-16-dependent and independent expression targets of DAF-2 insulin receptor-like pathway in *Caenorhabditis elegans* include FKBP. *Journal of Molecular Biology* **314**:1017-1028.
- Zhao Y. Y., M. Takahashi, J. G. Gu, E. Miyoshi, A. Matsumoto, S. Kitazume, N. Taniguchi. 2008. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer science* **99**:1304-1310.
- Zheng M., X. Gu, D. Zheng, Z. Yang, F. Li, J. Zhao, Y. Xie, C. Ji, Y. Mao. 2008. UBE1DC1, an ubiquitin-activating enzyme, activates two different ubiquitin-like proteins. *Journal of cellular biochemistry* **104**:2324-2334.

- Zheng N., B. A. Schulman, L. Song, J. J. Miller, P. D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D. M. Koepp, S. J. Elledge, M. Pagano, R. C. Conaway, J. W. Conaway, J. W. Harper, N. P. Pavletich. 2002. Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**:703-709.
- Zhuo M. L., Y. Huang, J. Z. Chen, L. H. Sun, R. F. Yang, H. Z. Chen, X. Lv, H. L. Li, Y. S. Wei, G. Liu, R. Zhang, T. M. Ma, H. Cai, R. T. Hui, D. P. Liu, C. C. Liang. 2009. Endothelium-specific overexpression of human IC53 downregulates endothelial nitric oxide synthase activity and elevates systolic blood pressure in mice. *Cardiovascular research* **84**:292-299.

Im Rahmen meiner Promotion war die Betreuungsleistung Studierender ein Kernelement. So wurden von mir die Masterarbeiten von Sareetha Kailayangiri, Clio Gruel, Hannah Vaupel, Jens Daniel und Dirk Stegehake betreut. Die gemeinsam erarbeiteten Ergebnisse dieser Masterarbeiten fließen in die vorliegende Promotion ein.

- (1) **Sareetha Kailayangiri**; Posttranslationale Modifikationen im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans*, **2008**
- (2) **Clio Gruel**; Interaktionsanalysen der Ufm1-Signalkaskade aus *Caenorhabditis elegans*, **2010**
- (3) **Hannah Vaupel**; Die Ufm1-Kaskade in *Caenorhabditis elegans*: Phänotypisierung und Stress-Untersuchungen der *Caenorhabditis elegans* Mutante *uba5(ok3364)::hsp4-GFP* sowie Interaktionsstudien von Ufbp1 und CDK5Rap3, **2011**
- (4) **Jens Daniel**; Die Ufm-1 Kaskade in *C. elegans*: Phänotypisierung, Transkriptom- und Proteomanalysen der Uba-5 Deletionsmutante ok3364, **2011**
- (5) **Dirk Stegehake**; Interaktionsstudien stressabhängiger Proteine in *Caenorhabditis elegans*, **2011**

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Eva Liebau für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas, die engagierte Betreuung meiner Arbeit und die fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Wolf-Michael Weber möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dirk Prüfer bedanke ich mich für die spontane Übernahme der Rolle des Drittgutachters.

Alex und Carsten möchte ich für den enormen Spaß im Büro und auch abseits der Arbeit danken. Dazu kann ich nur sagen: Es hat einfach gepasst und echt laune gemacht.

Ein großer Dank geht an den schrägen Wotti aus Wuppi, der durch seine grandiosen CorelDraw-Kenntnisse mir sehr hilfreich zur Seite stand. Vielen Dank das vergess ich dir nicht. FREAK!

Ich danke zutiefst Sareetha für den glorreichen Start des Projekts und einfach dafür, dass sie da ist. Clio für das verfluchte und schlimme zweite Jahr, welches sie mit mir durchstand. Ich danke der Hammerhai-Rotte bestehend aus Jensi-Bensi (für die schrägen Themen und die Ruhe die in manchen Augenblicken wirklich wichtig war), Dörk a.k.a. TNPOE (*The Nicest Person On Earth*; für die Ausdauer bei Quatsch, die ich bei keinem anderen menschlichen Wesen bisher ausmachen konnte), Hannah-Banana a.k.a. SNPOE (*Second Nicest Person On Earth*; für die fleißige Arbeit und die Möglichkeit ewig Witze über die mysteriöse Hacienda zu machen). Vor allem danke ich Euch vielmals für eure unterstützende Hilfe. Es war mir ein absolutes Vergnügen euch zu betreuen. Natürlich danke ich auch all den „niedereren“ Arbeitskräften (Bachelor & Forschungsmoduler) während der Zeit, die ich verheizen durfte. Es war mir eine Freude.

Für die immer gute und motivierende Stimmung danke ich Sareetha, Wolti, Clio, Dirk, Hannah, Jens, Carsten, Kamila, Alex, Kakrin, Jessi-Bessi, Techno-Maike, Nuschel-Meike, Janina, Sabine, Ba-Mi(ke)-Goreng, Seminar-Borth, Warhammer-Morc, Irene, Sinan und all den weiteren Leuten die mich begleitet haben.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Was soll ich sagen...soviel Geld und Zuversicht in mich hineinzustecken..ohoh..ich weiß ja nicht ob das clever war;). Ohne euch hätte ich es nicht bis hierhin geschafft. Werd das niemals vergessen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus der Literatur entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Patrick Hertel

Münster, im Mai 2011