

**Charakterisierung  
von PIAS-Proteinen als  
E3-ähnliche Faktoren im SUMO-System**

Dissertation der  
Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Diplom-Biologin  
Darja Schmidt

März 2005

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

Darja Schmidt  
München, den 30.03.2005

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von April 2001 bis März 2005 unter Anleitung von Herrn Dr. S. Müller in der Abteilung von Herrn Prof. S. Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

## **Publikationen:**

**Schmidt, D.** and Müller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 2872-2877

**Schmidt, D.** and Müller, S. (2003). PIAS/SUMO: New Partners in Transcriptional Regulation. Cell. Mol. Life Sci., 60, *review*, 2561-2574

Müller, S., Ledl, A. and **Schmidt, D.** (2004). SUMO: A regulator of gene expression and genome integrity. Oncogene 23(11) *review*, 1998-2008

Ledl, A., **Schmidt, D.** and Müller, S. (2005). Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. Oncogene, 24(23), 3810-3818.

Bossis, G., Malnou, C., Farras, R., Andermarcher, E., Hipskind, R., Rodriguez, M., **Schmidt, D.**, Muller, S., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2005). Down-regulation of the c-Fos/c-Jun AP-1 dimer activity by sumoylation. Mol. Cell Biol. im Druck

Mziaut, H., Trajkovski, M., Kersting, S., Altkrüger, A., Lemaitre, R. P., **Schmidt, D.**, Saeger, H.-D., Lee, M.-S., Drechsel, D. N., Müller, S. and Solimena, M. (2005). Synergy of Glucose and Growth Hormone Signaling in Islet  $\beta$ -Cells via ICA512 and STAT5, eingereicht

Promotionsgesuch eingereicht am 30.03.2005

Tag der mündlichen Prüfung: 6.06.2005

## **Gutachter**

**Herr Prof. S. Jentsch**  
**Frau Dr. D. Zink**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
Das Ubiquitin-System	2
Ubiquitin-Domänen-Proteine und Ubiquitin-ähnliche Proteine	3
Das SUMO-System	5
Das SUMO-Konjugationssystem	6
Dekonjugation von SUMO	7
Substrate von SUMO und Funktionen der Sumoylierung	8
PML-Foci	9
PIAS-Proteine	10
Domänen-Struktur von PIAS	10
PIAS-interagierende Proteine als transkriptionelle Koregulatoren	11
Der Tumorsuppressor p53	13
Domänen-Struktur von p53	13
Aktivierung von p53	14
Zielgene von p53	14
Regulation von p53 durch posttranslationale Modifikationen	15
PARP	16
Struktur von PARP-1	16
Poly(ADP-Ribosyl)ierung	17
Die PARP-Familie	18
Die duale Rolle von PARP-1 in der Antwort auf DNA-Schaden	18
Modulation der transkriptionellen Aktivität durch PARP-1	19
PARP-1 in der Apoptose	20
<b>Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
PIAS-Proteine stimulieren die Sumoylierung von p53	22
Spezifität der einzelnen PIAS-Formen bei der Sumoylierung von p53	25
Die Rolle von SP-RING- und SAP-Domäne bei der PIAS-abhängigen Sumoylierung von p53	27
PIAS induziert die Sumoylierung einer zweiten Akzeptorstelle in p53	29
Substratspezifität von PIAS-Proteinen	29
Automodifikation von PIAS	33
Interaktion von PIAS mit p53 und Ubc9	34
Das SUMO/PIAS-System als Inhibitoren der p53-abhängige Transkription	35
PIAS-Proteine als transkriptionelle Koregulatoren	37
Biochemische Identifikation neuer Interaktionspartner von PIAS-Proteinen	39
Ku70 und Ku80 sind SUMO-Substrate <i>in vitro</i>	42
SUMO-Modifikation von PARP-1	43
Identifizierung der Haupt-Sumoylierungsstellen von PARP-1	45
Einfluss der Sumoylierung von PARP-1 auf die DNA-Bindung und die	



## Inhaltsverzeichnis

Interaktion von PIAS sowie XRCC-1	49
Die Sumoylierung schützt PARP-1 nicht vor seiner Spaltung durch Caspasen	52
Interferenz der Autoribosylierung und Sumoylierung von PARP-1	53
<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
PIAS-Proteine als E3-Ligasen im SUMO-System	54
Topors als potenzielle E3-Ligase	56
Die Rolle des SUMO/PIAS-Systems im Signalweg von p53	57
SUMO/PIAS in der transkriptionellen Regulation	58
SUMO/PIAS als Regulatoren von PARP-1 und Ku70/Ku80	61
<b>Material und Methoden</b>	<b>63</b>
Mikrobiologische Techniken	63
Molekularbiologische Techniken	65
Zellkulturtechniken	67
Proteinbiochemische Techniken	68
<b>Referenzen</b>	<b>74</b>
<b>Peptidabdeckungen</b>	<b>84</b>

## Charakterisierung von PIAS-Proteinen als E3-ähnliche Faktoren im SUMO-System

Die posttranslationale Modifikation mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO (small Ubiquitin-like modifier) wurde in den letzten Jahren für zahlreiche zelluläre Schlüsselfaktoren, die u. a. in Vorgänge wie Transkription und DNA-Reparatur involviert sind, gezeigt. Die Modifikation mit SUMO, Sumoylierung, verläuft in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess, bei dem analog zum Ubiquitin-System ein aktivierendes (E1) und ein konjugierendes (E2) Enzym beteiligt sind. Ob im SUMO-System wie im Ubiquitin-System E3-ähnliche Faktoren (Ligasen) existieren, die die Modifikation stimulieren und die Substratelektion vermitteln, war bislang unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche E3-ähnliche Faktoren zu identifizieren und zu charakterisieren.

PIAS-Proteine wurden ursprünglich als Inhibitoren von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie beschrieben. Basierend auf neuen Ergebnissen, die zeigten, dass Siz-Proteine, die Orthologen von PIAS in der Hefe *S. cerevisiae*, die Sumoylierung stimulieren, wurden PIAS-Proteine hier als Kandidaten für SUMO-E3-Ligasen im Säugersystem untersucht. Ein potenzielles Zielprotein der PIAS-abhängigen Sumoylierung war p53. Wir konnten zeigen, dass alle vier Mitglieder der PIAS-Familie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen drastischen stimulierenden Effekt auf die SUMO-Modifikation von p53 ausüben und somit als SUMO-Ligasen fungieren. Die Ligaseaktivität beruht auf einer intakten sogenannten SP-RING-Domäne, die Verwandtschaft zur klassischen RING-Domäne einer Klasse von Ubiquitin-Ligasen aufweist. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Bindung beider Typen von Ligasen an ihre jeweiligen Substrate und das E2-Enzym. Ferner unterliegt PIAS ebenso wie Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs einer Automodifikation. Neben diesen Analogien weisen PIAS-Ligasen als wichtigen Unterschied zu Ubiquitin-Ligasen jedoch eine wesentlich geringere Substratspezifität auf.

Ein zentraler Aspekt der Arbeit war die Untersuchung der Effekte des SUMO/PIAS-Systems auf die Funktion des Tumorsuppressors p53. In Reporterexperimenten zeigten PIAS-Proteine eine Repression p53-abhängiger Transkription. Hierfür ist eine intakte SP-RING-Domäne und somit die Ligaseaktivität von PIAS essentiell, was für eine inhibitorische Rolle des SUMO-Systems im p53-Signalweg spricht. In Übereinstimmung hiermit führt die lineare Fusion von SUMO an p53 zu einer Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von p53. Weiterhin weisen PIAS-Proteine *per se* reprimierende Effekte auf die Transkriptionsaktivität auf. Zusammengefasst zeigen diese Daten ein kooperatives Zusammenspiel von SUMO und PIAS als wichtige Faktoren in der transkriptionellen Repression von p53 und belegen damit die zentrale Rolle des SUMO-Systems bei der Inhibierung von Transkriptionsfaktoren.

Im Zuge der weiteren Charakterisierung von PIAS-Proteinen konnten die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase PARP-1 sowie Ku70 und Ku80 als neue Bindungspartner von PIAS und als SUMO-Substrate identifiziert werden. PARP-1 und Ku70 sind wichtige Komponenten von DNA-Reparatur-Prozessen, wie der Basenaustauschreparatur und der nicht-homologen Endverknüpfung. Damit könnte der PIAS-vermittelten Sumoylierung in höheren Eukaryonten neben negativ-regulatorischen Funktionen in der Transkription auch eine Kontrollfunktion in spezifischen DNA-Reparaturprozessen zukommen.

## Das Ubiquitin-System

Ubiquitin- und Ubiquitin-ähnliche Modifikationssysteme sind verwandte Signalwege, bei denen posttranslational ein spezifisches Modifikationsprotein kovalent an ein Zielprotein konjugiert wird. Hierbei entsteht in der Regel eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus des jeweiligen Modifikationsproteins und einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrests im Zielprotein. Die Verknüpfung erfolgt in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess, der hier exemplarisch anhand des am besten untersuchten Ubiquitin-Systems beschrieben wird:

Das Modifikationsprotein Ubiquitin, ein in allen Eukaryonten hochkonserviertes Protein, wird als Vorläuferprotein synthetisiert und durch C-terminale Spaltung in seine funktionelle Form von 79 Aminosäuren überführt. Die Prozessierung generiert ein zur Konjugation essentielles Doppelglyzin-Motiv am C-Terminus.

Im folgenden wird Ubiquitin über das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 aktiviert, wobei in einem ATP-abhängigen Schritt ein Ubiquitinadenylat gebildet wird. Dieses wird unter Freisetzung eines AMP auf die Thiolgruppe des konservierten Cysteinrests im aktiven Zentrum des E1-Enzyms unter Ausbildung einer energiereichen Thioesterbindung übertragen. Das aktivierte Ubiquitin wird vom E1-Enzym auf Ubiquitin-E2-Konjugationsenzyme (Ubc's) durch Transesterifizierung übertragen (Hershko, 1983). E2-Enzyme bilden eine hochkonservierte Proteinfamilie und enthalten als charakteristische Domäne eine Ubiquitin-Konjugationsdomäne (Ubc-Domäne). Das aktive Zentrum dieser Domäne, ebenfalls ein Cystein, ist der Akzeptor für Ubiquitin. E2-Enzyme übertragen direkt oder mit Hilfe sogenannter E3 Ubiquitin-Ligasen, die als Spezifitätsfaktoren fungieren, Ubiquitin auf das Substrat (Hochstrasser, 1996; Matuschewski et al., 1996). E3-Ligasen werden in zwei große Klassen, sogenannte RING- und HECT-Ligasen eingeteilt:

E3-Ligasen des RING-Typs fungieren als Adaptermoleküle, die Ubc und Substrat in räumliche Nähe bringen. Diese Klasse von Ligasen, (Joazeiro and Weissman, 2000) zeichnet sich durch eine sogenannte RING-Domäne aus, die meist als E2-Rekrutierungsdomäne agiert und für die Ligaseaktivität essentiell ist. Der RING-Finger ist ein Zink-bindendes Motiv von 40-60 Aminosäuren, das acht konservierte Cysteine/Histidine besitzt, die in zwei Varianten auftreten, einem C3HC4-Typ und einem C3H2C3-Typ. Bei RING-Typ Ligasen unterscheidet man zwei Untergruppen: Die Mitglieder der Subklasse von monomeren RING-Ligasen, zu denen u. a. c-cbl und Mdm2 zählen, besitzen Bindungsstellen sowohl für das Ubc als auch für das Substrat. Daneben existiert die Subklasse der oligomeren RING-Ligasen, in die z. B. der SCF-Komplex fällt, bei denen die RING-Finger-Komponente (Roc/Rbx) für die Bindung des Ubc's verantwortlich ist und zusätzliche, assoziierte Faktoren das Substrat rekrutieren. Der SCF-Komplex beispielsweise enthält neben Roc die Strukturkomponenten Cullin CUL1 und das Protein SKP1, sowie einen in die Substratselektion involvierten Faktor der F-Box-Familie. (Deshaies, 1999). Substrate für den SCF-Komplex sind Cycline, CDK-Inhibitoren,  $\beta$ -Katenin und I $\kappa$ B $\alpha$ .

Die zweite große Klasse von Ligasen, E3-Ligasen des HECT-Typs, katalysieren die Ubiquitinierung durch die Bildung eines Thioester-Intermediates zwischen Ubiquitin und einem konservierten Cystein innerhalb der HECT-Domäne (Scheffner et al., 1995). Weitere Konjugationsfaktoren im Ubiquitinsignalweg können sogenannte E4's sein, die

an bereits konjugierte Ubiquitin-Einheiten binden und die Bildung von Multi-Ubiquitin-Ketten katalysieren (Koegl et al., 1999).

Die Arbeiten der vergangenen Jahre im Ubiquitin-Feld zeigten die hohe Komplexität des Ubiquitin-Systems, sowohl bezüglich des Konjugationsmechanismus als auch der funktionellen Konsequenz der Ubiquitinierung.

Im klassischen und am besten verstandenen Ubiquitin-Proteasom-Signalweg werden Substrate mit polymeren, verzweigten Ubiquitinketten, die über Ubiquitin-Ubiquitin-Isopeptidbindungen an das Lysin K48 im Ubiquitin geknüpft werden, modifiziert und damit für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert (Pickart, 1997; Weissman, 2001). Bei dem 26S-Proteasom handelt es sich um einen multikatalytischen Proteasekomplex im Cytosol und im Nukleus eukaryontischer Zellen (Enenkel et al., 1999). Substrate werden hier durch eine ATP-verbrauchende Reaktion zu kurzen Peptiden abgebaut. Neben dieser klassischen Funktion von Ubiquitin als Degradierungssignal ist inzwischen eine Vielzahl weiterer, nicht-proteolytischer Funktionen der Ubiquitinierung bekannt. Diese werden meist über Monoubiquitinierung oder alternativ verknüpfte Ubiquitin-Ketten vermittelt.

So hat die Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin-Ketten, die über das Lysin K63 verknüpft sind, eine wichtige Funktion in Signaltransduktionswegen, wie dem NF $\kappa$ B-Weg, und der DNA-Reparatur. Ketten an K63 werden beispielsweise nach DNA-Schaden an PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) gefunden (Hoegel et al., 2002; Ulrich, 2004) und sind für den fehlerfreien Zweig der postreplikativen DNA Reparatur essentiell. Das Ubc in diesem in DNA-Replikation und -Reparatur involvierten Signalweg ist Rad6 (Jentsch et al., 1987), die zugehörige Ligase Rad18p (Bailly et al., 1997).

Monoubiquitinierung von PCNA spielt dagegen eine Rolle im fehler-behafteten Zweig der postreplikativen DNA-Reparatur. Daneben hat die Monoubiquitinierung beispielsweise auch eine zentrale Bedeutung in der Endozytose. Die Modifikation mit Ubiquitin ist für die Internalisierung einiger Membranproteine nötig (Hicke, 1999). Die Ubiquitinierung scheint sowohl bei der Internalisierung von Membranproteinen in primäre endozytotische Vesikel (Hicke, 2001) als auch bei der Sortierung von Vesikeln (Losko et al., 2001) eine Rolle zu spielen.

Weitere Substrate für Monoubiquitinierung sind die Histone und einige andere nukleäre, chromatinassoziierte Proteine (Busch and Goldknopf, 1981; West et al., 1985). Die Ubiquitinierung von H2B in *S. cerevisiae* wird durch das Ubc RAD6 (Ubc2) vermittelt (Jentsch et al., 1987; Robzyk et al., 2000); sie reguliert hier die Methylierung von Histon H3 und moduliert damit transkriptionelle Prozesse (Sun and Allis, 2002).

## **Ubiquitin-Domänen-Proteine und Ubiquitin-ähnliche Proteine**

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Proteine identifiziert, die Sequenzähnlichkeit bzw. strukturelle Verwandtschaft mit Ubiquitin besitzen. Diese werden unterteilt in Proteine, die Ubiquitin-ähnliche Domänen besitzen, jedoch nicht als Modifikationsproteine dienen (UDP, Ubiquitin-domain proteins), und Proteine, die als Modifikationsproteine fungieren (UBL, Ubiquitin-like modifier) (Jentsch and Pyrowolakis, 2000).

UDP's stellen eine heterologe Gruppe von Proteinen dar, von denen einige wichtige Funktionen im Ubiquitin-Proteasom-System erfüllen. RAD23 und BAG-1 assoziieren mit

dem 26S-Proteasom, wofür ihre Ubiquitin-ähnliche Domäne notwendig ist. Es scheint ein Zusammenspiel zwischen der Funktion von UDP's, Proteasomen und Chaperonen zu existieren: drei UDP's (PLIC2/Chap1, BAG-1 und BAT3/Chap2) haben Affinität zu Chaperonen der Hsp70-Familie (Kaye et al., 2000; Luders et al., 2000). BAG-1 übt antiapoptotische Funktionen aus, interagiert mit Bcl2, der Raf-Kinase und Steroidhormonrezeptoren und fungiert als Kofaktor für Hsc/Hsp70, indem es das Chaperon an das Proteasom rekrutiert. BAG-1 könnte also die Proteinfaltung mit proteolytischen Aktivitäten koppeln (Luders et al., 2000). Unter den UDP's finden sich auch Proteine, die im Ubiquitinweg eine Rolle spielen: UBP6 ist eine Ubiquitin-spezifische Protease (Wyndham et al., 1999), während Elongin B eine Untereinheit der CBC-Ubiquitin-Ligase ist.

HUB-1 aus *S. cerevisiae* wurde zunächst als UBL-Modifikationsprotein beschrieben (Dittmar et al., 2002). HUB1 weist jedoch im Gegensatz zu anderen UBL's kein C-terminales Doppelglyzin, sondern ein Doppelyrosin auf. Außerdem zeigt die strukturelle Analyse des humanen Orthologs UBL5, dass das Doppelyrosinmotiv nicht wie das Doppelglyzin-Motiv der anderen UBL's exponiert ist (McNally et al., 2003). In Übereinstimmung hiermit zeigen neuere Untersuchungen, dass HUB1 mit zellulären Proteinen ATP-unabhängig SDS-resistente Komplexe bildet und vermutlich nicht kovalent Substrate modifiziert (Luders et al., 2003), sondern Proteinfunktionen eher durch nichtkovalente Bindung moduliert. Somit muss HUB1 eher zur Klasse der UDP's gezählt werden.

Ubiquitin-ähnliche Modifikationsproteine der UBL-Familie zeigen unterschiedliche Sequenzhomologien zu Ubiquitin. Die größte Ähnlichkeit weisen die Interferon-induzierten Modifikationsproteine ISG15 und FAT10 auf. ISG15 wird nach viraler oder bakterieller Infektion durch Interferon- $\alpha$  und - $\beta$  induziert (Der et al., 1998; Farrell et al., 1979). Als E1 dient in diesem Konjugationssystem UBE1L (Yuan and Krug, 2001), als E2 wird Ubc8 verwendet (Kim et al., 2004a). Diese beiden Proteine werden ebenso wie die Protease UBP43, die ISG15 abspaltet, durch Interferon induziert (Malakhov et al., 2002). FAT10 ist im MHC-Komplex kodiert und wird durch Interferon- $\gamma$  sowie TNF $\alpha$  induziert. Es besteht aus zwei Tandem-artigen Ubiquitin-ähnlichen Domänen und wirkt als Agonist in der Caspase-abhängigen Apoptose.

RUB, Nedd8, hat ca. 50% Sequenzidentität zu Ubiquitin. Die Hauptsubstrate von RUB sind Mitglieder der Familie der Culline, den Strukturkomponenten von multimeren E3-Ligasen des RING-Typs. Für die Konjugation werden das heterodimere E1 ULA1/UBA3 sowie das E2 Ubc12 benötigt (Hori et al., 1999; Lammer et al., 1998; Liakopoulos et al., 1999; Liakopoulos et al., 1998; Osaka et al., 1998). Vor kurzem konnte eine Modifikation mit Nedd8 auch für p53 gezeigt werden (Harper, 2004; Xirodimas et al., 2004).

APG12 und URM1 repräsentieren UBL's, die lediglich strukturelle Homologie, aber keinerlei Sequenzhomologie zu Ubiquitin aufweisen.

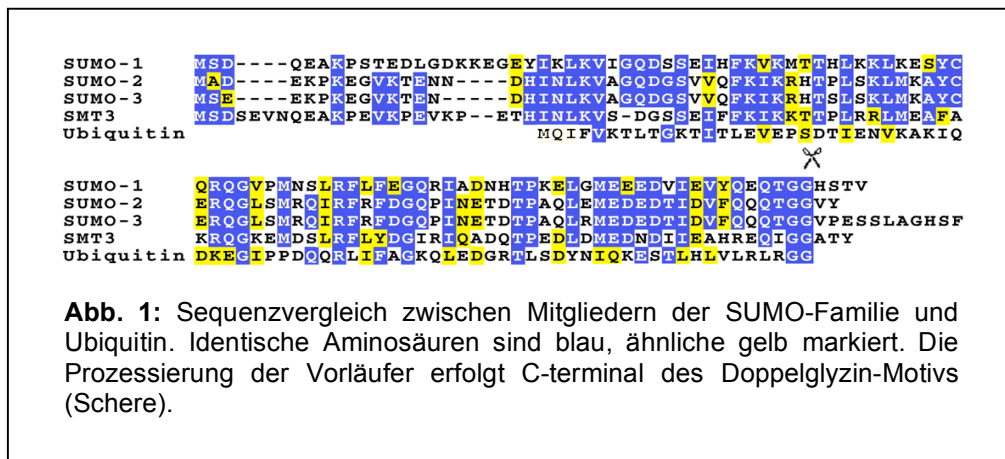
APG12 ist von der Hefe bis zum Säuger konserviert und spielt eine Rolle in der Autophagie, bei der Teile des Cytoplasmas in Vesikeln, den Autophagosomen, eingeschlossen und in die Lysosomen transportiert werden. Das Substrat von APG12 ist APG5, welches ebenfalls für die Autophagie benötigt wird (Klionsky and Ohsumi, 1999). Als E1 fungiert APG7, als E2 APG10. APG7 zeigt Sequenzhomologie mit dem E1 des Ubiquitin-Systems, während APG10 sich von Ubc's unterscheidet. Modifiziertes APG5 bindet präferentiell an APG16 und induziert dadurch eine Oligomerisierung des Konjugatkomplexes (Klionsky and Ohsumi, 1999). Dieser Komplex bindet an

Membranen. APG8 zählt auch zu den UBL's, interessanterweise ist sein Substrat jedoch kein Protein, sondern das Membranlipid Phosphatidylethanolamin (PE).

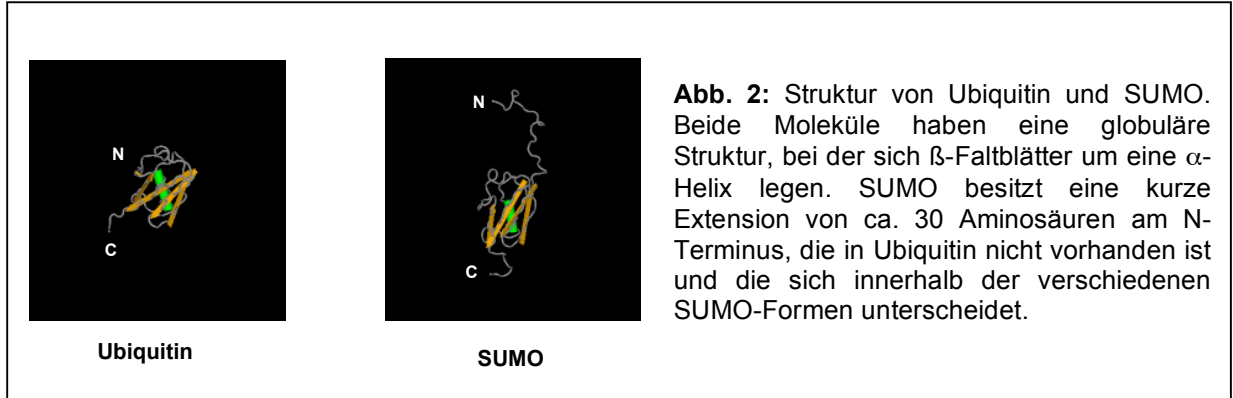
Urm1p in *S. cerevisiae* besitzt mehrere Substrate und spielt vermutlich eine Rolle in der Knospung sowie im invasiven Wachstum der Hefe (Goehring et al., 2003).

## Das SUMO-System

Das Modifikationsprotein SUMO (small ubiquitin-like modifier, auch smt3, Sentrin, GMP1 oder PIC1) wurde ursprünglich als Smt3 von *S. cerevisiae* in einem Screen als „high copy suppressor“ von Mutationen im centromeren Protein MIF2 identifiziert (Melchior, 2000; Muller et al., 2001; Seeler and Dejean, 2003). Später wurde Smt3/SUMO in allen bislang untersuchten Eukaryonten gefunden. *S. cerevisiae* besitzt ein SUMO-Gen, während in Säugern mindestens drei SUMO-Formen, SUMO-1, -2 und -3 auftreten. SUMO-1 zeigt 50% Sequenzidentität zu SUMO-2 und -3, die untereinander fast identisch sind.



SUMO-1 besteht aus 101 Aminosäuren und zeigt 18% Sequenzidentität zu Ubiquitin. Darüber hinaus besitzen beide Moleküle eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur, wobei SUMO eine N-terminale Extension von ca. 30 Aminosäuren besitzt, deren Funktion unklar ist, die sich jedoch innerhalb der drei SUMO-Formen unterscheidet (Bayer et al., 1998). Eine Deletion dieser Extension führt in Hefe nur zu einer minimalen Beeinträchtigung der Funktion von SUMO (Bylebyl et al., 2003). In SUMO-2 und -3 finden sich innerhalb der N-terminalen Extensionen SUMO-Konjugationsstellen, sog.  $\psi$ KxE-Motive (s. u.), die eine Bildung von Poly-SUMO-Ketten ermöglichen (Tatham et al., 2001). Die SUMO-Kettenbildung an Lysin K11 von SUMO-2 scheint in die Prozessierung amyloider Proteine involviert zu sein (Li et al., 2003).



### Das SUMO-Konjugationssystem

Wie bei der Ubiquitinierung führt die Modifikation von Substraten mit SUMO zur Entstehung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO und einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des jeweiligen Zielproteins. Sumoylierung erfolgt in mehreren Schritten, die denen des Ubiquitin-Systems mechanistisch analog sind; beide Systeme benötigen jedoch unterschiedliche Enzyme. SUMO wird als Vorläuferprotein synthetisiert, das C-terminal von einer Klasse von Cystein-Proteasen, den SUMO-Proteasen (SENPs, SUSPs) prozessiert werden muss, um konjugiert werden zu können. Auch hier resultiert aus der Spaltung die aktive Form mit einem exponierten C-terminalen Doppelglyzin-Motiv. Diese beiden Aminosäuren sind essentiell für die Bildung der Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von SUMO und der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrests im Zielprotein. Anders als beim Ubiquitin-System befindet sich das als Anheftungsstelle für SUMO dienende Lysin in den meisten Fällen innerhalb einer sogenannten Konsensus-Sequenz, die durch ein  $\psi$ KxE-Motiv (mit  $\psi$  als großer, hydrophober Aminosäure, wie Isoleucin, Leucin oder Valin) charakterisiert wird. Diese Konsensussequenz fungiert in mehr als 90% der bislang bekannten SUMO-Substrate als Sumoylierungsstelle.

Für die Konjugation wird das ATP-abhängige dimere SUMO-aktivierende Enzym E1 (AOS1/UBA2) und das E2-Konjugations-Enzym Ubc9 benötigt (Desterro et al., 1997; Gong et al., 1999; Johnson and Blobel, 1997; Schwarz et al., 1998). Die beiden Untereinheiten AOS1 bzw. UBA2 des E1-Enzyms zeigen Sequenzhomologie zum N- bzw. C-Terminus des E1-Enzyms der Ubiquitinierung, UBA1. In der Untereinheit UBA2 befindet sich das aktive Cystein, das für die Bildung eines SUMO-E1-Thioesters essentiell ist; es werden jedoch beide Untereinheiten für die Aktivierung von SUMO benötigt. Ubc9 weist Sequenzhomologie zu den Ubiquitin-Ubc's auf (Johnson and Blobel, 1997; Schwarz et al., 1998). Die SUMO-bindende Oberfläche von Ubc9 ist positiv geladen und bezüglich seines elektrostatischen Potentials und seiner Hydrophobizität komplementär zur negativ geladenen Oberfläche des SUMO-Moleküls. Diese Eigenschaften sollten die Spezifität für SUMO gewährleisten.

Ob bei der Konjugation von SUMO wie im Ubiquitin-System E3-Ligasen beteiligt sind, war lange Zeit umstritten. Ein Hauptargument gegen die Beteiligung von E3-Faktoren waren *in vitro*-Experimente, in denen rekombinantes E1 und Ubc9 für eine Sumoylierung von Substraten ausreichend sind. Übereinstimmend hiermit konnte gezeigt werden, dass Ubc9 in den meisten Fällen direkt an SUMO-Zielproteine bindet und somit die

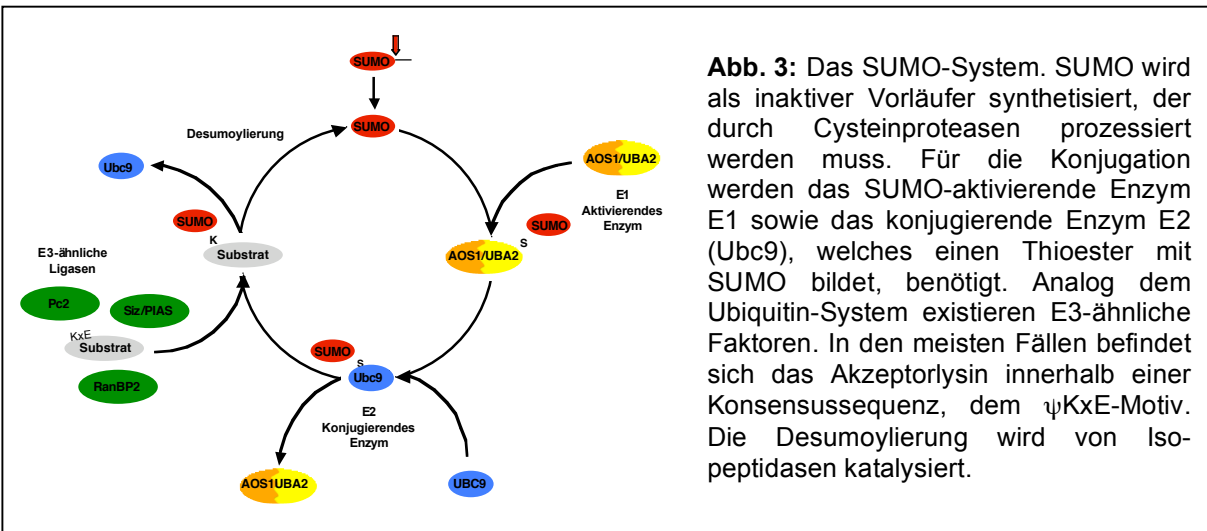
Aufgabe von Ubiquitin-E3's, nämlich die Selektion der Substrate, übernehmen könnte. Als Bindungsmotiv für Ubc9 fungiert meist die  $\psi$ KxE Sumoylierungskonsensussequenz. Diese Beobachtung unterstützte die Annahme, dass E3-Enzyme an der Sumoylierung nicht beteiligt sind.

Diese Sichtweise musste jedoch revidiert werden, nachdem in der Hefe *S. cerevisiae* Siz1 und -2 als E3-ähnliche Faktoren identifiziert wurden, die die Sumoylierung der Septine induzieren (Johnson and Gupta, 2001). Beide Proteine besitzen eine Domäne, die der RING-Domäne der Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs ähnelt. U. a. in der vorliegenden Arbeit wurden PIAS-Proteine, die Homologen von Siz-Proteinen in Säugern, als E3-ähnliche SUMO-Ligasen des Säugersystems identifiziert (Kahyo et al., 2001) (Schmidt and Muller, 2002) (Kotaja et al., 2002b; Sachdev et al., 2001).

Außerdem wurden das Nukleoporin RanBP2 und das Polycomb-Protein hPc2, die beide weder Ähnlichkeit mit PIAS noch mit Ubiquitin-Ligasen aufweisen, als E3-ähnliche Faktoren gefunden (Kagey et al., 2003; Pichler et al., 2002).

Bisher identifizierte Substrate für RanBP2 sind *in vitro* Sp100, eine Komponente der PML-Foci, die Ubiquitin-Ligase Mdm2 und die Histondeazetylase HDAC4 (Kirsh et al., 2002; Miyauchi et al., 2002). Für die Ligaseaktivität wird eine sogenannte „internal repeat“-Domäne benötigt, in der sich eine Sequenz von ca. 50 Aminosäuren wiederholt. RanBP2 selbst ist ebenfalls ein SUMO-Substrat.

Pc2 ist ein Protein der Polycomb-Gruppe, das sich in multimeren Komplexen mit Histonmethylierungsaktivität befindet und an der transkriptionellen Repression beteiligt ist. Bisher wurden CtBP1 und CtBP2 als Substrate für hPc2 beschrieben (Kagey et al., 2003). Diese beiden transkriptionellen Korepressoren assoziieren über hPc2 mit PcG-Komplexen.



### Dekonjugation

Sumoylierung ist ein reversibler Prozess. Die Desumoylierung erfolgt durch Cysteine-Proteasen der Ulp-Familie, die auch die Prozessierung der Vorläuferproteine ausführen. Alle bekannten SUMO-spaltenden Enzyme der Ulp-Familie enthalten eine C-terminale Domäne von ca. 200 AS, die für die Spaltungsaktivität verantwortlich ist (Mossessova and Lima, 2000). Die verschiedenen Ulp's haben variierende N-Termini, die



möglicherweise regulatorische Funktionen erfüllen und die Enzyme in verschiedene Zellkompartimente dirigieren (Hang and Dasso, 2002; Panse et al., 2003; Zhang et al., 2002a). In *S. cerevisiae* wurden zwei desumoylierende Enzyme mit verschiedenen Funktionen beschrieben: Ulp1 lokalisiert am Kernporenkomplex und scheint sowohl die Prozessierung des SUMO-Vorläufermoleküls als auch die Desumoylierung von SUMO-Konjugaten zu katalysieren. Ulp2 /Smt4 lokalisiert im Nukleus und scheint andere Konjugate zu spalten als Ulp1 (Panse et al., 2003; Takahashi et al., 2000) (Li and Hochstrasser, 1999; Li and Hochstrasser, 2000; Schwienhorst et al., 2000). *ulp1*-Deletionsmutanten der Hefe sind nicht lebensfähig, *ulp2*-Deletionsmutanten sind stresssensitiv und zeigen Defekte in der Aufrechterhaltung des Genoms. Ulp1 und Ulp2 können sich nicht gegenseitig komplementieren.

In Säugern wurden basierend auf Sequenzhomologien acht Proteine der Ulp-Familie zugeordnet. Diese Familie wird auch als SENP-Familie bezeichnet. Eine SUMO-Prozessierungs- bzw. SUMO-Isopeptidase-Aktivität wurde jedoch experimentell nur für vier Mitglieder, SENP1, SENP2, SENP3 und SENP6 gezeigt. Ein Mitglied der Familie zeigt Aktivität gegen Nedd8 und nicht SUMO (Gan-Erdene et al., 2003; Mendoza et al., 2003; Yeh et al., 2000). Die bislang charakterisierten SENP's lokalisieren an verschiedenen Orten in der Zelle, wodurch vermutlich teilweise ihre Substratselektivität bestimmt wird. SENP3 lokalisiert im Nukleolus (Nishida et al., 2000), SENP6 vorwiegend im Zytoplasma (Nishida et al., 2000), SENP1 in subnukleären Foci und SENP2 an der Kernhülle (Bailey and O'Hare, 2002). SENP2 besitzt drei verschiedene Isoformen, die aus alternativen Spleißvarianten entstehen (Best et al., 2002; Kadoya et al., 2002; Nishida et al., 2001).

### **Substrate von SUMO und Funktionen der Sumoylierung**

Obwohl eine wachsende Anzahl an SUMO-Substraten beschrieben wird, ist die funktionelle Konsequenz der Modifikation in den meisten Fällen relativ unklar.

Anders als Ubiquitinierung führt die Modifikation mit SUMO jedoch nicht zum Abbau des Zielproteins. Im Gegenteil wurde Sumoylierung in manchen Fällen sogar für die Stabilität von Proteinen, zum Beispiel des NF $\kappa$ B-Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  gezeigt (Desterro et al., 1998). Hier findet die Sumoylierung am selben Lysin wie die Ubiquitinierung statt, so dass sie die Ubiquitinierung und den folgenden Abbau verhindert. Ein ähnliches Szenario wurde für PCNA (proliferating cell nuclear antigen) beschrieben, welches ebenfalls am selben Lysin sowohl sumoyliert als auch ubiquitiniert wird (Hoegge et al., 2002). Die Ubiquitinierung führt in diesem Fall jedoch nicht zum Proteinabbau, sondern ist in die Reparatur von DNA involviert. Diese Fälle scheinen jedoch eher Besonderheiten zu sein und spiegeln wohl keinen allgemeingültigen Mechanismus wieder.

Eine mehr generelle Funktion der Sumoylierung scheint die Assemblierung oder Stabilisierung von Protein-Protein-Komplexen zu sein, die in manchen Fällen mit einer Änderung der subnukleären Kompartimentierung und Lokalisation einhergeht. Die derzeit bekannten Zielproteine von SUMO agieren in den unterschiedlichsten zellulären Signalwegen. Es wurden bislang ca. 100 SUMO-Zielproteine in Säugern identifiziert, deren Funktionen derzeit mindestens drei mögliche Schwerpunkte der Konsequenzen einer Modifikation mit SUMO erkennen lassen:

Eine Beteiligung von SUMO am Kernporenkomplex bei der Regulation von nukleo-cytoplasmatischen Transportprozessen wird unterstützt von der Beobachtung, dass der nukleäre Importfaktor RanGap1, das erste gefundene SUMO-Substrat, sowie die E3-Ligase RanBP2 an der Kernpore lokalisiert sind. RanGAP1 bindet als Folge seiner

Sumoylierung an RanBP2 und wird so aus dem Cytosol an den nukleären Porenkomplex rekrutiert (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1998). In einigen Fällen, wie für NEMO und Mek-1, scheint Sumoylierung in der Tat die Verteilung zwischen Kern und Zytoplasma zu kontrollieren. Die SUMO-Modifikation von NEMO, der regulatorischen Untereinheit des cytoplasmatischen I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK) nach genotoxischem Stress führt zur nukleären Lokalisation von nicht an IKK gebundenem NEMO (Huang et al., 2003).

Eine weitere Subgruppe von SUMO-Substraten ist in die DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur involviert, wie z. B. PCNA, Rad52, die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG), die Topoisomerasen I und II und das Bloom- sowie das Werners-Syndrom-Protein (Wrn), zwei RecQ-Helikasen. Die Sumoylierung von Topoisomerase I dirigiert das Protein aus dem Nukleolus ins Nukleoplasma (Mo et al., 2002). Die Sumoylierung von Wrn wird durch den Tumorsuppressor p14Arf stimuliert und scheint ebenfalls die Verteilung von Wrn zwischen Nukleolus und Nukleoplasma zu regulieren (Woods et al., 2004).

Eine Rolle von SUMO bei transkriptionellen Prozessen lässt sich aus der Beobachtung ableiten, dass eine große Untergruppe von SUMO-Substraten Transkriptionsfaktoren und transkriptionelle Koregulatoren repräsentieren. Die Gruppe der Transkriptionsfaktoren enthält die Protoonkogene c-Myb (Bies et al., 2002), c-Jun (Muller et al., 2000) und TEL (Chakrabarti et al., 2000) sowie die Tumorsuppressoren p53 und sein Homolog p73 (Gostissa et al., 1999; Minty et al., 2000; Muller et al., 2000; Rodriguez et al., 1999), die Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren HSF1 und HSF2 (Goodson et al., 2001; Hong et al., 2001), Mitglieder der Superfamilie der Steroidhormon-Rezeptoren, wie der Androgen- oder der Glukokortikoid-Rezeptor (Poukka et al., 2000), ferner den Wnt-responsiven Transkriptionsfaktor LEF-1 (Sachdev et al., 2001), Sp3, Elk-1, SMAD's sowie Mitglieder der STAT-Familie. Als transkriptionelle Koregulatoren sind PML, CtBP, Sp100, Daxx und HDAC's anzuführen. Obwohl die Modifikation mit SUMO bei einer Vielzahl dieser transkriptionellen Regulatoren repressive Effekte verursacht, wurde in einigen Fällen auch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beschrieben.

### **PML-Foci**

SUMO-modifizierte Transkriptionsfaktoren sind oft in distinkten, subnukleären, punktförmigen Strukturen, den PML-Foci (PML nuclear bodies, auch ND10 oder POD's) zu finden. PML-Foci scheinen in zahlreiche zelluläre Vorgänge wie Transkriptionskontrolle, Regulation von programmiertem Zelltod oder Immunabwehr involviert zu sein (Seeler and Dejean, 2001). Sie sind mit der nukleären Matrix assoziiert und enthalten als Kernkomponenten den Tumorsuppressor PML, Sp100 sowie eine Reihe transient assoziierter Proteine, unter denen sich verschiedene Transkriptionsfaktoren wie p53 sowie transkriptionelle Koregulatoren wie der Korepressor Daxx oder der Koaktivator p300/CBP befinden. Viele dieser Proteine unterliegen einer Modifikation mit SUMO, was ihre Assoziation mit PML-Foci zu modulieren scheint. PML, die namensgebende strukturelle Untereinheit der PML-Foci, ist ein proapoptotisches RING-Finger Protein (Fogal et al., 2000; Guo et al., 2000), das an drei unterschiedlichen Lysinen sumoyliert wird (Muller et al., 1998). Die Sumoylierung von PML bewirkt die Assemblierung bzw. Stabilisierung von PML-Foci (Duprez et al., 1999; Muller et al., 1998). Virale „immediate early“ Proteine des Herpes-Simplex- und Cytomegalie-Virus (ICP0 bzw. IE1) induzieren die Desaggregation von PML-Foci und

gleichzeitig den Verlust der Sumoylierung (Muller and Dejean, 1999). Die SUMO-Modifikation scheint hier also ein entscheidender Faktor für die Assemblierung und/oder den Erhalt der strukturellen Integrität von PML-Foci zu sein (Zhong et al., 2000). SP100 ist ebenfalls ein Substrat für SUMO (Sternsdorf et al., 1997). Das Protein hat eine Funktion in der Modulation von Chromatin und bindet Proteine der HP1- und HMG1/2-Familien. Interessanterweise hat sumoyliertes SP100 *in vitro* höhere Affinität für HP1 (Seeler et al., 2001). Auch für HIPK2 konnte ein Zusammenhang zwischen Sumoylierung und subnukleärer Lokalisierung gezeigt werden (Kim et al., 1999). HIPK2 ist eine Serin/Threonin-Kinase für p53, die mit Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren interagiert und als transkriptioneller Repressor wirkt. Sumoyliertes HIPK2 findet sich, ähnlich wie PML, in unlöslichen subnukleären Strukturen.

Möglich wäre, dass die Modifikation mit SUMO Proteine in die PML-Foci dirigiert, oder dass diese Orte der Sumoylierung sind. Die Präsenz der zahlreichen Transkriptionsfaktoren und transkriptionellen Regulatoren könnte auch auf eine Funktion als „Lagerungs“- oder Assemblierungsstation für in die Transkription involvierte Proteine hinweisen.

## PIAS Proteine

Die Familie der PIAS-Proteine ist evolutionär von der Hefe bis zum Menschen konserviert.

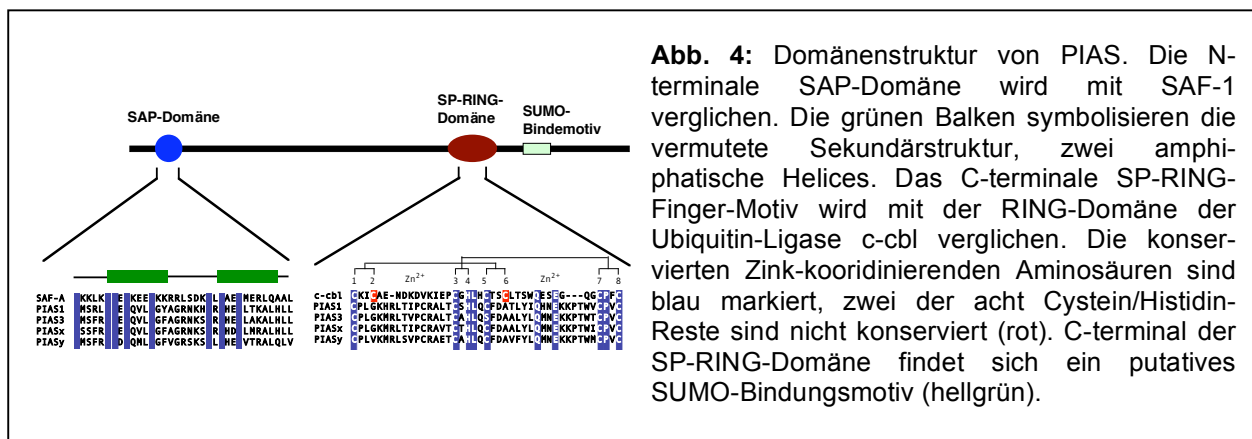
Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt zwei Formen (Siz-1 und Siz-2), während man beim Menschen fünf Familienmitglieder, PIAS1, PIAS3, PIASy und die Spleißvarianten  $\alpha$  und  $\beta$  von PIASx kennt (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998; Moilanen et al., 1999; Shuai, 2000; Wible et al., 2002; Wu et al., 1997). PIAS1 ist mit 651 AS das größte, PIASy mit 500 AS das kleinste Protein der Familie. Mit Ausnahme der variablen C-Termini zeigen PIAS-Proteine untereinander eine hohe Homologie (50-60% Identität auf Aminosäureebene).

Interessanterweise konzentrieren sich PIAS-Proteine in subnukleären Strukturen, die Ähnlichkeit mit PML-Foci besitzen (Kotaja et al., 2002b; Rodel et al., 2000; Sachdev et al., 2001). Manche dieser Foci überschneiden sich mit PML-Foci ((Sachdev et al., 2001), eigene Beobachtungen). Allerdings übertrifft die Zahl der PIAS enthaltenden Foci bei weitem die der PML-Foci, welche nur eine Anzahl von 10-30 pro Zellkern aufweisen.

## Domänen-Struktur von PIAS

Alle PIAS Proteine besitzen drei charakteristische Domänen (Fig. 1): Am N-Terminus findet sich die sogenannte SAP-Domäne (SAF-A/B, Acinus und PIAS), die als Chromatin-bindendes Motiv beschrieben wurde und in Proteinen, die in Chromatin-Remodelling und transkriptionelle Regulation involviert sind, gefunden wird (Aravind and Koonin, 2000; Kipp et al., 2000; Sachdev et al., 2001; Tan et al., 2002). Die SAP-Domäne von PIAS bindet *in vitro* präferentiell an AT-reiche DNA-Sequenzen, die ein Charakteristikum sogenannter „Nuclear Scaffold“- oder Matrix-Bindungs-Regionen sind. Somit scheint auch die SAP-Domäne in PIAS als Kernmatrix-Bindungsmotiv zu fungieren. Konsistent mit dieser Beobachtung lokalisieren PIAS-Proteine in der Kernmatrix und sind in distinkten nukleären Foci konzentriert. Des Weiteren besitzen PIAS-Proteine eine Cystein- und Histidinreiche SP-RING-Domäne (auch Miz-Zinkfinger-

Domäne), die Verwandtschaft zu der Zink-bindenden RING-Domäne von Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs aufweist (Hochstrasser, 2001; Wu et al., 1997). Der SP-RING-Domäne fehlen zwei der Zink-koordinierenden Cysteinreste. Bisher ist nicht klar, ob die SP-RING-Domäne trotzdem eine ähnliche Sekundärstruktur einnehmen kann wie die RING-Domäne von Ubiquitin-Ligasen. Am C-Terminus findet sich ein putatives SUMO-Bindungsmotiv. Dieses Motiv wurde ursprünglich als hhXSXS/Taaa-Sequenz definiert (h steht für eine hydrophobe, a eine saure und X eine beliebige Aminosäure), die im Two-Hybrid-System der Hefe an SUMO bindet (Minty et al., 2000). NMR-spektroskopische Daten zeigten jedoch, dass die Bindung nicht durch die sauren Aminosäuren SXS, sondern durch die N-terminal angrenzende hydrophobe Sequenz V/I-X-V/I-V/I vermittelt wird (Song et al., 2004).



### PIAS-interagierende Proteine als transkriptionelle Koregulatoren

Ursprünglich wurden PIAS-Proteine als Repressoren im STAT-Signaltransduktionsweg beschrieben. Transkriptionsfaktoren aus der STAT-Familie (STAT1, 2, 3, 4, 5a und b, 6) spielen wichtige Rollen in diversen zellulären Prozessen, wie z. B. der Immunantwort, der Differenzierung, und der Proliferation. Im inaktiven Zustand befinden sich STAT's als latente Transkriptionsfaktoren im Cytoplasma. Nach Bindung eines Cytokins an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche werden STAT's durch eine Phosphorylierungskaskade, die in der Autophosphorylierung des Rezeptors oder einer mit ihm assoziierten Janus-Kinase ihren Ausgang nimmt, aktiviert. Die Janus-Kinase phosphoryliert dann den Rezeptor, der daraufhin STAT's über SH2-Domänen rekrutiert, die dann ebenfalls von der Janus-Kinase phosphoryliert werden, was zu ihrer Dimerisierung und Translokation in den Zellkern führt, wo sie dann an die DNA in der Promotorregion ihrer Zielgene (GAS oder ISGFR-Sequenzen) binden. Für PIAS1 und PIAS3 konnte gezeigt werden, dass sie spezifisch an phosphoryliertes STAT1 bzw. STAT3 binden und deren DNA-Bindung verhindern (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998). Somit fungieren sie als wichtige negative Regulatoren im JAK-STAT-Signaltransduktionsweg. PIASy scheint ebenfalls als negativer Regulator, allerdings über einen anderen Mechanismus, zu fungieren.

Mitglieder der PIAS-Protein-Familie wurden später als Interaktionspartner zahlreicher anderer Proteine, vorwiegend von Transkriptionsfaktoren, und in vielen Fällen als deren

transkriptionelle Koregulatoren identifiziert (Tab. 1). Als funktionelle Konsequenz wurden abhängig vom Transkriptionsfaktor, PIAS-Subtyp oder Zielgen sowohl koaktivierende als koreprimierende Effekte beschrieben.

	<b>Funktion</b>	<b>PIAS-Formen</b>	<b>Sumo- ylierung</b>	<b>Funktion von PIAS</b>
STAT1	Transkriptionsfaktor	PIAS1, PIASy, PIAS3	ja	Inhibierung der Transaktivierung
STAT3	Transkriptionsfaktor	PIAS3	unklar	Inhibierung der Transaktivierung
STAT4	Transkriptionsfaktor	PIASx	unklar	Inhibierung der Transaktivierung
STAT5	Transkriptionsfaktor	PIAS3	unklar	Inhibierung der Transaktivierung
IRF-1	Transkriptionsfaktor	PIAS3	ja	Inhibierung der Transaktivierung
LEF-1	Transkriptionsfaktor	PIASy	ja	Inhibierung der Transaktivierung
MITF	Transkriptionsfaktor	PIAS3	bindet Ubc9	Inhibierung der Transaktivierung
p53	Transkriptionsfaktor	PIAS1, PIASy, PIASx	ja	Aktivierung/Inhibierung der Transaktivierung
p73	Transkriptionsfaktor	PIASx $\beta$ , PIAS1	ja	Inhibierung der Transaktivierung
mdm2	E3 Ubiquitin-Ligase für p53	PIAS1, PIASx $\beta$	ja	unklar
AR, GR, PR, MR	Transkriptionsfaktor	Alle	ja	Aktivierung/Inhibierung der Transaktivierung
GRIP1/TIF2	transkriptioneller Koaktivator	PIAS1, PIAS3, PIASx	ja	Stimulation der Koaktivierung
Sp3	Transkriptionsfaktor	PIAS1	ja	Inhibierung der Transaktivierung
C/EBP $\alpha$	Transkriptionsfaktor	PIASy	ja	Inhibierung der Transaktivierung
c-Myb	Transkriptionsfaktor	PIASy	ja	Inhibierung der Transaktivierung
c-Jun	Transkriptionsfaktor	PIAS1, PIASx	ja	unklar
Gfi-1	Transkriptionsfaktor	PIAS3	unklar	Aktivierung STAT3-Transaktivierung
TFII-I	Transkriptionsfaktor	PIASx $\beta$	unklar	Aktivierung der Transkription
CRP2	transkriptioneller Kofaktor	PIAS1	unklar	unklar
Gu	RNA Helikase	PIAS1	unklar	unklar
Msx-2	Transkriptionsfaktor	PIASx $\beta$	unklar	unklar
HMG1-C	transkriptioneller Kofaktor	PIAS3	unklar	Inhibierung der GR-Transaktivierung
mouse disabled-2	unklar	PIASx $\beta$	unklar	unklar
DJ-1	transkriptionelle Regulation	PIASx $\beta$	ja	Aktivierung der Transaktivierung
PLAG-1	Transkriptionsfaktor	PIAS1, PIASx, PIASy	ja	Inhibierung der Transaktivierung
Smad3	transkriptioneller Kofaktor	PIAS3	ja	Aktivierung der Transkription
Smad4	transkriptioneller Kofaktor	PIASy	ja	Inhibierung der Transaktivierung
IE2	Transkriptionsfaktor	PIAS1	ja	Aktivierung der Transkription
PPAR $\gamma$	Transkriptionsfaktor	PIASx $\beta$	ja	Inhibierung der Transaktivierung
p300/CBP	transkriptioneller Koaktivator	PIAS3	ja	Aktivierung/Inhibierung der Transkription
FAK	Tyrosinkinase	PIAS1	ja	Aktivierung der Autophosphorylierung
Axin	Regulation von Wnt und JNK	PIAS1, PIASy, PIASx $\beta$	ja	Inhibierung der JNK

**Tab. 1:** Zelluläre Interaktionspartner von PIAS-Proteinen

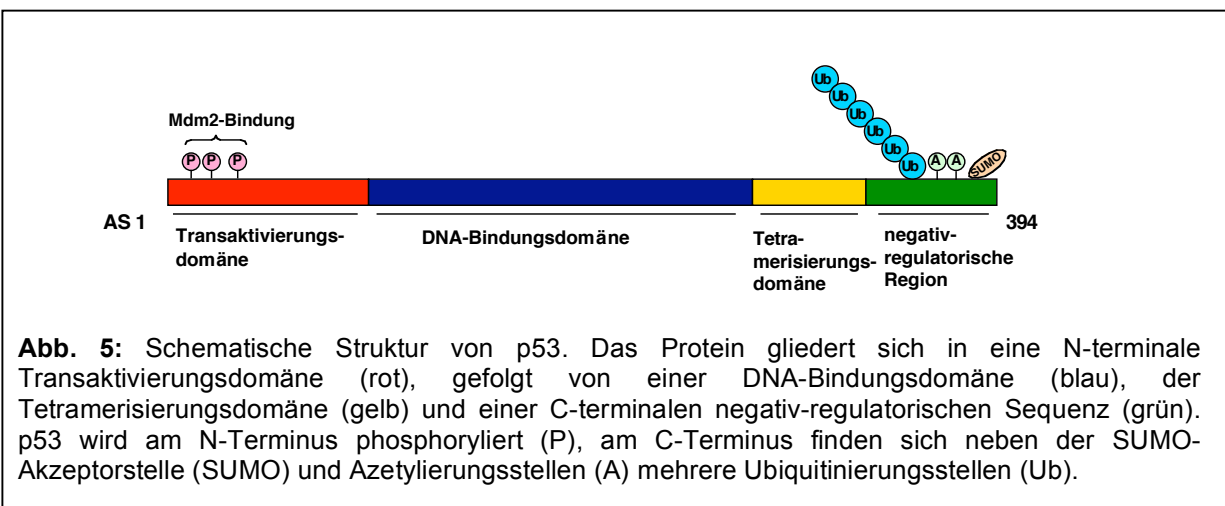
Ein Ausgangspunkt unserer Arbeiten zu PIAS-Proteinen waren Studien, die die Interaktion von PIAS-Proteinen mit p53 beschreiben (Gallagher et al., 1999; Minty et al., 2000; Nelson et al., 2001). Ähnlich wie für andere Transkriptionsfaktoren wurden sowohl aktivierende als auch reprimierende Effekte von PIAS auf die Aktivität von p53 beschrieben. So inhibiert PIASy die p53-vermittelte Expression der p53-Zielgene p21 und Bax (Nelson et al., 2001). In EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*) Experimenten inhibiert PIASy die DNA-Bindung von p53 an ein p53-Konsensus-DNA-Bindungselement. Als Bindungsmotiv in p53 für PIAS wurde der C-terminale Bereich identifiziert, der die Tetramerisierungsdomäne und die negativ regulatorische Domäne umfasst (Megidish et al., 2002). Interessanterweise sind zahlreiche PIAS-bindende Proteine, wie Steroidhormon-Rezeptoren, IE2 und p53 auch bekannte Substrate für SUMO. Auch MITF ist ein potenzielles Zielprotein für SUMO, da es als Bindungspartner von Ubc9 beschrieben wurde (Xu et al., 2000).

## Der Tumorsuppressor p53

Der Transkriptionsfaktor p53 war einer der ersten identifizierten Tumorsuppressoren. Die Tatsache, dass p53 in ca. der Hälfte aller menschlichen Tumore nicht mehr funktionell ist, verdeutlicht seine essentielle Rolle in der Tumorsuppression und in der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung (Meek, 2004). Ob seiner Bedeutung in der Tumorsuppression und der Aufrechterhaltung eines intakten Genoms wird p53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Levine, 1997; Prives and Hall, 1999; Vogelstein et al., 2000).

### Struktur von p53

Das Protein kann strukturell und funktionell in vier Domänen unterteilt werden: Eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine zentrale, sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne, eine Tetramerisierungsdomäne und eine negativ-regulatorische Region am C-Terminus. Die N-terminale Domäne interagiert mit basalen Transkriptionsfaktoren wie hTAFII-31 und hTAFII70 und den transkriptionellen Koaktivatoren p300/CBP und PCAF.



### Aktivierung von p53

p53 ist unter Normalbedingungen in der Zelle inaktiv, da es nur in sehr geringen Mengen vorliegt. Ursache hierfür ist der Abbau von p53 über das Ubiquitin-Proteasom-System. Der Hauptabbauweg erfolgt über die Interaktion von p53 mit der Ubiquitin-Ligase Mdm2, die im N-terminalen Bereich von p53 bindet und Ubiquitinierung an C-terminalen Lysinresten stimuliert. In Stresssituationen und nach DNA-Schädigung werden die Halbwertszeit und die Aktivität von p53 jedoch stark erhöht. Es existieren mindestens drei unabhängige Wege, um p53 zu aktivieren:

Erstens die Schädigung von DNA, z. B. durch ionisierende Strahlung. Hier werden zwei Kinasen aktiv, die ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und Chk2 (Carr, 2000). ATM wird als Folge von Doppelstrangbrüchen aktiviert und aktiviert ihrerseits wiederum Chk2. Der DNA-Schaden wird durch sogenannte „Checkpoints“ registriert, die die Progression durch den Zellzyklus aufhalten, bis der Schaden behoben ist. Diese Checkpointproteine sind z. B. DNA-abhängige Proteinkinasen, ATM sowie Chk1 und 2 (Carr, 2000). Alle phosphorylieren p53 am N-Terminus an den Serinen S15, S20 und S37, was seine Interaktion mit Mdm2 verhindert (s. u.).

Zweitens wird p53 durch p14ARF aktiviert, welches auf aberrante Wachstumssignale, die aus einer übermäßigen Expression von Onkogenen wie *ras* oder *myc* resultieren, reagiert (Lowe, 1999; Sherr and Weber, 2000). Diese Onkogene stimulieren die Transkription von p14ARF, welches an Mdm2 bindet und seine Aktivität so direkt oder durch die Rekrutierung von Mdm2 in den Nukleolus, wo es nicht mehr mit p53 interagieren kann, inhibiert.

Drittens führen Chemotherapeutika, UV-Licht sowie Protein-Kinase-Inhibitoren zu einer Aktivierung von p53. Dieser Weg ist unabhängig von intakten *ATM*-, *Chk2*- und *p14*-Genen und benötigt stattdessen ATR (*Ataxia telangiectasia related*) und Casein-Kinase II (Meek, 1999).

Alle drei Mechanismen inhibieren die Degradation von p53. Aufgrund dieser Stabilisierung führt p53 seine Funktion, die Bindung an DNA und damit die Aktivierung angrenzender Gene, aus. Diese Zielgene sind in den Zellzyklus und in Apoptose involviert (s. u.).

### Zielgene von p53

p53 kontrolliert zahlreiche Gene, die sich in vier Kategorien aufteilen lassen:

Einer der frühesten Effekte nach DNA-Schaden ist eine Inhibition des Zellzyklus. p53 stimuliert die Expression von p21<sup>WAF/CIP1</sup> durch spezifische Bindung an dessen Promotor. p21<sup>WAF/CIP1</sup> inhibiert Cyclin-abhängige Kinasen (CDK's); somit inhibiert p53 das Fortschreiten von der G1- zur S-Phase. Weiterhin aktiviert p53 Reprimo, welches Zellen in der G2-Phase (Ohki et al., 2000) arretiert. In Epithelzellen stimuliert p53 die Expression von 14-3-3 $\sigma$ , welches CyclinB1-CDK1-Komplexe aus dem Nukleus dirigiert und den G2-Arrest aufhält (Chan et al., 1999).

Eine Vielzahl von Zielgenen ist in den programmierten Zelltod involviert (Gottlieb and Oren, 1998). p53 kann die Expression von Bax, einem Apoptose-induzierenden Protein aus der Bcl-2 Familie, durch Bindung an dessen regulatorische Region direkt stimulieren. Weiterhin aktiviert p53 die Expression von NOXA und P53AIP1, zwei in den Mitochondrien lokalisierten Proteinen, die ebenfalls bei Überexpression Apoptose induzieren (Oda et al., 2000a; Oda et al., 2000b). NOXA gehört ebenso wie PUMA zur Bcl-2 Familie. Beiden Proteinen ist eine BH3-Domäne gemeinsam. Proteinen dieser „BH3-only“-Familie wird eine Rolle bei der Initiation der Apoptose zugeschrieben

(Bouillet and Strasser, 2002). PUMA Knock-out-Mäuse zeigen dieselben Defizienzen bei der Apoptose wie p53 Knock-out-Mäuse (Jeffers et al., 2003; Villunger et al., 2003).

p53 wird darüber hinaus eine direkte Rolle in der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität zugeschrieben (Tlsty, 1997; Wahl et al., 1997). Die Mechanismen in diesem Signalweg sind relativ schlecht untersucht, doch scheinen Gene, die im Reparaturweg des Basenaustauschs, der chromosomalen Rekombination und der chromosomalen Segregation involviert sind, eine Rolle zu spielen. Zudem induziert p53 nach DNA-Schaden eine spezifische Ribonukleotid-Reduktase (Tanaka et al., 2000).

Schließlich stimuliert p53 die Expression von Genen, die die Blutgefäßbildung inhibieren (Hendrix, 2000). Die Versorgung mit Nährstoffen durch ein eigenes Gefäßsystem ist für das Erreichen einer gewissen Größe eines Tumors unabdinglich. Das Wildtyp-Protein p53 stimuliert Gene, die diesem Prozess entgegenwirken.

### **Regulation von p53 durch posttranslationale Modifikationen**

Wie oben beschrieben, wird die Menge an p53 in der Zelle vorwiegend durch seine Degradationsrate reguliert, welche wiederum von der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse bestimmt wird. Mdm2 ist die wichtigste Ubiquitin-Ligase für p53 und damit hauptverantwortlich für seinen Abbau (Momand et al., 2000). Mdm2 wird durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert: p53 bindet an p53-responsive regulatorische Regionen im Promotor des *mdm2*-Gens und führt damit zur Induktion der Genexpression und verstärkten Mdm2-Synthese, was wiederum den Abbau von p53 stimuliert. Die nun mehr geringe Menge an p53 wiederum inhibiert die Transkription von Mdm2, was in der Stabilisierung von p53 resultiert. Neuere Daten zeigen, dass Mdm2 p53 monoubiquitiniert und für die Polyubiquitinierung zusätzlich der transkriptionelle Koaktivator p300 benötigt wird (Grossman et al., 2003). Phosphorylierung im N-Terminus (Serin S15 und S20) durch die DNA-abhängige Proteinkinase, ATM, Chk1 und Chk2 hingegen verringert die Interaktion mit Mdm2, was zu einem Anstieg der p53-Konzentration führt.

Eine hohe Menge an p53 in der Zelle ist jedoch allein nicht ausreichend für die Aktivierung der Zielgene. Hierzu sind zusätzliche posttranslationale Modifikationen im Protein erforderlich. Von den bekannten Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung, Azetylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung (Giaccia and Kastan, 1998; Meek, 1999; Prives and Hall, 1999) sind vor allem Phosphorylierung und Azetylierung im C-Terminus für die Aktivierung entscheidend. Die Azetyltransferasen p300 und PCAF azetylieren das C-terminale Lysin K320 und K382, Sir2 deazetyliert p53 hingegen an Lysin 382 (Langley et al., 2002; Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001). Nach DNA-Schädigung wird p53 an K320 und K382 azetyliert (Abraham et al., 2000; Sakaguchi et al., 1998). Die Azetylierung durch p300 und PCAF verstärkt die Aktivität von p53, während die Deazetylierung inhibierend wirkt. Ein Modell schlägt vor, dass die Azetylierung zu einer Konformationsänderung führt. Es wurde postuliert, dass im inaktiven Zustand durch eine Einfaltung des C-Terminus die DNA-Bindungsdomäne maskiert wird und dadurch die Bindungsfähigkeit an DNA inhibiert ist. Azetylierung und Phosphorylierung im C-Terminus sollten die DNA-Bindfähigkeit, vermutlich durch Aufhebung dieser Faltung, ermöglichen. Neuere Strukturdaten sprechen jedoch gegen dieses Modell. Vielmehr scheinen Phosphorylierung und Azetylierung die Rekrutierung transkriptioneller Koaktivatoren zu vermitteln.

Phosphorylierung von p53, z. B. an Serin S15, und Azetylierung an K382 verstärkt seine



Interaktion mit Koaktivatoren wie p300/CBP und PCAF (Lambert et al., 1998). Phosphat-Modifikationen an den Serinen S33 und S315 und Threonin T81 generieren Bindungsstellen für die Peptidyl-Prolyl-Isomerase Pin1 (Zacchi et al., 2002; Zheng et al., 2002). Überexpression von Pin1 erhöht die p53-abhängige Transaktivierung, Genexpression und Apoptose.

Neben der Azetylierung und Phosphorylierung wird p53 am Lysin K386, also in der C-terminalen regulatorischen Domäne, mit SUMO modifiziert. Die Funktion dieser Modifizierung ist bislang unklar. In Reporterexperimenten mit einem p21-Promotorelement bzw. einem p53-Konsensus-DNA-Bindungselement wurde eine 2-3-fache Stimulierung der p53-Aktivität in Abhängigkeit von SUMO gezeigt (Gostissa et al., 1999; Rodriguez et al., 1999). Spätere Arbeiten konnten jedoch diese SUMO-abhängige transkriptionelle Aktivierung von p53 nicht bestätigen (Kwek et al., 2001). Eine Mutante, in der das Lysin K386 zu einem Arginin mutiert ist, zeigt verminderte proapoptotische Eigenschaften (Muller et al., 2000).

## **PARP**

PARP-1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1), ein 113 kDa-Protein mit relativ hohem Konservierungsgrad von Archaeen bis zum Mensch, ist ein abundantes, Chromatin-assoziiertes, homodimeres Protein und repräsentiert eine Enzymfamilie mit mindestens elf Mitgliedern, die den Transfer von ADP-Ribose von seinem Substrat NAD<sup>+</sup> (Beta-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) auf sich selbst oder andere nukleäre, häufig in die Aufrechterhaltung der Chromatinstruktur involvierte Proteine katalysiert (Hassa and Hottiger, 2002). Die Poly-ADP-Ribosylierung spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur und der Apoptose; dementsprechend wird PARP-1 nach DNA-Schädigung aktiviert. Die Automodifikation von PARP-1 kann seine DNA-Bindung, Protein-Interaktionen und die enzymatische Aktivität modulieren.

### **Struktur von PARP-1**

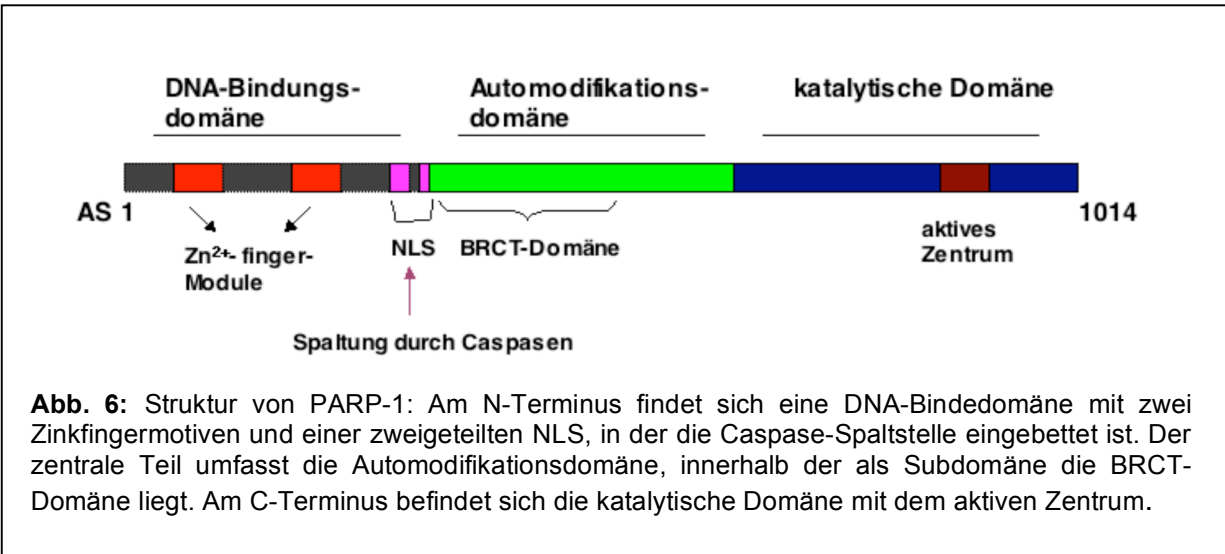
PARP-1 weist drei strukturelle und funktionelle Domänen auf: Eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne (42 kDa), eine zentrale Automodifikationsdomäne (16 kDa) und eine C-terminale katalytische Domäne (55 kDa), die auch das aktive Zentrum beinhaltet (Rolli et al., 1997).

Die DNA-bindende Domäne enthält zwei Zinkfinger-Motive (Cherney et al., 1987; Mazon et al., 1989). Der erste ist essentiell für die PARP-Aktivität nach DNA-Schädigung, der zweite scheint für die Aktivität von PARP-1 nur nach Doppelstrangbrüchen eine Rolle zu spielen (Ikejima et al., 1990). Ferner enthält die DNA-Bindedomäne eine zweigeteilte NLS, in welche eine DEVD-Sequenz als Spaltstelle für Caspasen eingebettet ist. Die DNA-Bindungsdomäne ist auch in diverse Protein-Protein-Interaktionen involviert, wie z. B. die Interaktion mit Histonen, XRCC-1 oder der DNA-Polymerase $\alpha$ .

Die Automodifikationsdomäne ist ebenfalls an diesen Interaktionen beteiligt, ferner findet hier noch die Interaktion mit NF $\kappa$ B, dem Transkriptionsfaktor Oct-1 sowie Ubc9 statt. PARP-1 wird an zahlreichen Glutamatresten innerhalb der Automodifikationsdomäne automodifiziert (Kurosaki et al., 1987). Die Automodifikationsdomäne enthält weiterhin ein BRCT (*BRCA1*-Carboxy-Terminus)-Motiv, welches in vielen Proteinen gefunden wird, die in die Antwort auf DNA-Schaden involviert sind. Dieses Motiv vermittelt die

Interaktion zwischen diversen DNA-Reparatur- und Zellzyklus-Checkpoint-Proteinen. Weiterhin spielt die Automodifikationsdomäne neben der DNA-Bindungsdomäne eine Rolle in der Dimerisierung von PARP-1 (Buki et al., 1995).

Die katalytische Domäne ist essentiell für die  $\text{NAD}^+$ -Bindung, für die Polymerisierung und die Verzweigungsreaktionen (Rolli et al., 1997; Simonin et al., 1993). Außerdem ist sie in die Interaktion mit PARP-3 und Topoisomerase-1 involviert. Der katalytische Aminosäurerest Glutamat E988 ist in verschiedenen Mitgliedern der PARP-Familie als auch zwischen verschiedenen Spezies konserviert.



### Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei der (ADP-Ribose)-Polymere an Zielproteine synthetisiert werden. Man findet ADP-Ribosylierung in allen kernhaltigen Zellen von Säugern, Pflanzen und niederen Eukaryonten, mit Ausnahme der Hefe. Unter normalen Bedingungen finden sich geringe Mengen an ADP-ribosylierten Proteinen in der Zelle, nach Einzel- und Doppelstrangbrüchen wird PARP jedoch aktiviert, was zu erhöhten Mengen an ADP-Ribose-Konjugaten führt. Diese Aktivität wird hauptsächlich von PARP-1 ausgeführt.

Bei der Synthese von Poly(ADP-Ribose) wird  $\text{NAD}^+$  zu ADP-Ribose und Nikotinamid gespalten. PARP-1 katalysiert die Bindung eines ersten ADP-Ribose-Moleküls an eine Akzeptoraminosäure, meist ein Glutamat, und anschließend die Elongation und Verzweigung mit weiteren ADP-Ribose-Einheiten, was in linearen oder verzweigten Polymeren von Poly(ADP-Ribose) (PAR) mit bis zu 200 Einheiten resultiert.

Die meisten Poly(ADP-Ribose)-Substrate sind DNA-bindende nukleäre Proteine, wie Histone, Transkriptionsfaktoren, HMG-Proteine, Topoisomerasen, DNA-Ligasen und DNA- und RNA-Polymerasen. Obwohl die Konsequenzen der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf die Struktur und die Aktivität ihrer Substrate derzeit schlecht untersucht sind, sollten aufgrund der starken negativen Ladung der Polymere modifizierte Proteine in ihren physikalischen und biochemischen Eigenschaften deutlich verändert sein, in jedem Fall dürfte ihre DNA-Bindungsaktivität drastisch reduziert sein.

Die Modifikation mit PAR ist reversibel und kann, z. B. nach erfolgter Reparatur des DNA-Schadens, durch das Enzym PARG (*Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase*) wieder aufgehoben werden (Ame et al., 1999). PARG besitzt sowohl Endo- als auch Exoglykosylase-Aktivität, die die Hydrolyse von glykosidischen Bindungen zwischen ADP-Ribose-Einheiten von PAR katalysiert (Davidovic et al., 2001). Schließlich spaltet eine ADP-Ribosyl-Lyase das am Protein verbleibende ADP-Ribose-Monomer.

### **Die PARP-Familie**

Neben dem prominentesten Mitglied PARP-1 wurden fünf weitere Mitglieder der Familie näher untersucht (Ame et al., 2004):

Die Struktur von PARP-2 ist der von PARP-1 sehr homolog, ihre katalytischen Domänen haben eine Homologie von 69% auf Aminosäureebene. Unterschiede in der Struktur finden sich in der Akzeptorstelle, was auf eine verschiedene Substratspezifität schließen lässt (Oliver et al., 2004). PARP-2 modifiziert vorwiegend Histon H2B, während PARP-1 präferentiell Histon H1 ADP-ribosyliert (Poirier et al., 1982). Während PARP-1 an sogenannte „gaps“ bindet, die sich durch eine fehlende Base auszeichnen, erkennt und bindet PARP-2 „nicks“, d. h. einen nicht mit seinem nachfolgenden Zuckerrest verbundenen Phosphorest. PARP-2 interagiert mit PARP-1 und teilt sich mit diesem einige Interaktionspartner, wie z. B. XRCC-1, DNA-Polymerase $\beta$  und DNA-Ligase III.

PARP-3 ist eine Komponente des Centrosoms. Während des Zellzyklus ist es präferentiell an der Tochterzentriole lokalisiert. PARP-3 besitzt nur eine sehr geringe Modifikationsaktivität.

PARP-4 (V<sub>PARP</sub>) ist mit 192 kDa das größte Protein der Familie. PARP-4 assoziiert mit sogenannten Vaultpartikeln, cytoplasmatischen Ribonukleinkomplexen, die weiterhin die hochkonservierten Proteine MVP (*major vault protein*) und TEP1 (*telomerase associated protein*) sowie eine nichttranslatierte Vault-RNA beinhalten (Kickhoefer et al., 1999). Die Funktion dieser Partikel ist unklar, es wird jedoch vermutet, dass sie in den zellulären Transport involviert sind.

PARP-5a (Tankyrase1) wurde als Interaktionspartner von TRF1 identifiziert (Smith et al., 1998). In diesem Protein finden sich mehrere Ankyrinwiederholungen in fünf Clustern (Seimiya et al., 2004). Überexpression von PARP-5a führt zur ADP-Ribosylierung von TRF1. Dies führt zu dessen Dissoziation von den Telomeren und resultiert damit in deren Elongation (Smith and de Lange, 2000).

PARP-5b (Tankyrase2) zeigt über 85% Sequenzidentität mit PARP-5a. Den beiden Enzymen werden überlappende Funktionen in der Aufrechterhaltung der Telomere und im Vesikeltransport zugeschrieben. Anders als PARP-5a induziert PARP-5b nach Überexpression caspaseunabhängige Apoptose durch einen Zusammenbruch des mitochondrialen Potenzials (Kaminker et al., 2001).

### **Die duale Rolle von PARP-1 in der Antwort auf DNA-Schaden**

PARP-1 werden im wesentlichen zwei Funktionen in der Antwort auf DNA-Strangbrüche zugeschrieben:

Zum einen dient es durch seine Fähigkeit, lädierte DNA zu erkennen und zu binden, als Sensor für DNA-Schäden. Die Bindung von PARP-1 an DNA rekrutiert wiederum XRCC-1 (Caldecott, 2003; Okano et al., 2003), ein offensichtlich als Scaffolding-Faktor fungierendes Schlüsselmolekül in der Basenaustauschreparatur, welches andere in diesem Signalweg benötigten Komponenten, wie Polymerase $\beta$  sowie DNA-Ligase III rekrutiert.

Zum anderen scheint PARP-1 direkt in die Reparatur von DNA-Schäden involviert zu sein. Änderungen in der Chromatinstruktur scheinen das früheste Ereignis in der zellulären Antwort auf DNA-Schaden zu sein. So dienen die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen und anderen nukleären Proteinen sowie die Phosphorylierung von Histon H2AX an Serin S139 als zwei epigenetische Marker, die durch DNA-Strangbrüche induziert werden und geschädigtes Chromatin kennzeichnen. Durch DNA-Schaden induzierte Poly-(ADP-Ribosyl)ierung von H1 und H2B führt zumindest *in vitro* zur Relaxation von 30 nm-Chromatinfibern, was den Zutritt von Reparaturenzymen erleichtern sollte. Der Basenaustauschreparaturweg (*base excision repair*, BER) lässt sich in zwei Subreparaturwege unterteilen: einen „short patch repair pathway“, der den Hauptanteil stellt und bei dem lediglich eine einzige Base ausgetauscht wird und einen „long patch repair pathway“, bei dem 2-14 Nukleotide ersetzt werden. PARP-1 bindet mit hoher Affinität an Reparaturintermediate, die vor der Entscheidung des zu benutzenden Signalwegs entstehen (Lavrik et al., 2001). Obwohl die Interaktion von PARP-1 mit XRCC-1, Polymerase $\beta$  und FEN-1 (*Flap-Endonuklease*) eine Rolle von PARP-1 in beiden Signalwegen impliziert (Dantzer et al., 2000; Lavrik et al., 2001; Masson et al., 1998), scheint es im „short patch pathway“ eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, während es im „long patch pathway“ einen Komplex mit Polymerase $\beta$  und FEN-1 bildet, in dem PARP-1 und FEN-1 die DNA-Neusynthese durch Polymerase $\beta$  stimulieren (Prasad et al., 2001).

Weiterhin ist PARP-1 bei der Ligation der DNA beteiligt (Leppard et al., 2003). DNA-Ligase III bindet direkt an Poly-(ADP-Ribose) sowie an poly-(ADP-ribosyl)iertes PARP-1.

### **Modulation der transkriptionellen Aktivität durch PARP-1**

PARP-1 ist mit der RNA-Polymerase II assoziiert (Slattery et al., 1983) und spielt in diesem Komplex eine essentielle Rolle als negativer Regulator der zufälligen Initiation der Transkription (Matsui et al., 1980). PARP-1 inhibiert die Initiation der Transkription durch die Poly(ADP-Ribosyl)ierung TATA-Box-bindender Proteine und in der Folge die Bildung des Initiationskomplexes (Oei et al., 1998). Weiterhin kann PARP-1 die Elongation durch Polymerase II effizient verhindern, indem es direkt an Transkripte bindet (Vispe et al., 2000).

In vielen Fällen fungiert PARP-1 als transkriptioneller Koaktivator für Transkriptionsfaktoren, zu nennen wären hier Oct-1 (Nie et al., 1998), B-Myb (Cervellera and Sala, 2000), TEF-1 (Butler and Ordahl, 1999), AP-2 (Kannan et al., 1999), HIV Tax (Anderson et al., 2000), NF- $\kappa$ B (Hassa and Hottiger, 1999) und p53 (Vaziri et al., 1997). I. d. R. scheint die Aktivität von PARP-1 aus der Bindung an und Modifikation von Transkriptionsfaktoren und der Assemblierung von Enhancosom-ähnlichen Komplexen zu resultieren (Akiyama et al., 2001; Butler and Ordahl, 1999; Nirodi et al., 2001; Plaza et al., 1999).

Es wurden jedoch auch reprimierende Effekte beschrieben (Soldatenkov et al., 2002). Möglicherweise wird PARP-1 spezifisch durch die Interaktion mit DNA-bindenden Proteinen an seine Zielpromotoren rekrutiert. Alternativ könnte PARP-1 direkt oder in Verbindung mit anderen DNA-bindenden Proteinen an Promotor- und Enhancer-Sequenzen binden. (Akiyama et al., 2001; Butler and Ordahl, 1999; Ha et al., 2002; Nie et al., 1998; Nirodi et al., 2001; Plaza et al., 1999; Zhang et al., 2002b). Neuere Arbeiten beschreiben die Bindung von PARP-1 an Nukleosomen, die zur Bildung von transkriptionell reprimierten Chromatinstrukturen führt (Kim et al., 2004b).

### **PARP-1 in der Apoptose**

Nach DNA-Schädigung kann eine Zelle zwei alternative Wege einschlagen: Zum einen die Reparatur des Schadens, zum anderen, bei irreparablen Schäden, die Einleitung der Apoptose. Bei DNA-Strangbrüchen wird PARP-1 aktiviert. Nach limitierter DNA-Läsion könnte die Aktivierung von PARP-1 zum Anschalten von DNA-Reparatur- und Zellzyklus-Kontroll-Maschinerien beitragen, bei drastischen DNA-Schädigungen könnte die exzessive Poly(ADP-Ribosyl)ierung ein Signal für das Einleiten der Apoptose darstellen.

Während der am besten untersuchten Caspase-abhängigen Apoptose wird PARP-1 zu einem frühen Zeitpunkt von Caspase-3 und -7 an seiner DEVD-Sequenz innerhalb der NLS in ein 24 kDa und ein 89 kDa-Fragment (p24 und p89) gespalten (Alnemri et al., 1996; Casciola-Rosen et al., 1996; Germain et al., 1999; Nicholson et al., 1995; Nicholson and Thornberry, 1997; Tewari et al., 1995). Das die DNA-Bindedomäne mit den beiden Zinkfingern enthaltende p24-Fragment kann weiterhin DNA und RNA-Transkripte binden, kann jedoch nicht mehr von der DNA entlassen werden, da es nicht mehr poly(ADP-ribosyl)iert werden kann. Daraus resultiert eine transdominante Inhibierung der DNA-Reparatur, der Transkription und der Poly(ADP-Ribose)-Synthese als Antwort auf DNA-Strangbrüche (Yung and Satoh, 2001). p89 könnte durch Bindung an intakte PARP-1-Moleküle eine Rolle in der Apoptose spielen, indem es die Bildung der für die Aktivität notwendigen Homodimerisierung verhindert (Kim et al., 2000).

Weiterhin wurde PARP-1 mit dem mitochondrialen, proapoptotischen Protein AIF (*apoptosis inducing factor*) in Verbindung gebracht (Yu et al., 2002). Bei diesem Signalweg wird AIF von den Mitochondrien in den Nukleus transloziert, wo es die Fragmentation hochmolekularer DNA und Kondensation von Chromatin induziert (Penninger and Kroemer, 2003). Für diesen Prozess ist PARP-1 essentiell (Yu et al., 2002).

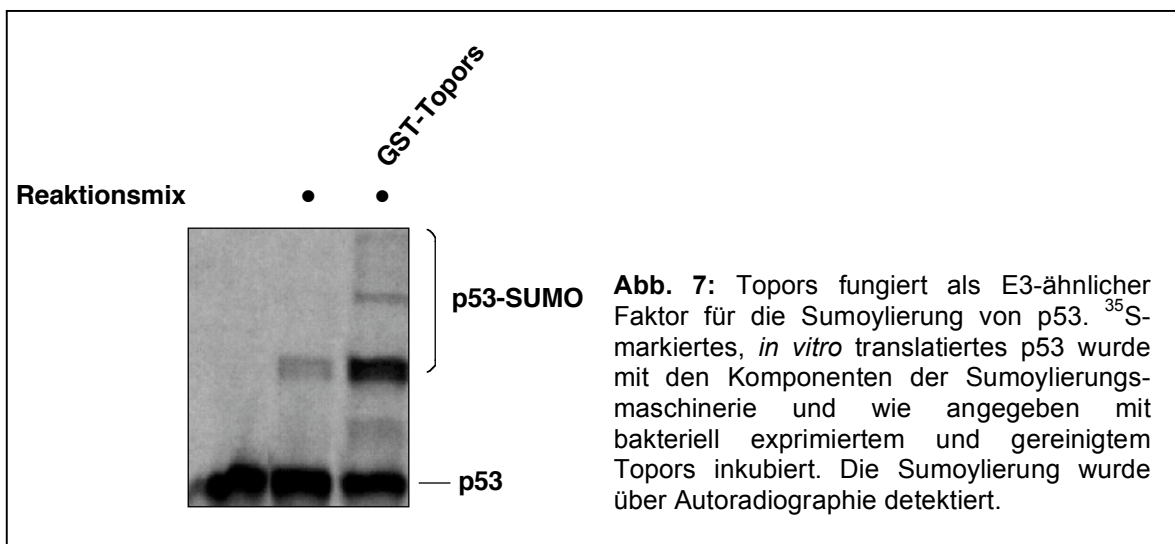
## Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Frage, ob im SUMO-System analog zum verwandten Ubiquitin-System E3- oder E3-ähnliche Faktoren als sogenannte Ligasen am Modifikationsprozess beteiligt sind. Die Beobachtung, dass E1 und das SUMO-E2 Ubc9 *in vitro* bei mehreren Substraten für eine erfolgreiche Sumoylierung ausreichen, war lange ein Hauptargument gegen die Beteiligung von E3-Faktoren bei der Modifikation mit SUMO. Arbeiten an *S. cerevisiae* identifizierten jedoch die beiden Proteine Siz1 und Siz2 als E3-Faktoren für Septine. In dieser Arbeit sollten E3-Faktoren des SUMO-Systems von Säugern identifiziert und charakterisiert werden. Die Kriterien für die Charakterisierung wurden vergleichend zu E3-Ligasen des Ubiquitin-Systems gewählt und schlossen die Untersuchung der Bindung an Substrat sowie Ubc9, die Kartierung von für die Ligaseaktivität notwendigen Domänen sowie die Suche nach potenziell regulatorischen Interaktionspartnern ein.

Ein Schwerpunkt der Arbeit galt der Identifizierung E3-ähnlicher Faktoren bei der SUMO-Modifikation des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors p53. p53 unterliegt einer Sumoylierung in seiner C-terminalen regulatorischen Region. Die funktionelle Konsequenz dieser Modifikation war jedoch unklar. Die Möglichkeit, mittels einer E3-Ligase die SUMO-Modifikation von p53 zu induzieren, sollte zur Untersuchung der funktionellen Konsequenzen seiner SUMO-Modifikation genutzt werden. Darüber hinaus sollte durch das Studium von p53 als „Modellsubstrat“ die generelle Rolle der Sumoylierung von Transkriptionsfaktoren besser verstanden werden.

## PIAS-Proteine stimulieren die Sumoylierung von p53

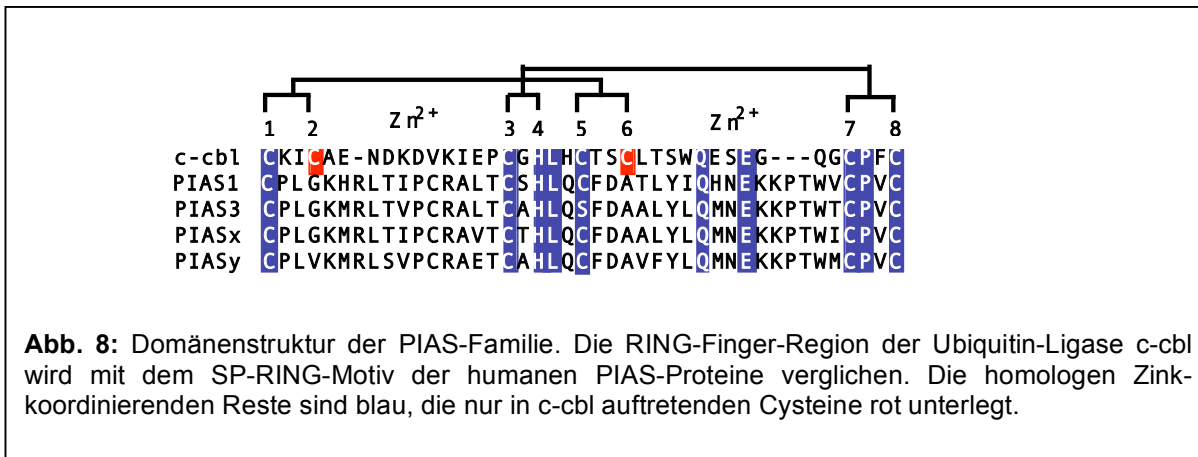
Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Suche nach E3-ähnlichen Komponenten der SUMO-Modifikation von p53. Hiermit sollten zum einen neue mechanistische Erkenntnisse zum SUMO-Konjugationsweg gewonnen werden, zum anderen war das Ziel über die Identifizierung neuer Regulatoren die funktionelle Konsequenz der Sumoylierung von p53 besser zu verstehen. Als Kandidaten für E3-Ligasen des SUMO-Systems kamen aufgrund der mechanistischen Homologie zum Ubiquitin-System sogenannte RING-Finger-Proteine in Betracht, da die RING-Domäne eine Klasse von Ubiquitin-Ligasen definiert. In einem ersten Ansatz wurden deshalb RING-Finger-Proteine, für die eine Interaktion mit p53 beschrieben war, als potenzielle Kandidaten für SUMO-E3-Ligasen getestet. Hierzu wurde ein *in vitro* SUMO-Modifikationssystem etabliert, in dem das Substrat während seiner *in-vitro*-Translation in Retikulozytenlysat mit radioaktivem Methionin markiert und mit bakteriell exprimiertem und gereinigtem E1, Ubc9, SUMO und ATP (im folgenden als Reaktionsmix bezeichnet) inkubiert wird. In einem ähnlichen System konnte eine basale Sumoylierung von p53 in Abwesenheit zusätzlicher Faktoren gezeigt werden (Muller et al., 2000). Es konnte nun getestet werden, ob die Zugabe von mit p53 interagierenden RING-Finger-Proteinen einen stimulierenden Effekt auf die Modifikation zeigt. Während für verschiedene Kandidaten, wie PML oder mdm2, kein Effekt auf die Sumoylierung beobachtet wurde, hatte das RING-Finger-Protein Topors, ein Interaktor von p53, einen drastischen Effekt auf die Sumoylierung von p53 (Abb. 7): Die *in vitro*-Translation von p53 führt zur Entstehung des erwarteten Produkts von ca. 50 kDa. Nach Zugabe des aus E1, Ubc9 und SUMO bestehenden Reaktionsmixes unterliegt p53 einer moderaten Sumoylierung, wie an der schwachen höhermolekularen Bande bei ca. 75 kDa zu erkennen ist. Die Zugabe von bakteriell exprimiertem und gereinigtem GST-Topors verstärkt die Monomodifikation mit SUMO von p53 *in vitro* massiv. Weiterhin induziert Topors die Modifikation von p53 mit zwei weiteren SUMO-Molekülen, die von den schwachen höhermolekularen Banden bei ca. 95 kDa und 120 kDa repräsentiert werden. Hier handelt es sich entweder um SUMO-SUMO-Ketten oder Modifikationen von p53 mit SUMO an weiteren, weniger benutzten Stellen.



Um den Einfluss von Topors auf die Sumoylierung von p53 *in vivo* zu untersuchen, wurde p53 zusammen mit SUMO und Topors in Hela-Zellen transfiziert und die SUMO-Modifikation 48 h nach Transfektion nach Zellyse und gelelektrophoretischer Separation anhand eines gegen p53 gerichteten Western Blots analysiert. In diesen Experimenten konnte keine Ligaseaktivität von Topors bezüglich der SUMO-Modifikation von p53 festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass für die Ligasefunktion von Topors weitere Faktoren benötigt werden, die bei den *in vitro*-Experimenten im Retikulozytenlysat anwesend sind, *in vivo* jedoch unter endogenen Bedingungen nicht ausreichend exprimiert sind.

Durch die Identifizierung von Siz-Proteinen als E3-Ligasen der Hefe wurden unsere Arbeiten in eine neue Richtung gelenkt. Es wurde gezeigt, dass die Siz-Proteine in *S. cerevisiae* die Sumoylierung der Septine induzieren. Siz-Proteine besitzen eine SP-RING-Finger-Domäne, die Ähnlichkeit zur RING-Domäne von Ubiquitin-Ligasen aufweist. PIAS-Proteine sind die Homologen von Siz in Säugern. Abb. 8 zeigt einen Sequenzvergleich zwischen der RING-Domäne der Ubiquitin-Ligase c-cbl und den verschiedenen Formen von PIAS. In PIAS-Proteinen fehlen zwei der konservierten Cysteine.

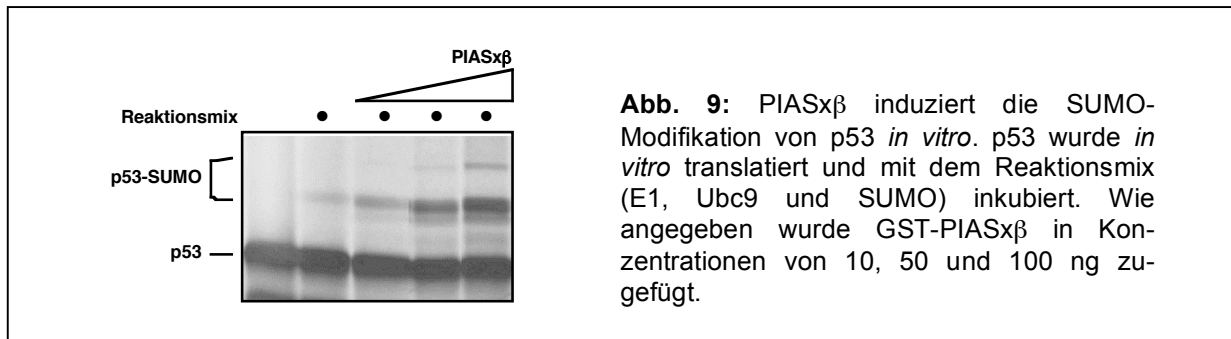
Mehrere PIAS-Formen wurden in Two-Hybrid-Screens als Interaktoren für p53 identifiziert (PIASx $\beta$ , 1 und y) (Gallagher et al., 1999; Minty et al., 2000; Nelson et al., 2001). Aufgrund dieser Tatsachen, der Präsenz einer RING-ähnlichen Domäne in PIAS, der Interaktion von PIAS mit p53 und der Homologie von PIAS zu Siz-Proteinen, wurde das Potenzial von PIAS, die Sumoylierung von p53 zu induzieren, untersucht.



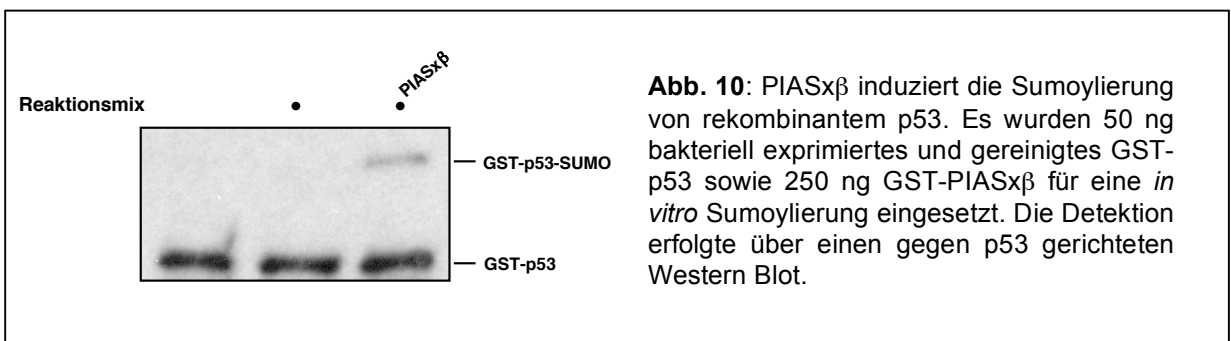
Hierzu wurde p53 analog zu dem oben beschriebenen Experiment mit radioaktivem Methionin markiert und mit dem Reaktionsmix sowie PIAS inkubiert. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung zeigt die Autoradiographie einen drastischen Effekt von PIASx $\beta$  auf die Sumoylierung von p53 (Abb. 9). Nach Zugabe des Reaktionsmixes unterliegt p53 wie erwartet einer leichten Sumoylierung. Die Zugabe von PIASx $\beta$  induziert die Sumoylierung dosisabhängig. In hohen Konzentrationen von PIAS taucht ein zusätzliche höhermolekulare Bande auf, die wie bei der Anwesenheit von Topors entweder aus der Entstehung von SUMO-SUMO-Ketten an der bereits bekannten



Hauptmodifikationsstelle Lysin K386 oder aus der Konjugation an einer anderen, bisher nicht identifizierten Akzeptorstelle resultieren kann (s. u.).



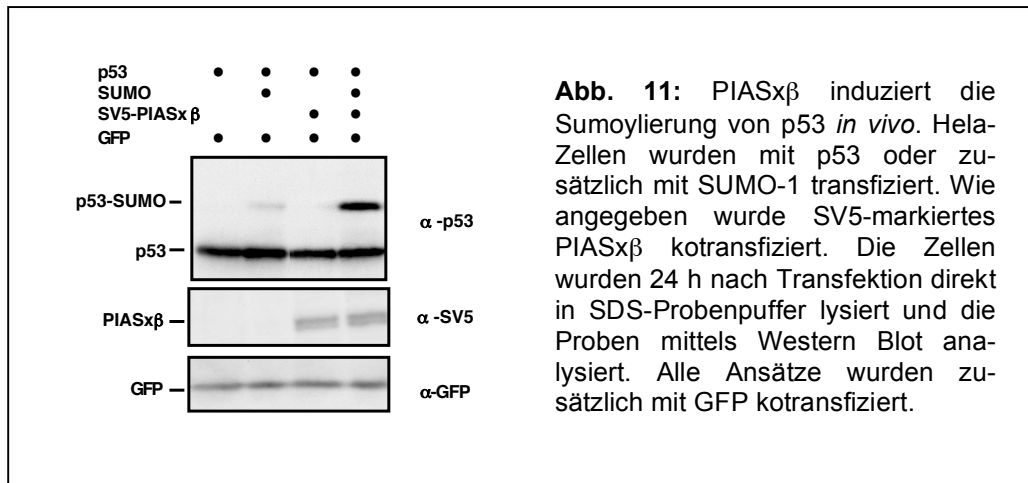
Das Experiment in Abb. 9 wurde mit *in vitro* translatiertem p53 durchgeführt. Ein Problem bei diesem System besteht in der unvermeidlichen Anwesenheit von Retikulozytenlysat in den Reaktionen, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass PIAS-Proteine im Retikulozytenlysat in geringen Mengen für die Modifikation nötig sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Reaktionen mit rekombinantem, in *E. coli* BL21 exprimiertem und gereinigtem GST-p53 durchgeführt. Abb. 10 zeigt, dass auch in diesem vollständig rekombinanten Modifikationssystem PIASx $\beta$  die Sumoylierung von p53 stimuliert. Damit scheint zumindest *in vitro* kein weiterer Faktor für die Sumoylierung nötig zu sein. Interessanterweise ist in diesem vollständig rekombinanten System Ubc9 alleine nicht in der Lage Sumoylierung zu vermitteln (Spur 2). Somit ist denkbar, dass die Anwesenheit von PIAS-Proteinen im Retikulozytenlysat für die Basalsumoylierung in Abb. 9 verantwortlich ist.



Obige *in vitro*-Ergebnisse implizieren eine Ligaseaktivität von PIASx $\beta$  für p53. Um einen Einfluss von PIAS auf die Sumoylierung von p53 *in vivo* nachzuweisen, wurde p53 zusammen mit einer Version von SUMO, die nach dem Doppelglyzinmotiv am C-Terminus endet und so die prozessierte Form von SUMO imitiert (SUMO-GG), und einer SV5-markierten Version von PIASx $\beta$  in Hela-Zellen exprimiert und nach direkter Zellyse in SDS-Probenpuffer mit anschließender Gelelektrophorese in einem gegen p53

gerichteten Western Blot auf SUMO-Konjugation analysiert. Bei Koexpression von SUMO erfolgt eine sehr ineffiziente Modifikation, repräsentiert durch eine schwache, höhermolekulare Bande (Abb. 11 oben, Spur 2). Bei zusätzlicher Expression von PIASx $\beta$  wird die Sumoylierung von p53 deutlich induziert (Spur 4).

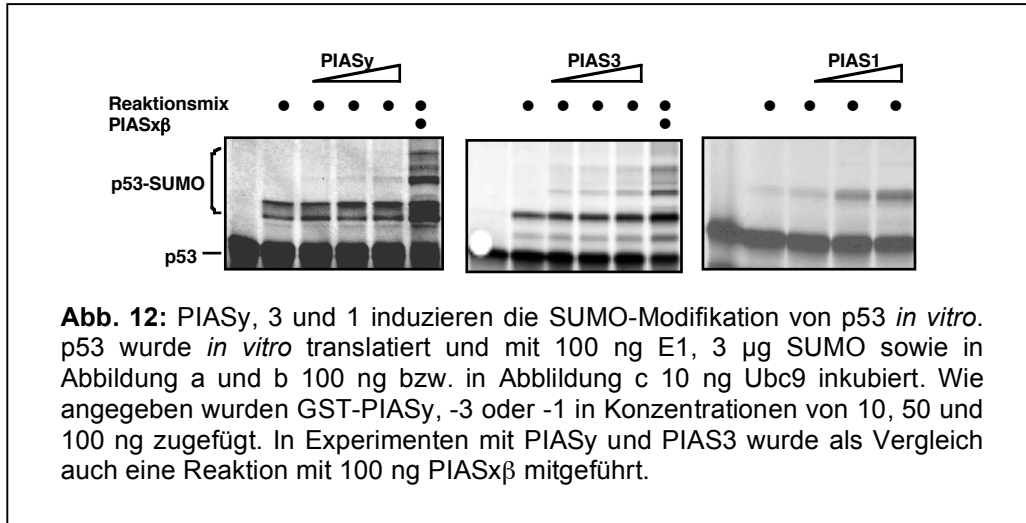
Die Expression von PIASx $\beta$  wurde in einem gegen das SV5-Epitop gerichteten Western Blot gezeigt (Mitte), ein Western Blot gegen kotransfiziertes GFP bestätigt eine gleichmäßige Transfektionseffizienz (unten).



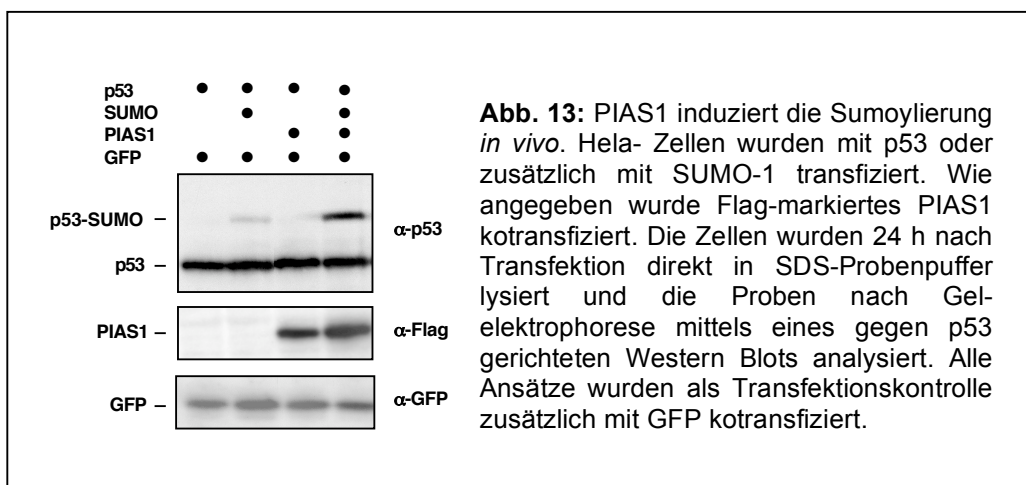
## Spezifität der einzelnen PIAS-Formen bei der Sumoylierung von p53

Neben PIASx $\beta$  wurden auch PIAS1 und PIASy als Interaktoren von p53 beschrieben. Um eine Ligaseaktivität dieser PIAS-Formen und eventuelle Spezifitätsunterschiede zwischen den verschiedenen PIAS-Formen zu untersuchen, wurden GST-fusionierte Versionen von PIASy, PIAS3 und PIAS1 in *E. coli* BL21 exprimiert, mit Glutathion-Sepharose affinitätsgereinigt und in einem *in vitro*-Experiment auf ihr Potenzial, die Sumoylierung zu induzieren, getestet. Abb. 12 zeigt, dass alle drei Formen von PIAS die Sumoylierung von p53 dosisabhängig *in vitro* verstärken. Das Experiment mit PIAS1 (c) wurde mit einer niedrigeren Konzentration an Ubc9 durchgeführt, so dass hier bei einer relativ schwachen Basalsumoylierung (Spur 2) PIAS1 die Modifikation ähnlich wie PIASx $\beta$  drastisch stimuliert (s. Abb. 9). Für die Experimente mit PIASy (a) und PIAS3 (b) wurde eine höhere Konzentration an Ubc9 benutzt, was zu einer relativ hohen Basalsumoylierung und damit nur noch zu einer moderaten Induktion der Monosumoylierung durch PIAS führt. Bei hohen Konzentrationen von Ubc9 scheint die Modifikation mit einem SUMO-Molekül gesättigt zu sein. Sowohl PIAS3 als auch PIASy induzieren jedoch die Konjugation einer zweiten SUMO-Einheit. Unterschiede in der Ligaseaktivität können in diesem Experiment auch auf Schwankungen der jeweiligen Proteinpräparation beruhen. Zusammenfassend kann man jedoch aus diesen Experimenten schließen, dass zumindest *in vitro* keine generellen Unterschiede zwischen einzelnen PIAS-Formen existieren.

## Ergebnisse

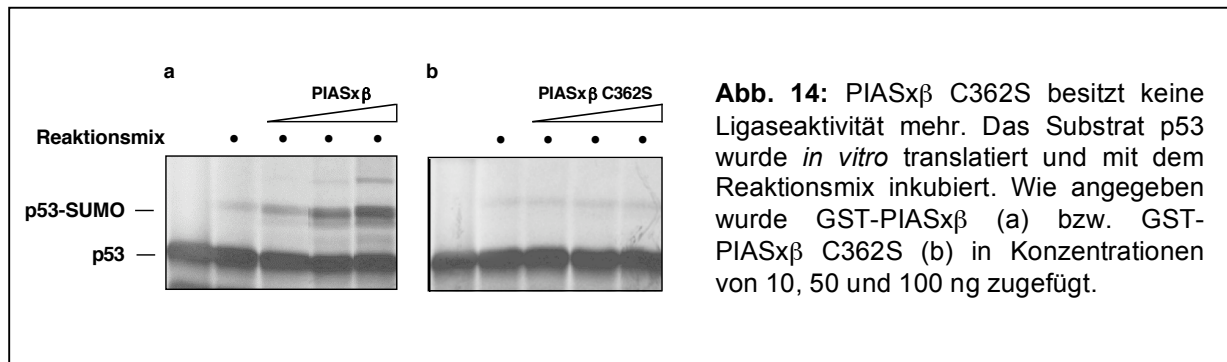


Um die Spezifität verschiedener PIAS-Formen *in vivo* zu testen wurden Transfektionsexperimente in HeLa-Zellen durchgeführt. Hierzu wurde eine Flag-markierte Version von PIAS1, PIAS3 oder PIASy mit p53 und SUMO kotransfiziert und die Modifikation nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einem gegen p53 gerichteten Western Blot nachgewiesen. Abb. 13 zeigt eine drastische Induktion der Sumoylierung von p53 bei Expression von PIAS1 (Spur 4), verglichen mit der geringen Sumoylierung bei Expression von nur SUMO. In einem gegen das Flag-Epitop gerichteten Western Blot wurde die Expression von PIAS1 nachgewiesen (Mitte), eine gleichmäßige Transfektionseffizienz wird in einem Western Blot gegen kotransfiziertes GFP bestätigt (unten). Ähnliche Ergebnisse gaben Experimente *in vivo* mit PIAS3 und PIASy (Daten nicht gezeigt).



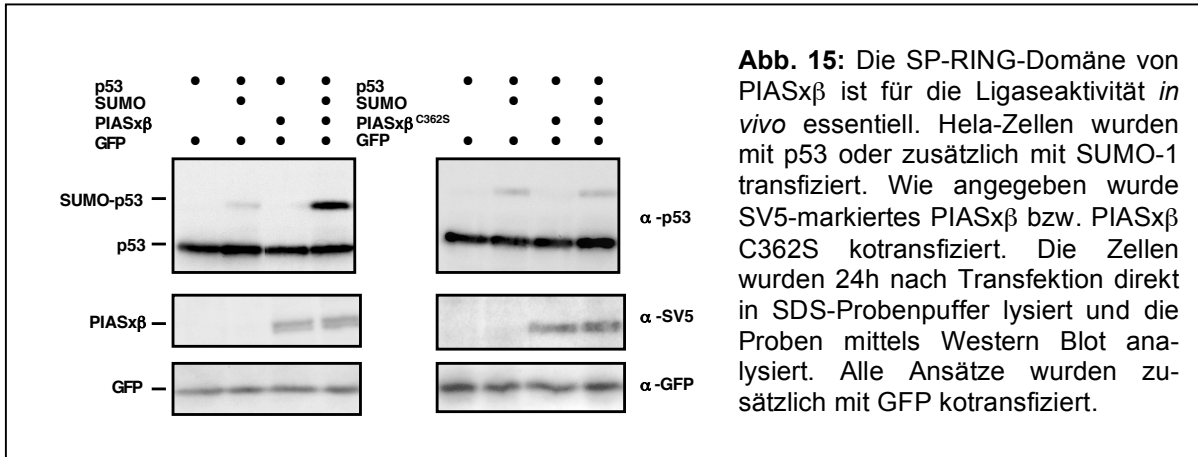
## Die Rolle von SP-RING- und SAP-Domäne bei der PIAS-abhängigen Sumoylierung von p53

Für die Aktivität von Ubiquitin-Ligasen ist die RING-Finger-Domäne essentiell. Obwohl der SP-RING-Struktur von PIAS-Proteinen zwei konservierte Cysteine fehlen, könnte sie dennoch eine ähnliche dreidimensionale Struktur einnehmen und mechanistisch analog zu den klassischen RING-Domänen als Adapterdomäne dienen, über die Ubc9 zum Substrat rekrutiert wird. Um die Rolle der SP-RING-Domäne von PIAS $\beta$  zu untersuchen wurde das sich in dieser Domäne befindliche konservierte Cystein C362 zu einem Serin mutiert. Basierend auf der putativen strukturellen Ähnlichkeit der klassischen RING-Finger-Domäne von RING-Ubiquitin-Ligasen sollte diese Mutation die strukturelle Integrität der SP-RING-Domäne zerstören. Das *in vitro*-Experiment in Abb. 14 zeigt, dass eine intakte RING-Finger-Domäne für die Ligaseaktivität essentiell ist, da PIAS $\beta$  C362S im Gegensatz zum Wildtyp (a), nicht mehr in der Lage ist, die Sumoylierung von p53 zu verstärken (b).

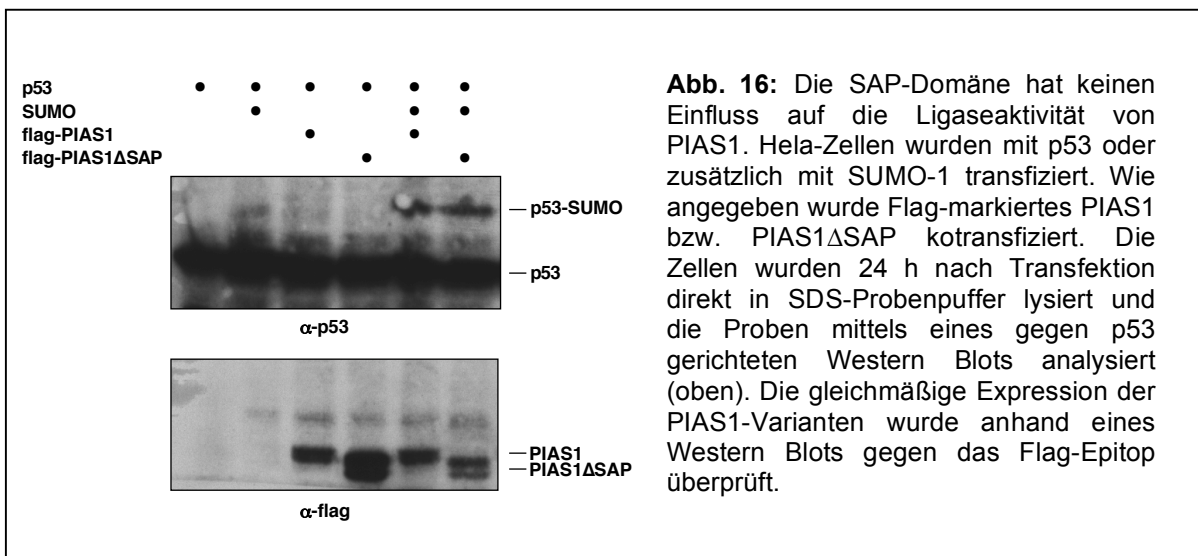


Die Ligaseaktivität von PIAS $\beta$  C362S wurde zusätzlich *in vivo* bestimmt. In Abb. 15 wurden Hela-Zellen mit p53, SUMO und einer SV5-markierten Version von PIAS $\beta$  bzw. PIAS $\beta$  C362S transfiziert und die SUMO-Modifikation nach gelelektrophoretischer Separation im Western Blot mittels eines gegen das SV5-Epitop gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Übereinstimmend mit den *in vitro*-Daten wird auch *in vivo* eine intakte RING-Finger-Domäne benötigt, um die Sumoylierung von p53 zu induzieren. Während der Wildtyp von PIAS $\beta$  die erwartete Stimulierung der Sumoylierung von p53 induziert (links), zerstört die Mutation des Cysteins C362 innerhalb der RING-Domäne zu einem Serin die Ligaseaktivität (rechts).

## Ergebnisse

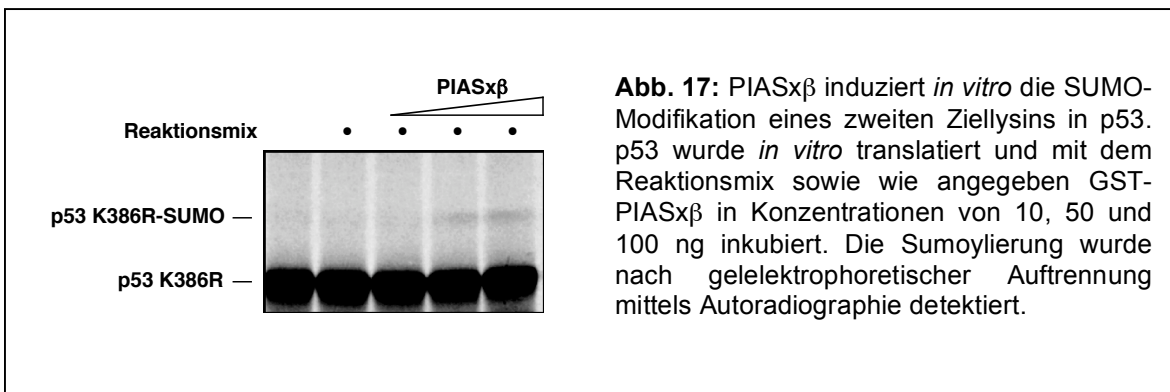


Neben der SP-RING-Domäne, die für die Ligaseaktivität essentiell ist (Abb. 14 und 15), besitzen PIAS-Proteine als strukturelles Charakteristikum eine N-terminal gelegene SAP-Domäne, die sich in verschiedenen Proteinen findet, die in die Chromatinorganisation involviert sind. In Abb. 16 ist zu sehen, dass diese Domäne für die PIAS-induzierte Sumoylierung von p53 entbehrlich ist. Die SAP-Domäne einer Flag-markierten Version von PIAS1 wurde deletiert (PIAS1 $\Delta$ SAP) und die Mutante sowie der Wildtyp zusammen mit p53 und SUMO in HeLa-Zellen transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Sumoylierung anhand eines gegen p53 gerichteten Western Blots analysiert. PIAS1 $\Delta$ SAP ist mit ähnlicher Effizienz wie der Wildtyp in der Lage, die Sumoylierung von p53 zu stimulieren. Im unteren Teil der Abbildung wurde in einem gegen das Flag-Epitop gerichteten Western Blot eine adäquate Expression der PIAS1-Versionen überprüft.



## PIAS induziert die Sumoylierung einer zweiten Akzeptorstelle in p53

Bisher war als Modifikationsstelle in p53 nur das Lysin K386 bekannt. Zur Klärung der Frage, ob die zweifach sumoylierten Formen von p53 (Abb. 9) aus der multiplen Modifikation an der Hauptsumoylierungsstelle K386 resultieren oder ob PIAS die Modifikation eines anderen Aminosäurerests in p53 induziert, wurde die Mutante p53 K386R auf eine eventuelle Modifikation getestet (Abb. 17). Ohne die Zugabe von PIAS ist bei dieser Mutante in diesem System keine Sumoylierung mehr zu detektieren (zweite Spur). Bei höheren PIAS-Konzentrationen ist jedoch eine schwache SUMO-Modifikation sichtbar (Spur 4 und 5). PIAS scheint also neben der SUMO-Konjugation an Lysin K386 zusätzlich die Konjugation an einem weiteren Lysin zu induzieren.



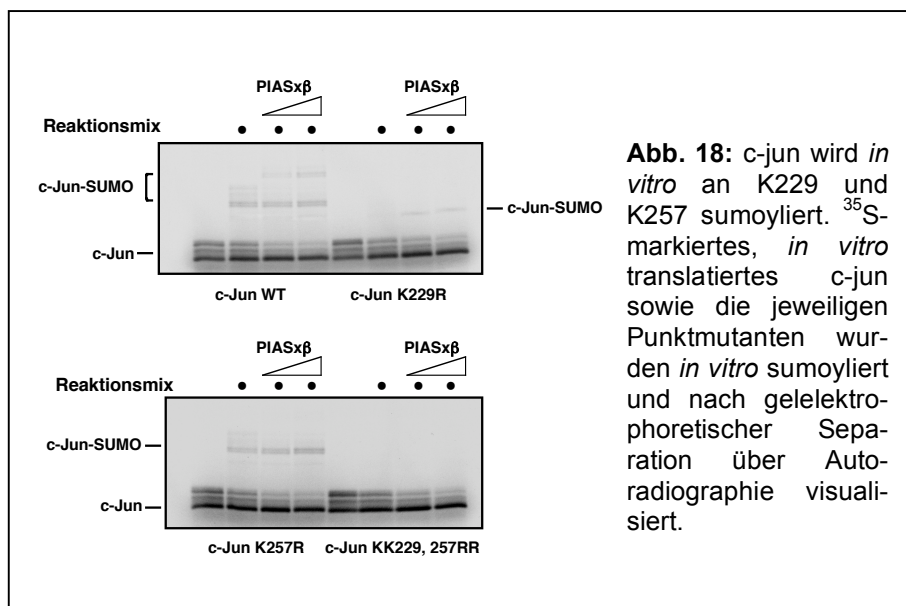
## Substratspezifität von PIAS-Proteinen

Um die Substratspezifität von PIAS-Proteinen zu untersuchen, wurden neben p53 weitere bekannte SUMO-Substratproteine als potenzielle PIAS-abhängige Substrate untersucht.

Der als Protoonkogen fungierende Transkriptionsfaktor c-jun war bereits als SUMO-Substrat bekannt. Als Hauptkonjugationsstelle wurde hierbei das Lysin K229 identifiziert (Muller et al., 2000). Ein möglicher Einfluss von PIAS auf die Sumoylierung von c-Jun wurde in einem *in vitro*-Modifikationsexperiment untersucht (Abb. 18). Hierzu wurde c-Jun *in vitro* translatiert und in An- oder Abwesenheit von PIASx $\beta$  einer *in vitro*-Sumoylierung unterzogen. Neben dem Wildtyp-Protein wurde auch die Sumoylierung der Einzelmutanten K229R und K257R sowie der Doppelmutante KK229, 257RR untersucht. K257 liegt in einer weiteren  $\psi$ KxE-Konsensussequenz und kommt somit als potenzielle zweite Sumoylierungsstelle in Betracht. Die Anwesenheit von PIAS zeigt beim Wildtyp keine signifikante Induktion der monosumoylierten Form, jedoch tritt eine zweite Bande höheren Molekulargewichts auf, die die Modifikation mit zwei SUMO-Einheiten repräsentiert, d. h. PIAS induziert auch hier die Modifikation mit einem weiteren SUMO-Molekül. Übereinstimmend hiermit unterliegt eine Version von c-jun, die in der Hauptsumoylierungsstelle K229 mutiert ist, nur noch einer schwachen Modifikation mit SUMO, die nur in Anwesenheit von PIAS zu detektieren ist. Die an dieser Nebenstelle SUMO-modifizierte Version von c-jun zeigt im Gel ein anderes



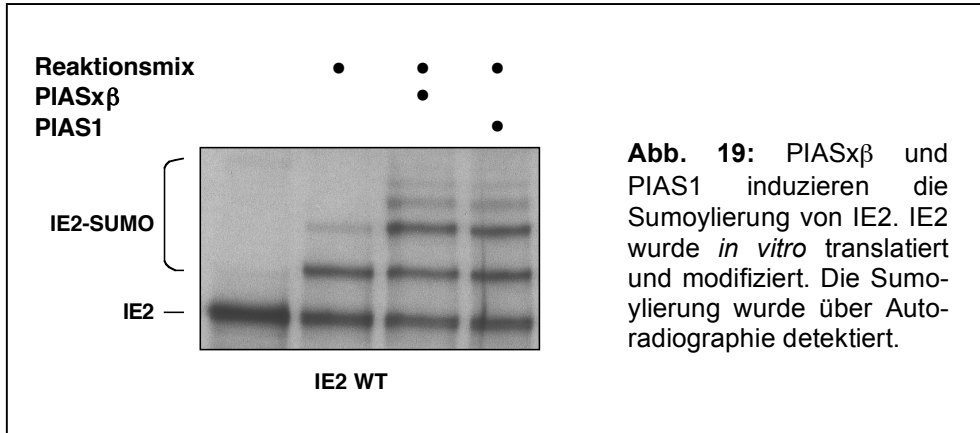
Migrationsverhalten als die an K229 modifizierte Form. Eine Mutante, die in der zweiten SUMO-Konsensusstelle in c-jun, K257, eine Mutation trägt, weist nur noch eine prominente Bande, die die Sumoylierung der Hauptstelle K229 darstellt und nur mäßig durch PIAS induziert wird, auf; die zweite Bande, die im Wildtyp erscheint, ist jedoch nicht mehr sichtbar. Eine Doppelmutante, die sowohl eine Mutation in der Hauptkonjugationsstelle K229 als auch in der putativen Nebenkonzugationsstelle K257 trägt, wird erwartungsgemäß überhaupt nicht mehr sumoyliert. Somit scheint PIAS präferentiell die Sumoylierung an Lysin K257 zu stimulieren. Dass die Position der Modifikation einen Einfluss auf das Laufverhalten hat, wurde bereits für andere Substrate beobachtet und lässt sich vermutlich auf strukturelle Unterschiede, die auch unter denaturierenden Bedingungen noch eine Rolle spielen, zurückführen.



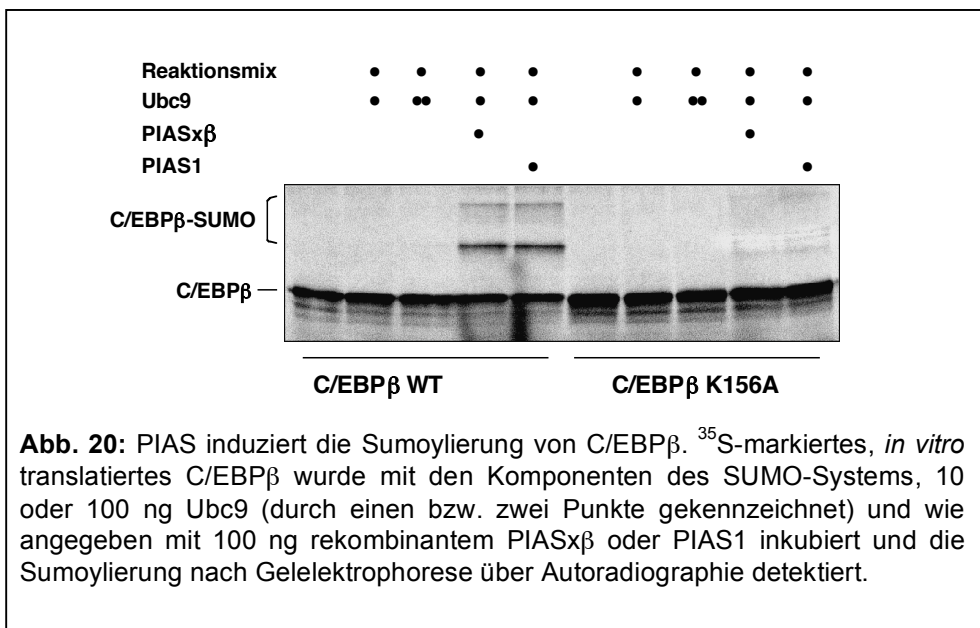
**Abb. 18:** c-jun wird *in vitro* an K229 und K257 sumoyliert.  $^{35}\text{S}$ -markiertes, *in vitro* translatiertes c-jun sowie die jeweiligen Punktmutanten wurden *in vitro* sumoyliert und nach gelelektrophoretischer Separation über Autoradiographie visualisiert.

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Stamminger wurde der Einfluss von PIAS auf die Sumoylierung des CMV-Proteins IE2 untersucht. Das IE2-Protein wurde bereits früher als Zielprotein von SUMO beschrieben (Hofmann et al., 2000). Darüber hinaus konnte die Gruppe um Stamminger in einem Two-Hybrid-Interaktionsscreen in *S. cerevisiae* Mitglieder der PIAS-Protein-Familie als Bindungspartner von IE2 identifizieren. Somit war IE2 ein interessanter Kandidat zur Untersuchung einer PIAS-abhängigen Sumoylierung. In einem *in vitro*-Modifikationsexperiment wird IE2 in Abwesenheit von PIAS an zwei Stellen modifiziert (Abb. 19, Spur 2). Auch im Falle von IE2 stimuliert PIAS präferentiell die Entstehung der zweifach und dreifach modifizierten Form (Abb. 19, Spur 3 und 4). Das Auftreten weiterer Banden könnte auch hier entweder ein Hinweis auf Kettenbildung an den identifizierten Akzeptorstellen K175 oder K180 sein oder aus der Benutzung alternativer Lysinreste resultieren.

## Ergebnisse

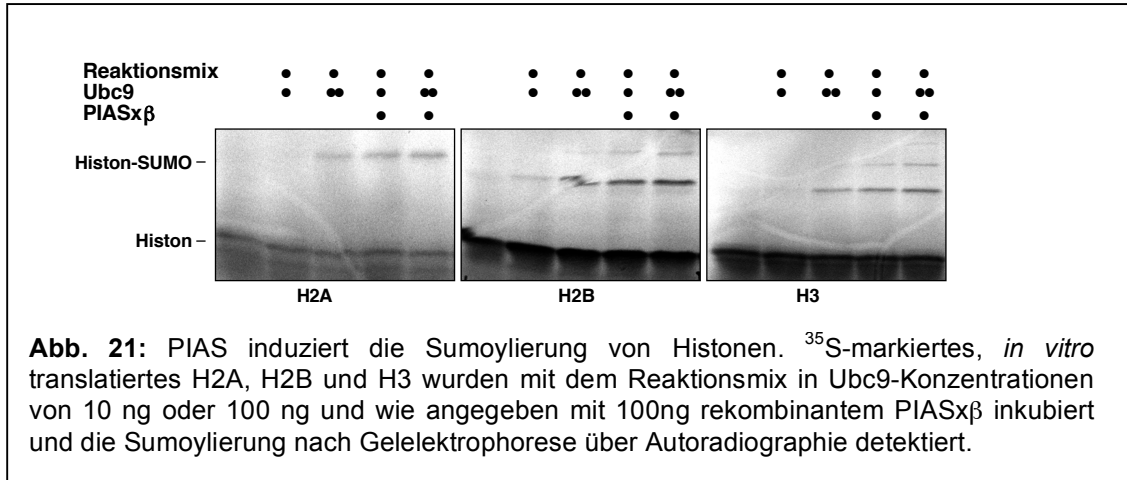


In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Leutz wurde die Sumoylierung des Transkriptionsfaktors C/EBPβ getestet. Ausgangspunkt dieser Arbeiten waren ebenfalls die Ergebnisse eines Two-Hybrid-Interaktionsscreens, bei dem PIAS als Interaktor von C/EBPβ identifiziert wurde. Abb. 20 zeigt die PIAS-abhängige Sumoylierung von C/EBPβ. Auch unter hohen Konzentrationen von Ubc9 (Spur 3) wird C/EBPβ nicht sumoyliert. Nach Zugabe von PIASxβ oder PIAS1 tauchen zwei höhermolekulare Banden auf, die die Modifikation mit einem bzw. zwei SUMO-Molekülen repräsentieren. C/EBPβ scheint also wie p53, c-jun und IE2 neben einer Hauptmodifikationsstelle noch eine weniger benutzte Modifikationsstelle zu besitzen. In einer Mutante, die im Lysin K156 eine Mutation zum Alanin trägt, ist nur noch eine schwache Bande zu sehen (Spur 9 und 10), die aus der Modifikation der Nebenstelle resultiert, während das Lysin K156 die Hauptmodifikationsstelle zu sein scheint und daher die prominente Bande nicht mehr auftaucht.

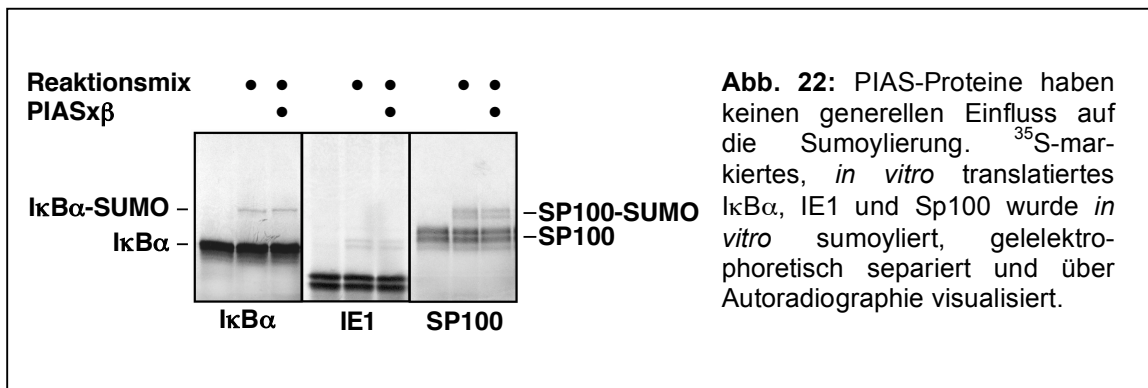




Ferner wurden die Histone H2A, H2B und H3 als PIAS-sensitive SUMO-Substrate identifiziert. In Abb. 21 sind *in vitro*-Experimente mit verschiedenen Konzentrationen an Ubc9 gezeigt. PIASx $\beta$  hat nur in Anwesenheit geringer Mengen Ubc9 einen stimulierenden Effekt auf die Monosumoylierung von Histon H2A, H2B und H3. Bei höheren Konzentrationen ist hier keine Steigerung durch die Zugabe von PIASx $\beta$  mehr zu beobachten (vgl. jeweils Spur 3 und 5). Im Fall von Histon H2B induziert PIAS jedoch auch in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Ubc9 die Modifikation mit einem, im Fall von Histon H3 sogar mit zwei weiteren SUMO-Molekülen (vgl. b und c, jeweils Spur 3-5)

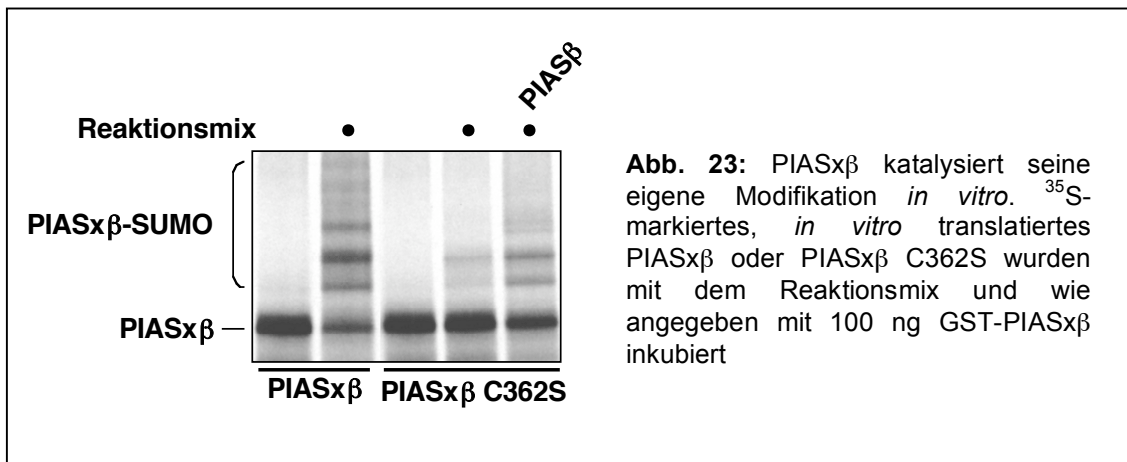


Die obigen Daten sowie Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass PIAS-Proteine im Gegensatz zu Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs deutlich weniger substratspezifisch sind. Abb. 22 zeigt jedoch, dass PIAS-Proteine keine generellen stimulierenden Faktoren im SUMO-System sind. Auf die Sumoylierung des Inhibitors des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , des CMV-Proteins IE1 sowie Sp100, eine Komponente von PML-Foci, nimmt PIAS keinen Einfluss.

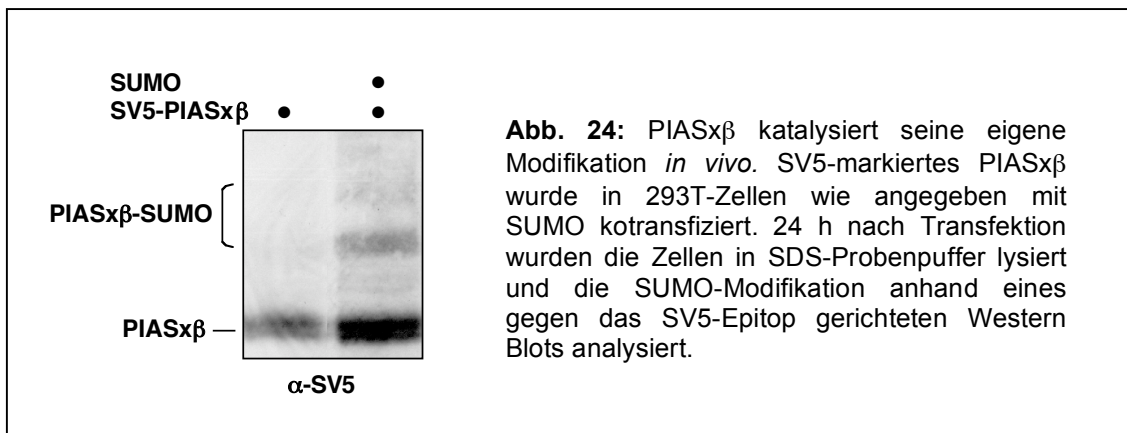


## Automodifikation von PIAS

Eine Eigenschaft von Ubiquitin-E3-Ligasen des RING-Typs ist ihre Autoubiquitinierung. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu PIAS-Proteinen wurden diese auf ihre Fähigkeit, sich selbst in Abwesenheit anderer Substrate zu modifizieren, untersucht. Abb. 23 zeigt ein *in vitro*-Experiment mit PIASx $\beta$  als Substrat. Die höhermolekularen Banden indizieren eine starke Selbstmodifikation mit SUMO. Die sumoylierungsdefiziente Mutante PIASx $\beta$  C362S zeigt auch hier kaum mehr Aktivität, kann jedoch nach Zugabe von exogenem, rekombinantem Wildtyp-PIASx $\beta$  zumindest wieder moderat sumoyliert werden.

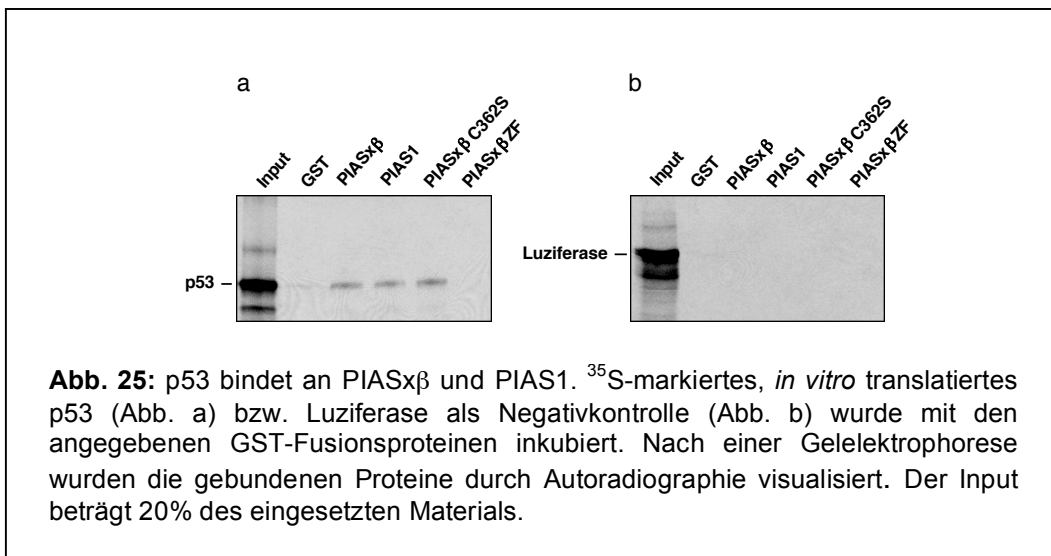


Um die *in vivo*-Relevanz der Automodifikation zu untersuchen, wurde ein Experiment in Hela-Zellen durchgeführt. Hierzu wurde SV5-markiertes PIASx $\beta$  zusammen mit SUMO transfiziert und die Sumoylierung von PIASx $\beta$  anhand eines gegen das SV5-Epitop gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Abb. 24 zeigt, dass die Koexpression von SUMO die SUMO-modifizierte Form von PIASx $\beta$  induziert.

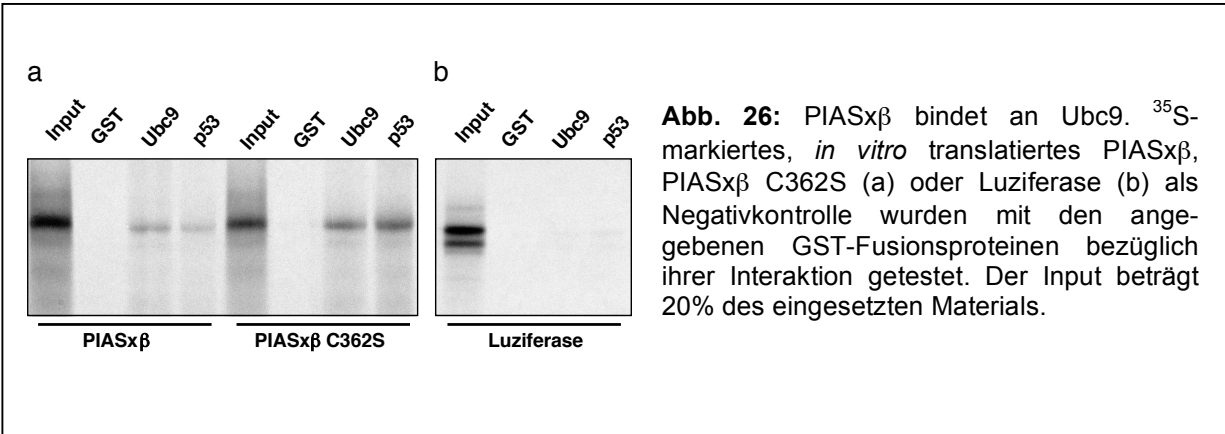


## Interaktion von PIAS mit p53 und Ubc9

Monomere Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs fungieren als Adapter, die Ubc's an ihre Substrate rekrutieren. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs wurde die Bindung von PIAS-Proteinen mit p53 und mit Ubc9 untersucht. Die Interaktion von p53 mit PIAS wurde in einem GST-Pulldown mit an GST fusioniertem und an Sepharose gekoppeltem PIASx $\beta$  bzw. PIAS1 und *in vitro* translatiertem,  $^{35}\text{S}$ -markiertem p53 getestet. (Abb. 25a). In Übereinstimmung mit den bereits publizierten Interaktionsstudien im Two-Hybrid-System der Hefe konnte eine Bindung von p53 an GST-PIASx $\beta$  und GST-PIAS1 gezeigt werden (Spur 3 und 4), während mit GST beladene Glutathion-Sepharose, die als Spezifitätskontrolle benutzt wurde (Spur 2), ebenso wie das mit GST fusionierte Zinkfingerfragment von PIASx $\beta$  nicht mit p53 interagieren (Spur 6). Die Punktmutante PIASx $\beta$  C362S, die keine Sumoylierungsaktivität mehr aufweist, verhält sich bezüglich der Interaktion mit dem Substrat wie der Wildtyp (Spur 5); der Verlust der Sumoylierungsaktivität beruht also nicht auf einer fehlenden Interaktion. Als Negativkontrolle für die Spezifität diente Luziferase (Abb. 25b), die nicht mit GST-PIAS interagiert. Die Interaktion von PIAS mit seinem Substrat p53 ist relativ schwach, was eventuell auf eine transiente Interaktion hindeutet.



Analog zur Interaktion von PIAS mit p53 wurde seine Interaktion mit Ubc9 in einem GST-Pulldown getestet. An GST fusioniertes und auf Glutathion-Sepharose geladenes Ubc9 interagiert mit *in vitro* translatiertem PIASx $\beta$ , während GST alleine als Negativkontrolle nicht an PIAS bindet (Abb. 26a, Spur 3 und 2). Bei Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs bindet meist die RING-Domäne an die entsprechenden E2-Enzyme. Die Mutante PIASx $\beta$  C362S, die eine zerstörte RING-Domäne besitzt, weist jedoch kein verändertes Bindungsverhalten im Vergleich mit dem Wildtyp auf (Spur 7). Als Positivkontrolle diente an Glutathion-Sepharose gekoppeltes GST-p53 (Spur 4 und 8), als Negativkontrolle wieder Luziferase (Abb. 26b).



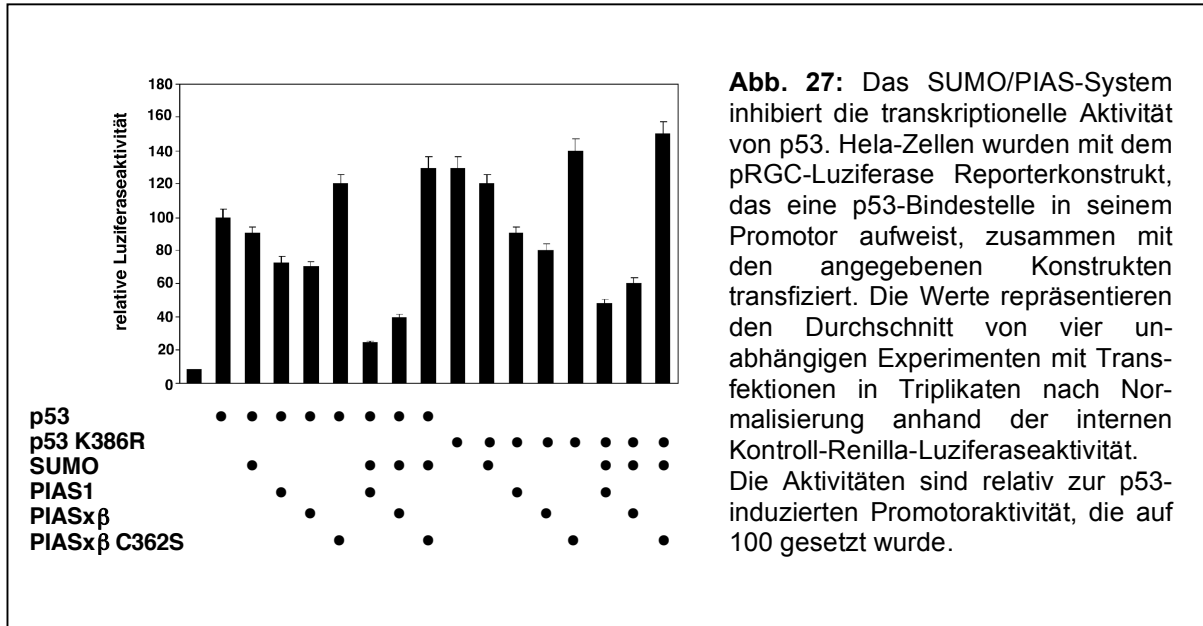
**Abb. 26:** PIASxβ bindet an Ubc9. <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro* translatiertes PIASxβ, PIASxβ C362S (a) oder Luciferase (b) als Negativkontrolle wurden mit den angegebenen GST-Fusionsproteinen bezüglich ihrer Interaktion getestet. Der Input beträgt 20% des eingesetzten Materials.

## Das SUMO/PIAS-System als Inhibitoren der p53-abhängige Transkription

Die obigen *in vitro*- und *in vivo*-Experimente belegen eine Schlüsselrolle von PIAS bei der SUMO-Modifikation von p53. Um die funktionelle Konsequenz der Sumoylierung von p53 zu verstehen und die Bedeutung von PIAS-Proteinen bei der Regulation der p53-Aktivität zu untersuchen wurden Reporterexperimente durchgeführt, bei denen der Einfluss des SUMO/PIAS-Systems auf die transkriptionelle Aktivität von p53 untersucht wurde.

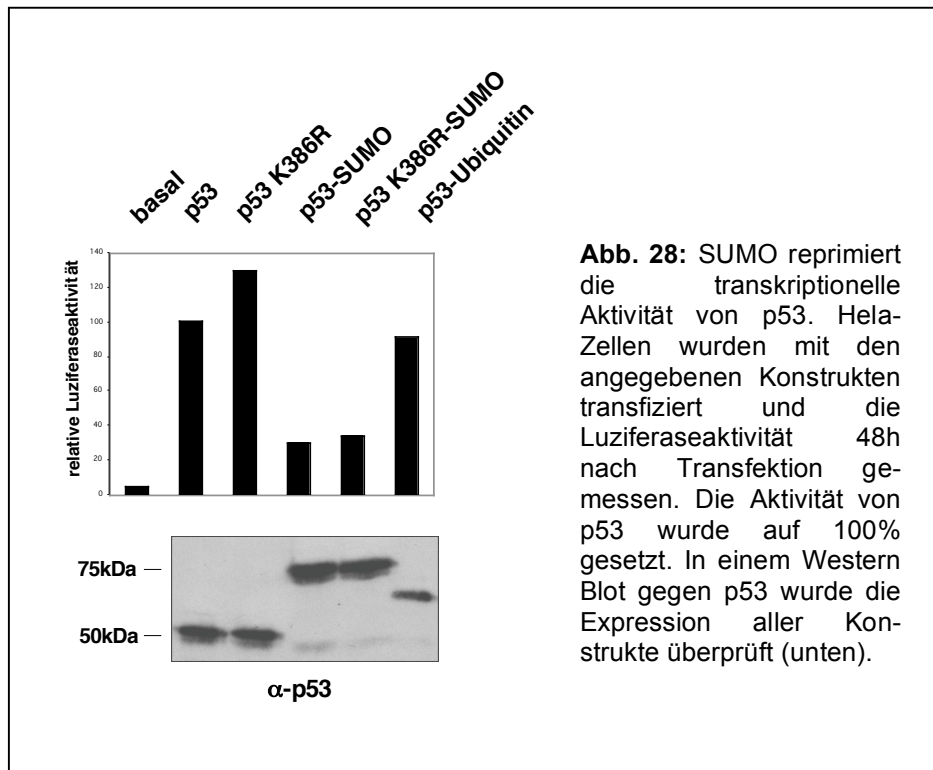
Hierzu wurde ein Luziferasereporter, das eine synthetische Bindungsstelle für p53 in seinem Promotor besitzt, alleine oder in Kombination mit p53, p53/SUMO, p53/PIAS oder p53/SUMO/PIAS in Hela-Zellen transfiziert (Abb. 27). Die Expression von p53 induziert die Luziferase-Aktivität um den Faktor 10. Die Koexpression von SUMO hat einen leicht inhibierenden Einfluss auf die Aktivität, während die Überexpression von PIASxβ oder PIAS1 die Aktivität moderat inhibiert. Diese Inhibition wird durch die zusätzliche Expression von SUMO deutlich verstärkt. Die Expression der Mutante PIASxβ C362S hingegen erhöht die Aktivierung von p53 geringfügig, d. h. die Ligaseaktivität wird für die Repression benötigt. Nachdem p53 unter den gewählten experimentellen Bedingungen stark sumoyliert ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Repression der Transaktivierung eine Folge der SUMO-Modifikation ist. Um dies zu klären, wurde ein analoges Experiment mit der in der Hauptkonjugationsstelle nicht mehr modifizierbaren Mutante p53 K386R durchgeführt. Übereinstimmend mit publizierten Daten zeigt diese Mutante eine geringfügig höhere Basalaktivität als der Wildtyp. Unerwarteterweise reprimiert die Koexpression von SUMO und PIAS das Transaktivierungspotenzial der Mutante K386R unverändert zum Wildtyp. Die Repression scheint also keine direkte Folge der SUMO-Modifikation an Lysin K386 zu sein. Somit sind drei Szenarien denkbar: Zum einen die PIAS-induzierte Sumoylierung anderer Faktoren, die dann indirekt die Inhibition verursachen; zum anderen könnte jedoch auch die in Abb. 9 gezeigte, von PIAS induzierte Sumoylierung alternativer SUMO-Akzeptorstellen für die Repression ausreichend sein; schließlich besteht die Möglichkeit, dass die Repression auf der gefundenen Autosumoylierung von PIAS beruht (s. Abb. 23, 24)

## Ergebnisse



Obige Ergebnisse sprechen zwar einerseits für eine negativ regulatorische Funktion des SUMO/PIAS-Systems auf die Aktivität von p53, andererseits konnten sie nicht beantworten, in wieweit dies direkt aus der Sumoylierung von p53 resultiert. Eine Möglichkeit, den Effekt von SUMO auf die Aktivität eines Transkriptionsfaktors direkt zu untersuchen, ist die lineare Fusion von SUMO an sein Substrat. SUMO wird über einen flexiblen Linker an das Zielgen fusioniert. Hiermit soll über den beweglichen Linker eine an das Substrat konjugierte SUMO-Einheit nachgestellt werden. p53 sollte sich für diese Pseudo-Modifikation eignen, da die Hauptsumoylierungsstelle K386 am äußeren C-Terminus liegt und somit eine C-terminal fusionierte SUMO-Einheit die natürliche Situation zumindest annähernd widerspiegelt. Ein entscheidender Vorteil an diesem experimentellen System ist jedoch, dass man keine Mischpopulationen von sumoyliertem und unsumoyliertem Substrat mit unklarem und in verschiedenen Experimenten u. U. variierendem Verhältnis untersucht, sondern komplett unsumoyliertes mit komplett sumoyliertem Substrat vergleichen kann. Sowohl an Wildtyp-p53 als auch an die in der Hauptkonjugationsstelle K386 mutierte Variante wurde ein SUMO-Molekül fusioniert. Als Kontrolle diente eine Fusion mit Ubiquitin, die eine ähnliche Struktur wie p53-SUMO aufweisen sollte. Diese Konstrukte wurden zusammen mit einem Luziferasereporter gen mit einer synthetischen Bindungsstelle für p53 in seinem Promotor in Hela-Zellen transfiziert und der Einfluss des künstlich fusionierten SUMO-Moleküls auf das Transaktivierungspotenzial von p53 untersucht (Abb. 28). Der Wildtyp induziert wie erwartet die Luziferase-Aktivität. Ebenfalls etabliert ist das leicht erhöhte Transaktivierungspotenzial der in der Hauptstelle nicht mehr sumoylierbaren Mutante p53 K386R von ca. 130%. Beide SUMO-Fusionen hingegen zeigen eine deutlich reduzierte Aktivität von ca. 30%. Die SUMO-Fusion an den Wildtyp inhibiert die Transkription erwartungsgemäß etwas stärker als die Fusion an die K386R-Mutante. Die Ubiquitin-Fusion inhibiert die Transkription im Vergleich mit dem Wildtyp nur geringfügig (95%), was gegen eine generelle Inhibierung der Aktivität von p53 als

Folge struktureller Konsequenzen durch die Fusion spricht. Außerdem zeigen Western Blot- Experimente, dass die Unterschiede nicht aus unterschiedlichen Expressionsniveaus resultieren. So werden die weniger aktiven SUMO-Fusionsproteine sogar geringfügig höher exprimiert als Wildtyp p53, während das Ubiquitin-Fusionsprodukt vermutlich aufgrund einer erhöhten proteasomalen Degradationsrate adäquat zur geringfügigeren Inhibition auch etwas schwächer exprimiert ist. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse für eine inhibitorische Rolle von SUMO, auch wenn zu bedenken ist, dass es sich hier nicht um eine SUMO-Konjugation über eine Isopeptidbindung an die natürliche Akzeptorstelle handelt, sondern um eine lineare Fusion der SUMO-Einheit über eine gewöhnliche Peptidbindung.

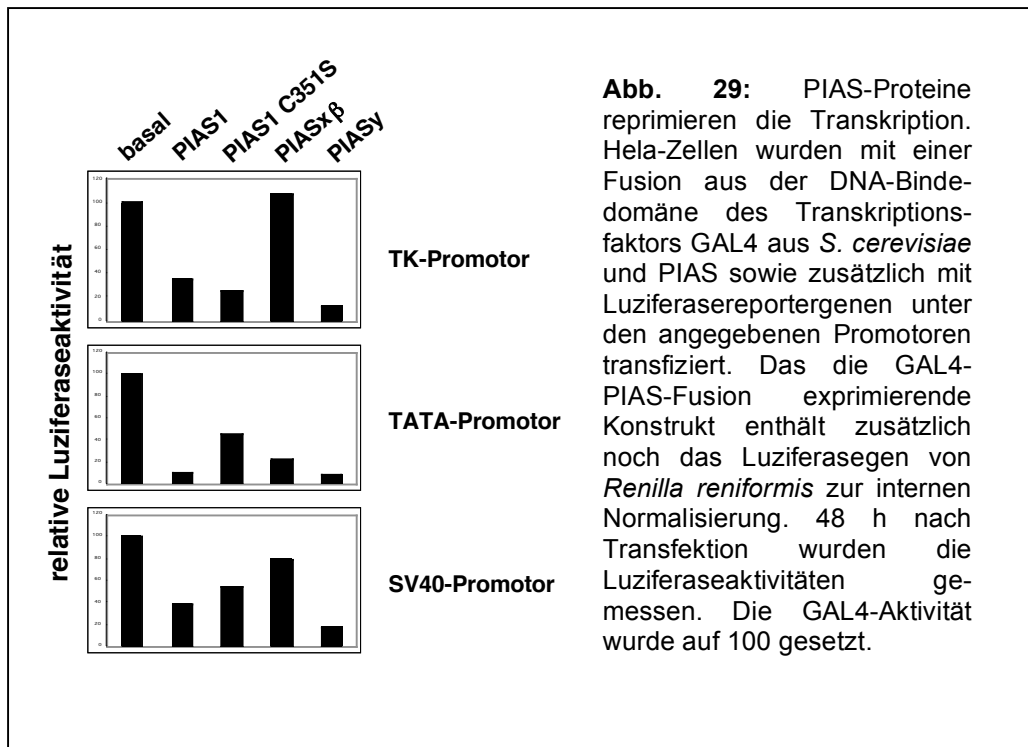


**Abb. 28:** SUMO reprimiert die transkriptionelle Aktivität von p53. Hela-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und die Luciferaseaktivität 48h nach Transfektion gemessen. Die Aktivität von p53 wurde auf 100% gesetzt. In einem Western Blot gegen p53 wurde die Expression aller Konstrukte überprüft (unten).

## PIAS-Proteine als transkriptionelle Koregulatoren

Die Ergebnisse der Repression von p53 durch PIAS unabhängig von der Sumoylierung an Lysin K386 lassen einen generellen repressiven Effekt von PIAS auf die Transkription vermuten. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden die verschiedenen PIAS- Formen mit der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 aus *S. cerevisiae* fusioniert und ihr Einfluss auf die Aktivität eines Luziferasereportergens untersucht, das eine GAL4-Bindungsstelle in der Promotorregion enthält. Es wurden drei verschiedene Reporter gene benutzt, die zusätzlich zur Bindungsstelle GAL4 virale oder zelluläre Promotorsequenzen, wie den Thymidin-Kinase-Promotor, die TATA-Box oder den SV40-Promotor enthalten. 48 h nach

Transfektion wurden die Luziferaseaktivitäten gemessen. Abb. 29 zeigt, dass die Expression von Proteinen der PIAS-Familie die Transkription von allen drei getesteten Promotoren signifikant inhibiert. So wird der TK-Promotor durch die Expression von PIAS1 oder PIASy ca. um den Faktor drei bzw. fünf reprimiert, PIASx $\beta$  dagegen zeigt keine Änderung in der transkriptionellen Aktivität an diesem Promotor. Die Mutante PIAS1 C351S, die keine Ligaseaktivität mehr besitzt, reprimiert die Transkription an diesem Promotor unverändert zu PIAS1, die Ligaseaktivität scheint bei der Repression also keine essentielle Rolle zu spielen. Bei Verwendung des TATA-Promotors reprimieren PIAS1, PIASx $\beta$  sowie PIASy die transkriptionelle Aktivität ca. um den Faktor fünf, die Mutante PIAS1 C351S hingegen nur um den Faktor zwei. Im Fall des SV40-Promotors fällt die Repression geringer aus: PIAS1 und PIAS1 C351S reprimieren ca. um den Faktor zwei, während PIASx $\beta$  nur noch sehr schwach reprimiert. Eine Ausnahme bei diesem Promotor bildet PIASy mit einer Repression um den Faktor fünf. Zusammengefasst werden der TK- und der TATA-Promotor relativ stark, der SV40-Promotor hingegen nur moderat reprimiert. Dies deutet auf eine Promotorspezifität bei der transkriptionellen Repression durch PIAS-Proteine hin. Die Ergebnisse zeigen Durchschnittswerte aus fünf unabhängigen Experimenten.

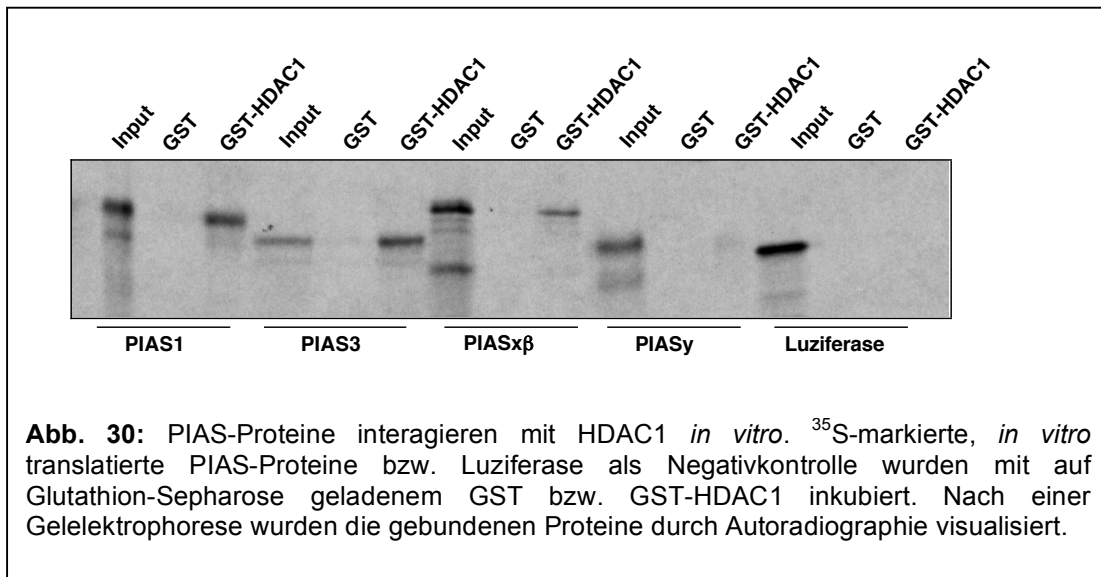


**Abb. 29:** PIAS-Proteine reprimieren die Transkription. Hela-Zellen wurden mit einer Fusion aus der DNA-Binde-domäne des Transkriptionsfaktors GAL4 aus *S. cerevisiae* und PIAS sowie zusätzlich mit Luziferasereportergenen unter den angegebenen Promotoren transfiziert. Das die GAL4-PIAS-Fusion exprimierende Konstrukt enthält zusätzlich noch das Luziferasegen von *Renilla reniformis* zur internen Normalisierung. 48 h nach Transfektion wurden die Luziferaseaktivitäten gemessen. Die GAL4-Aktivität wurde auf 100 gesetzt.

Zusammengefasst belegen diese Experimente, dass alle Mitglieder der PIAS-Familie abhängig vom jeweiligen Promotor als transkriptionelle Inhibitoren fungieren.



Die Repression durch transkriptionelle Koregulatoren wird häufig über eine Rekrutierung von Histonmodifizierenden Enzymen wie HDAC's vermittelt. Ein Mechanismus für die repressorischen Eigenschaften von PIAS könnte somit eine HDAC-vermittelte Inhibition der Transkription sein. Eine mögliche Interaktion beider Proteine wurde in einem GST-Pulldown-Experiment mit  $^{35}\text{S}$ -markiertem, *in vitro* translatiertem PIAS1, 3,  $\alpha\beta$  und  $\gamma$  sowie bakteriell exprimiertem und gereinigtem, auf Glutathion-Sepharose geladenem HDAC1 getestet. In Abb. 30 ist zu sehen, dass alle PIAS-Formen mit HDAC1 zumindest *in vitro* interagieren. Die in obigen Experimenten beobachtete transkriptionelle Repression könnte daher aus der Interaktion von PIAS mit HDAC-1 resultieren.



## Biochemische Identifikation neuer Interaktionspartner von PIAS-Proteinen

Zur weiteren Charakterisierung von PIAS-Proteinen sollte in dieser Arbeit versucht werden, neue zelluläre Bindungspartner von PIAS zu isolieren und zu identifizieren. Hierzu wurde ein biochemischer Ansatz gewählt, bei dem Flag-markierte Formen von PIAS $\gamma$  und PIAS $\alpha\beta$  in 293T-Zellen in präparativem Maßstab transient transfiziert und anschließend mittels einer Flag-Reinigung unter nativen Bedingungen aufgereinigt wurden. Unter diesen Bedingungen sollten neben PIAS auch PIAS-assoziierte Proteine isoliert werden. Die an die Affinitätssäule gebundenen Komplexe wurden mit einem Überschuss an Flag-Peptid eluiert, elektrophoretisch separiert und mit Coomassie gefärbt. Spezifische Banden wurden ausgeschnitten, trypsinverdaut und die Peptide massenspektrometrisch analysiert. Als Negativkontrolle diente eine parallele Aufreinigung aus einem Lysat Flag-exprimierender Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert waren. Abb. 31 zeigt eine Fraktion des Pulldowns mit Flag-PIAS $\gamma$ . Eine Datenbankrecherche identifizierte die prominenteste Bande bei ca. 70 kDa als das Bait



## Ergebnisse

PIASy (theoretisches Molekulargewicht 64 kDa), die schwache Bande bei 110 kDa als PARP-1 (116 kDa), die Bande bei 80 kDa als Ku80 (80 kDa) und bei 70 kDa knapp unter PIASy als Ku70 (70 kDa) (Peptidabdeckung s. Anhang).

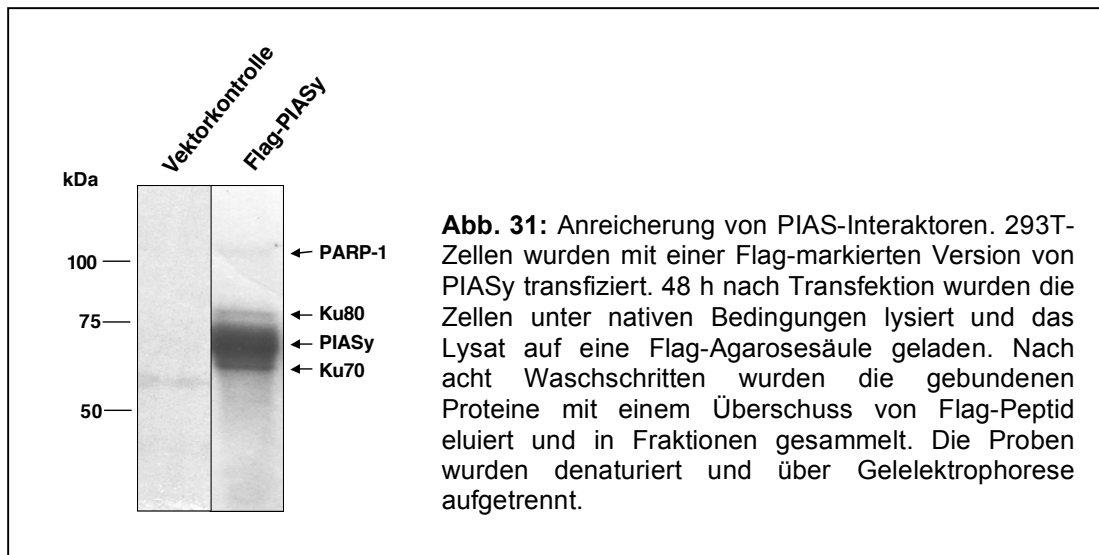
Neben diesen prominenten Banden wurden noch weitere Banden ausgeschnitten und analysiert, die aufgrund ihrer geringen Intensität nicht dokumentiert werden konnten (Tab. 2). Darunter befanden sich auch bereits publizierte Interaktoren (in rot), was ein Beleg für die erfolgreiche Anwendung der gewählten Methode ist.

Die kopräzipitierten Proteine des Pulldowns mit PIASx $\beta$  zeigt Tab. 2. Hierbei wurden ebenfalls Ku70, nicht jedoch Ku80 und PARP-1, sowie weitere denen von PIASy distinkte Bindungspartner identifiziert.

In der Negativkontrolle tauchte eine reproduzierbare Bande bei 60 kDa auf, die sich als PRMT5 identifizieren ließ. Weitere Experimente hierzu ergaben, dass dieses Protein mit dem Flag-Peptid interagiert (Daten nicht gezeigt).

Flag-PIASy	Flag-PIASx $\beta$
MITF	PHD finger protein 16
NRF	Zinc finger protein 624
c-myb	TRF-1
Aryl-hydrocarbon interacting protein	Mineralkortikoid Rezeptor

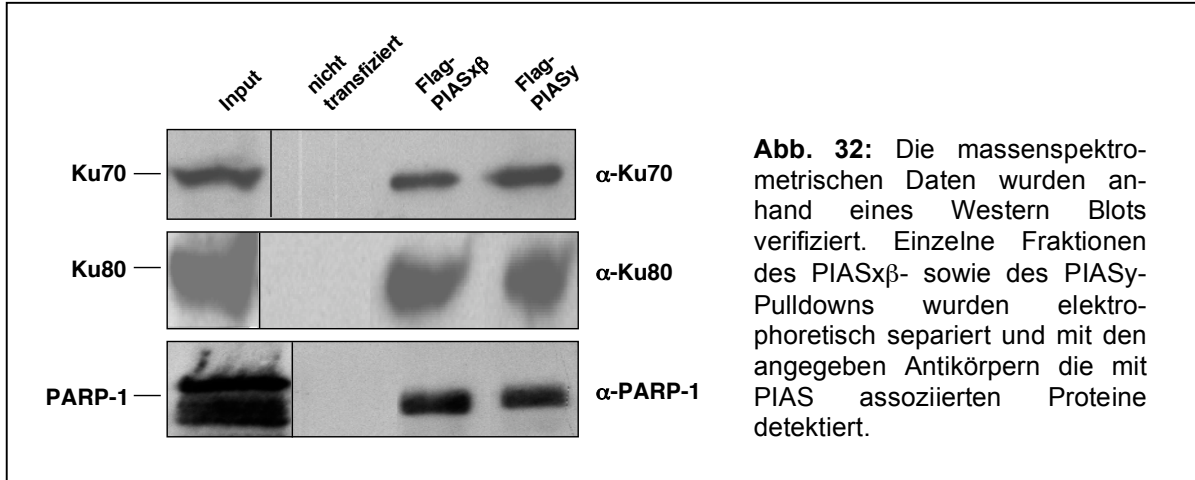
**Tab. 2:** Interaktoren von PIASy und PIASx $\beta$ . Alle Proteine wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert. Hellgrau markierte Proteine wurden bereits in der Literatur als PIAS-assoziierte Proteine beschrieben.



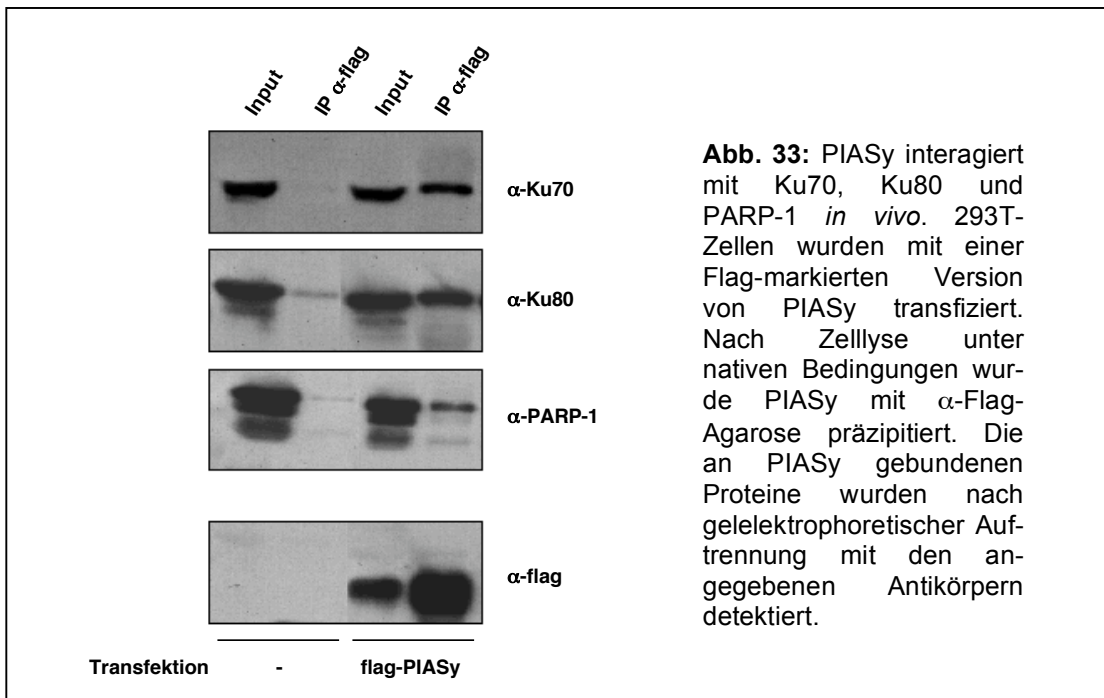
Im folgenden sollte die Interaktion von PIASy mit den prominentesten Bindungspartnern Ku70, Ku80 und PARP-1 näher untersucht werden.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse wurden mittels eines gegen die angegebenen Proteine gerichteten Western Blots von einer Fraktion des Eluats verifiziert. In Abb. 32 ist zu sehen, dass die Eluate sowohl der PIASy- als auch der PIASx $\beta$ -Affinitätsreinigung Ku70, Ku80 und PARP-1 enthalten.

## Ergebnisse

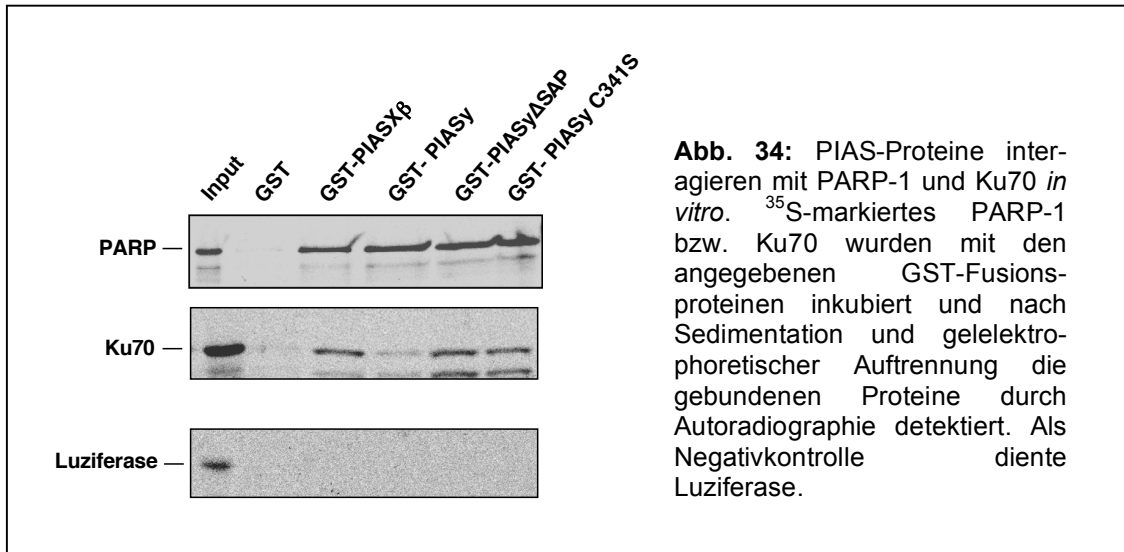


Des weiteren wurde eine Koimmunpräzipitation von Flag-PIASy und endogenem Ku70, Ku80 und PARP-1 in 293T-Zellen durchgeführt. Abb. 33 zeigt, dass sich alle drei Proteine mit transfiziertem, Flag-markiertem PIASy koimmunpräzipitieren lassen. Im unteren Teil der Abbildung wurde die Effizienz der Immunpräzipitation mittels eines Western Blots gegen das Flag-Epitop überprüft.



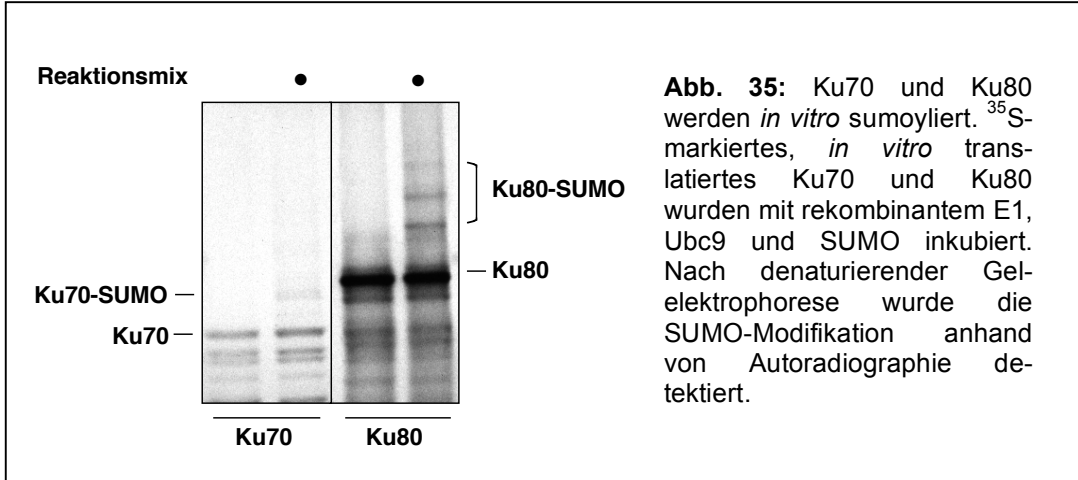
In Abb. 34 ist zu sehen, dass PIAS-Proteine auch *in vitro* mit PARP-1 und Ku70 interagieren. Bakteriell exprimiertes und gereinigtes, mit GST fusioniertes und an Glutathion-Sepharose gekoppeltes PIASxβ und PIASy wurden mit *in vitro* translatiertem, <sup>35</sup>S-markiertem PARP-1 bzw. Ku70 inkubiert und gebundene Proteine nach

Gelelektrophorese mittels Autoradiographie detektiert. PARP-1 und Ku70 interagieren mit beiden PIAS-Formen, wobei die Interaktion zwischen PIAS $\gamma$  und Ku70 in diesem Experiment unerwartet schwach ist. Beide Proteine interagieren auch mit den PIAS $\gamma$ -Mutanten  $\Delta$ SAP, der die DNA-bindende SAP-Domäne fehlt und C341S, die eine mutierte Zinkfinger-Domäne besitzt und daher keine Ligaseaktivität mehr aufweist. Mit nur mit GST beladener Glutathion-Sepharose als Spezifitätskontrolle des Experiments interagieren die Proteine nicht. Als Negativkontrolle diente Luziferase, die mit keinem der Proteine interagiert.



### Ku70 und Ku80 sind SUMO-Substrate *in vitro*

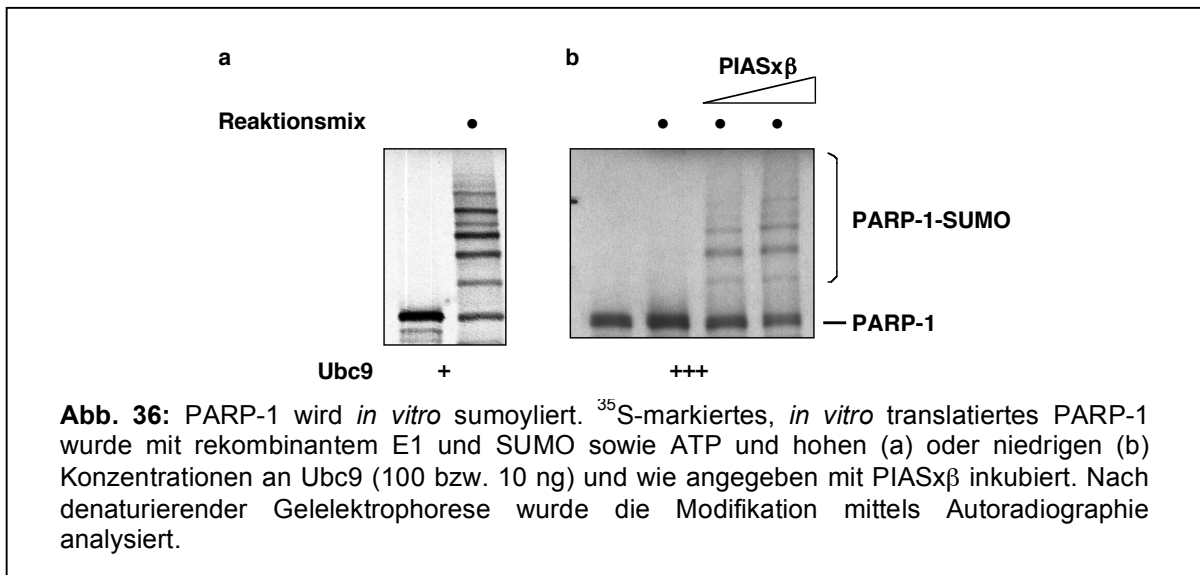
Die im Pulldown identifizierten PIAS-Interaktoren Ku70 und Ku80 wurden auf Modifikation mit SUMO getestet. In einem *in vitro*-Experiment mit *in vitro* translatiertem Ku70 bzw. Ku80 wird Ku70 an einer Stelle mit SUMO modifiziert (eine höhermolekulare Bande), während Ku80 anscheinend mit mehreren SUMO-Molekülen versehen wird (drei höhermolekulare Banden) (Abb. 35).



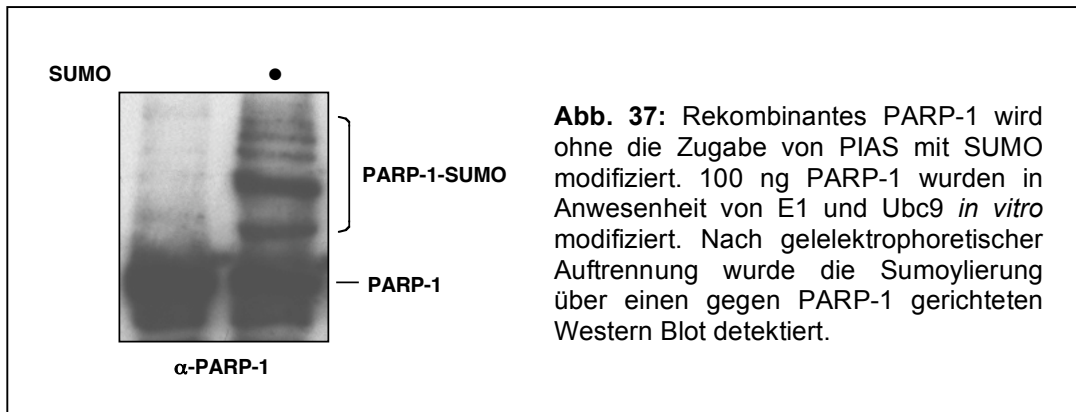
### SUMO-Modifikation von PARP-1

Die Interaktion von PIAS mit PARP-1 legt die Möglichkeit nahe, dass auch PARP-1 ein SUMO-Substrat ist. Ferner wurde Ubc9 bereits als Bindungspartner von PARP-1 beschrieben. Um die SUMO-Modifikation von PARP-1 zu untersuchen, wurde PARP-1 *in vitro* translatiert und modifiziert. Bei höherer Ubc9 Konzentration unterliegt PARP-1 einer drastischen Sumoylierung mit mehreren höhermolekularen Banden, wobei sich auch hier die Frage stellt, ob diese Banden aus SUMO-Ketten an einer Modifikationsstelle oder aus Monosumoylierung an verschiedenen Modifikationsstellen resultieren (Abb. 36a). Vorstellbar ist auch eine Variante mit SUMO-Ketten an einer Stelle und Monosumoylierung an einer oder mehreren anderen Stellen.

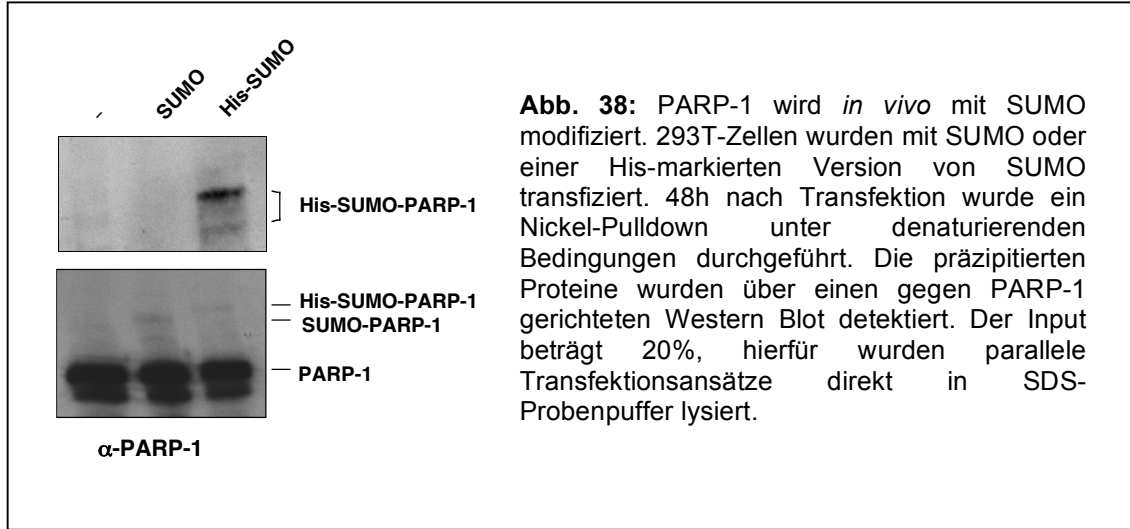
Bei niedrigerer Ubc9-Konzentration ist ein stimulierender Effekt von PIAS auf die Sumoylierung zu erkennen (Abb. 36b).



Hohe Konzentrationen an Ubc9 scheinen für die Sumoylierung von PARP-1 ausreichend zu sein. Bei diesem Experiment kann jedoch die Anwesenheit von PIAS oder anderen E3-ähnlichen Faktoren im Retikulozytenlysat nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde ein analoges *in vitro*-Experiment mit rekombinantem, aus Insektenzellen gereinigtem PARP-1 durchgeführt. Abb. 37 zeigt, dass rekombinantes PARP-1 im Gegensatz zu p53 ohne Zugabe von PIAS durch Ubc9 SUMO-modifiziert wird. Die Sumoylierung von PARP-1 scheint also nicht zwingend von PIAS abhängig zu sein, vielmehr fungiert PIAS hier als stimulierender Faktor der Modifikation. Allerdings muss erwähnt werden, dass PARP-1 in diesem Fall in Insektenzellen exprimiert wurde. Es besteht also die Möglichkeit, dass bei der Aufreinigung das verwandte und damit möglicherweise auch in Säugern funktionelle PIAS-Homolog aus Insekten in nicht detektierbaren, jedoch ausreichenden Mengen als Kontaminante mit aufgereinigt wurde.

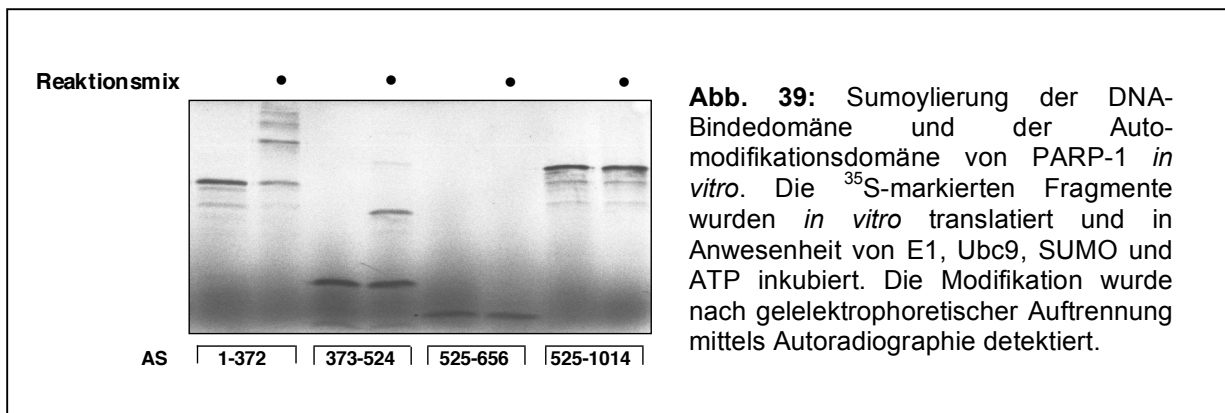


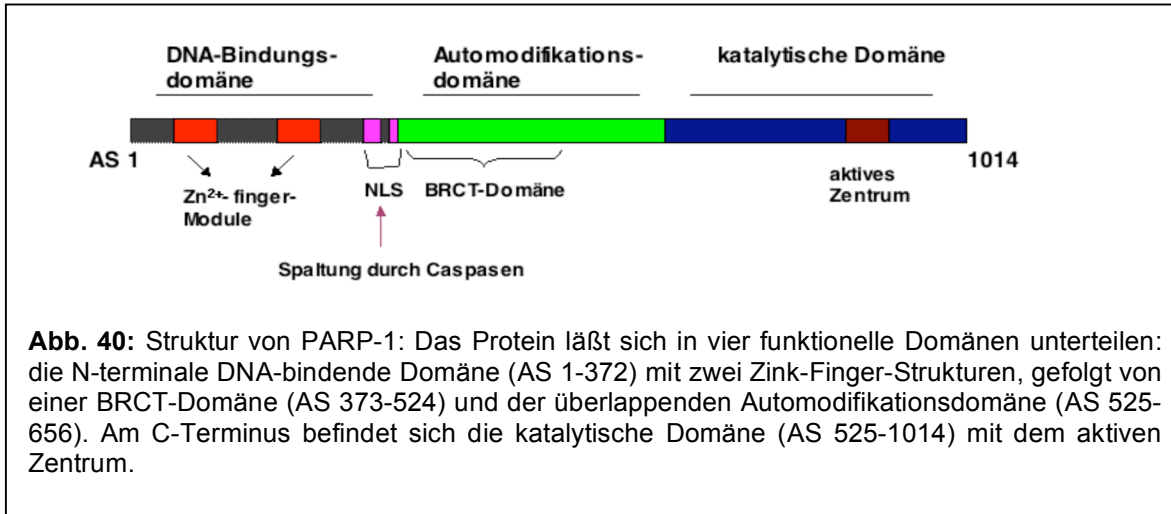
Um die Modifikation von endogenem PARP-1 *in vivo* zu demonstrieren, wurden 293T-Zellen mit SUMO oder einer His-markierten Version von SUMO transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgte nach einer Lyse unter denaturierenden Bedingungen ein Nickel-Pulldown. Hierzu wurden die Lysate mit Ni-NTA-Agarose inkubiert, um später His-SUMO-PARP-1-Konjugate zu reinigen. Die präzipitierten Proteine wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und mittels eines Western Blots mit einem gegen PARP-1 gerichteten Antikörper detektiert. Für die Gesamtextrakte wurden sämtliche Proteine aus einem Aliquot der Lysate TCA-präzipitiert. In den Gesamtextrakten (Abb. 38, unten) sind in Spur 2 und 3 zusätzlich zur Hauptbande bei ca. 110 kDa von nichtmodifiziertem PARP-1 jeweils sehr schwache Banden bei ca. 130 kDa zu sehen, die die Modifikation von PARP-1 mit SUMO bzw. His-SUMO darstellen. Nur die mit His-SUMO modifizierte Form von PARP-1 kann im Pulldown präzipitiert werden (Abb. 38, oben, Spur 3). Unterhalb der prominenteren Bande bei 130 kDa taucht noch eine schwächere Bande auf, die im Gesamtextrakt nicht detektiert wird. Diese Bande repräsentiert eine Modifikation mit SUMO an einer anderen Modifikationsstelle.



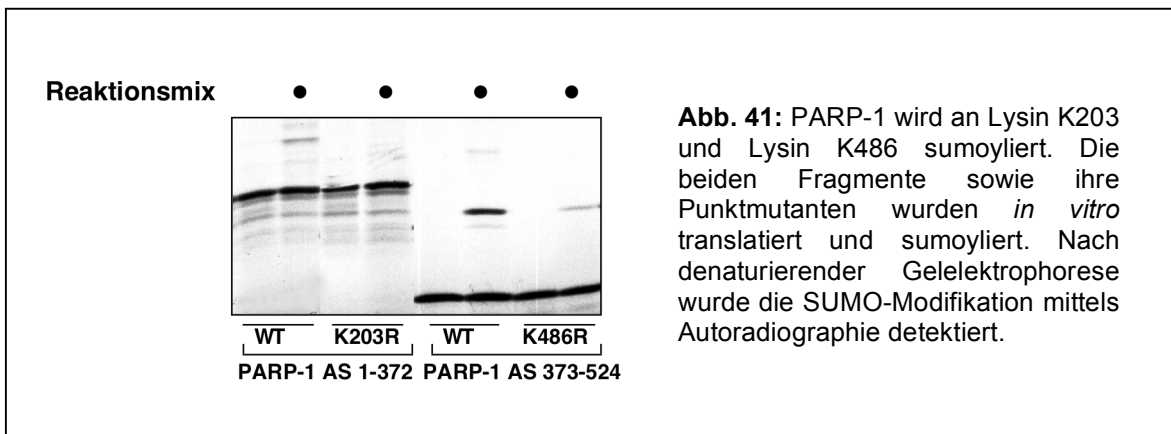
## Identifizierung der Haupt-Sumoylierungsstellen von PARP-1

Da PARP-1 mit 116 kDa ein relativ großes Protein mit entsprechend vielen Lysinen ist, wurden einzelne Fragmente, die den funktionellen Domänen entsprechen (Abb. 40), auf ihre Modifikation mit SUMO getestet, um die Region des oder der Akzeptorlysine einzugrenzen. Abb. 39 zeigt, dass sowohl das N-terminale Fragment (DNA-Bindedomäne, AS 1-372) als auch das angrenzende Fragment (BRCT- und Automodifikations-Domäne, AS 373-524) mit SUMO modifiziert werden. Es tauchen drei bzw. zwei höhermolekulare Formen auf, die entweder SUMO-Ketten oder Modifikationen an verschiedenen Lysinen repräsentieren. Die C-terminalen Fragmente (AS 525-656 und 525-1014) zeigen keine Sumoylierung.





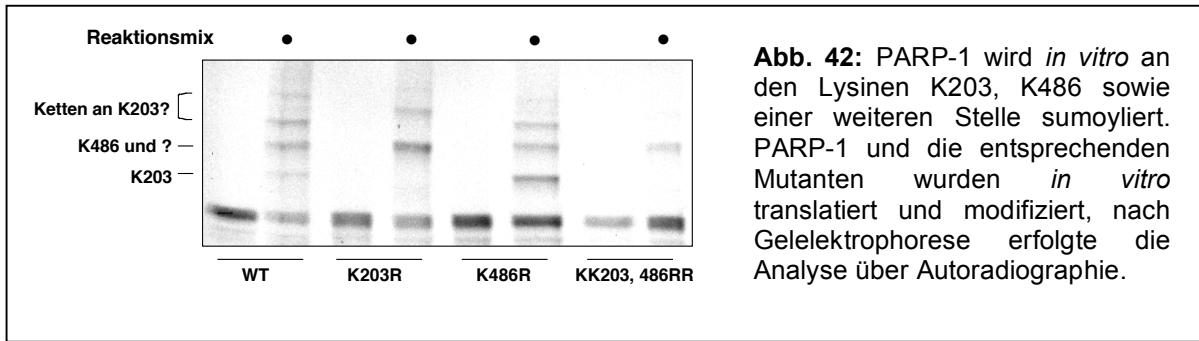
Im folgenden wurde versucht in den beiden modifizierten Fragmenten die Ziellysine zu identifizieren. Hierzu wurden diverse Lysine, die sich innerhalb der Konsensussequenz  $\psi Kx E$  befinden, zu Argininen mutiert. Das Akzeptorlysin im N-terminalen Fragment ist das Lysin an Position 203. Das *in vitro* translatierte Fragment mit einer Punktmutation des Lysins K203 zu Arginin wird nicht mehr modifiziert (Abb. 41, Spur 4). Die Tatsache, dass im Wildtyp drei höhermolekulare Formen auftauchen, legt die Vermutung nahe, dass Lysin K203 zumindest *in vitro* polysumoyliert wird. Im angrenzenden Fragment (AS 373-524) wurde das Lysin K486 als Akzeptorlysin identifiziert. Eine Einzelmutante, die die Mutation K486R trägt, zeigt jedoch noch immer eine schwache Sumoylierung (Abb. 41, Spur 8). Hier liegt also die Vermutung nahe, dass sich in diesem Fragment zwei Lysine befinden, die einer Monosumoylierung unterliegen, vermutlich die präferentiell benutzte Hauptmodifikationsstelle Lysin K486 sowie eine weniger benutzte Nebenmodifikationsstelle.





## Ergebnisse

Die beiden SUMO-Akzeptorstellen wurden im folgenden im Volllängenprotein mutiert und dieses *in vitro* modifiziert (Abb. 42). Die Mutante PARP-1 K203R wird noch von zwei SUMO-Molekülen modifiziert, PARP-1 K486R mit drei. Die Doppelmutante PARP-1 KK203, 486RR zeigt wie erwartet noch eine Modifikation mit einem SUMO-Molekül.

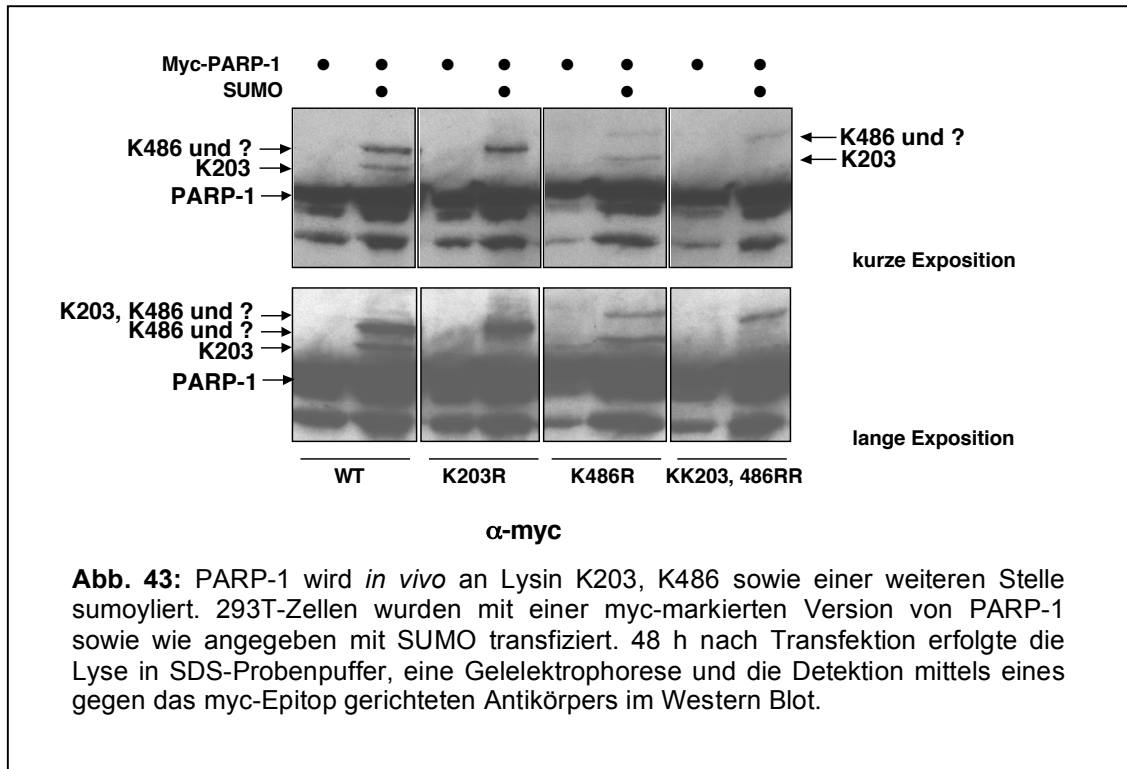


Zur Verifikation der *in vitro*-Daten wurden die verschiedenen Mutanten als Myc-markierte Versionen in Hela-Zellen transfiziert und mit SUMO koexprimiert (Abb. 43). Im Wildtyp sind zwei höhermolekulare Banden zu sehen, von denen die untere deutlich schwächer ist. Diese Bande repräsentiert die Modifizierung am Lysin K203, da sie in der entsprechenden Mutante verschwindet. Die obere Bande wird nach Mutation des Lysins K486 deutlich schwächer. Diese Bande setzt sich vermutlich aus monosumoylierten Formen von PARP-1 an Lysin K486 und einem weiteren, nicht identifizierten Lysin zusammen.

Konsistent mit den Einzelmutanten verhält sich die Doppelmutante, die nur noch eine schwache Bande des höheren Molekulargewichts aufweist.

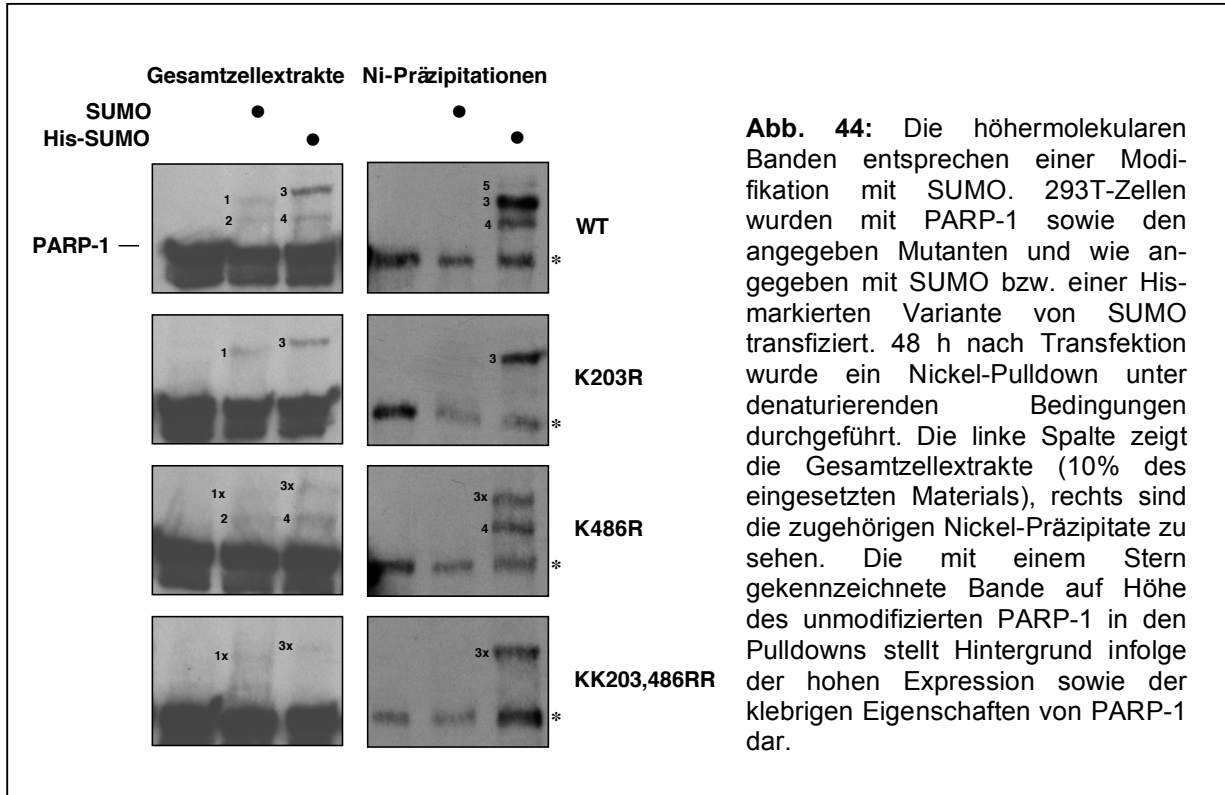


## Ergebnisse



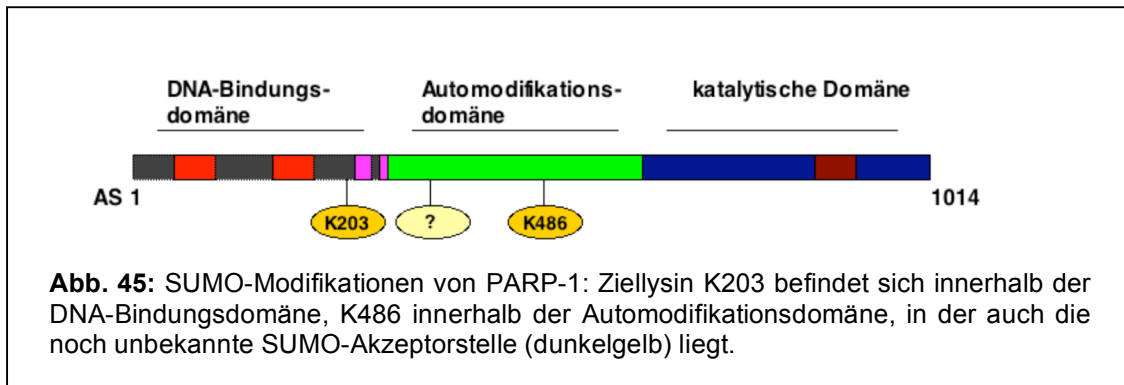
**Abb. 43:** PARP-1 wird *in vivo* an Lysin K203, K486 sowie einer weiteren Stelle sumoyliert. 293T-Zellen wurden mit einer myc-markierten Version von PARP-1 sowie wie angegeben mit SUMO transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Lyse in SDS-Probenpuffer, eine Gelelektrophorese und die Detektion mittels eines gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörpers im Western Blot.

Die Natur der höhermolekularen Banden als SUMO-modifiziertes PARP-1 wurde zusätzlich durch einen Nickel-Pulldown verifiziert. Hierzu wurden myc-markierte Versionen des Wildtyps sowie der entsprechenden Mutanten zusammen mit entweder SUMO oder einer His-markierten Version von SUMO in 293T-Zellen transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen und nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose die präzipitierten Proteine mittels eines gegen das myc-Epitop gerichteten Western Blots detektiert. Abb. 44 zeigt in der linken Spalte jeweils die Gesamtzellextrakte, in der rechten Spalte die dazugehörigen Nickel-Präzipitationen. Im Wildtyp werden nach der Transfektion mit His-SUMO drei höhermolekulare Banden präzipitiert (Bande 3, 4 und 5). Im Gesamtextrakt ist zu erkennen, dass Bande 3 und 4 im Gegensatz zu den Banden 1 und 2, die nach Transfektion mit unmarkiertem SUMO erscheinen, aufgrund des His-Epitops leicht nach oben verschoben sind. Aufgrund der Anreicherung der His-SUMO-modifizierten PARP-1-Moleküle im Nickel-Pulldown ist zusätzlich die Bande 5 zu erkennen, die mehrfach modifiziertes PARP-1 repräsentiert. In der Mutante PARP-1 K203R taucht nur noch die Bande 3 auf, die aus der Mono-Modifikation an Lysin K486 sowie an einem bisher nicht identifizierten Lysin innerhalb der Automodifikationsdomäne resultiert. Dementsprechend ist diese Bande (3x) in der Mutante K486R weniger prominent, die Bande 4 wird in dieser Mutante jedoch präzipitiert. In der Doppelmutante kann die Bande 4 nicht mehr präzipitiert werden, die Bande 3x repräsentiert die Modifikation an der unbekannt Stelle.



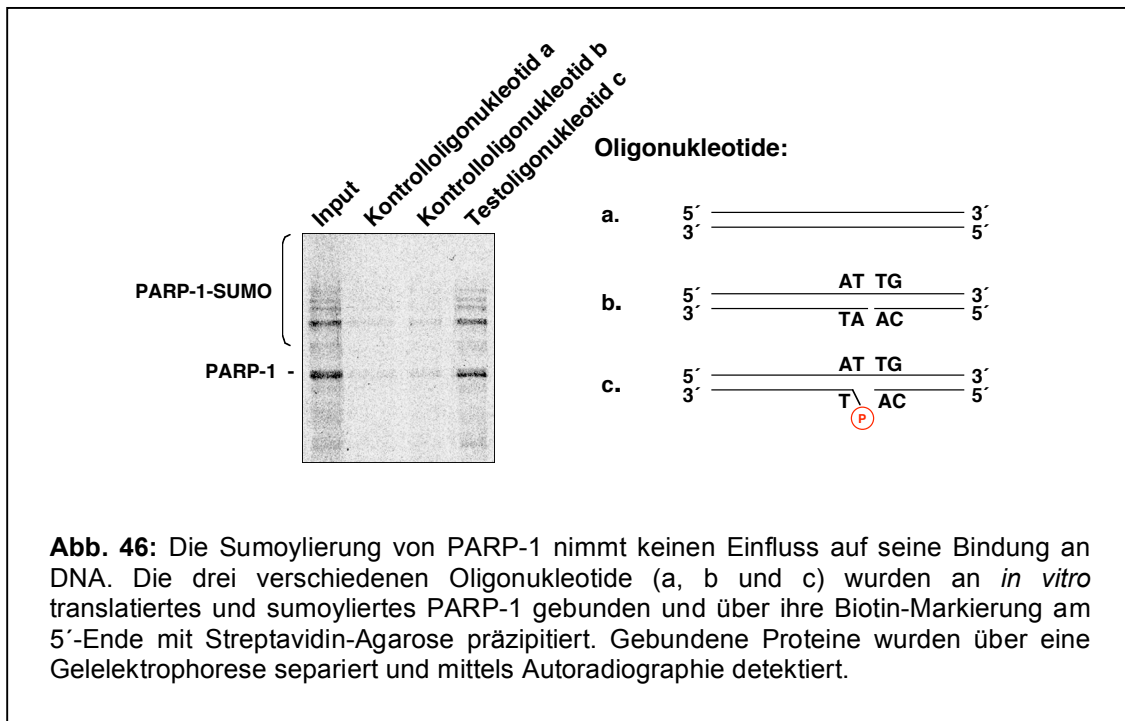
### Einfluss der Sumoylierung von PARP-1 auf die DNA-Bindung und die Interaktion mit PIAS sowie XRCC-1

Eine identifizierte Sumoylierungsstelle, das Lysin K203, befindet sich in der DNA-Bindungsdomäne von PARP-1 (Abb. 45).



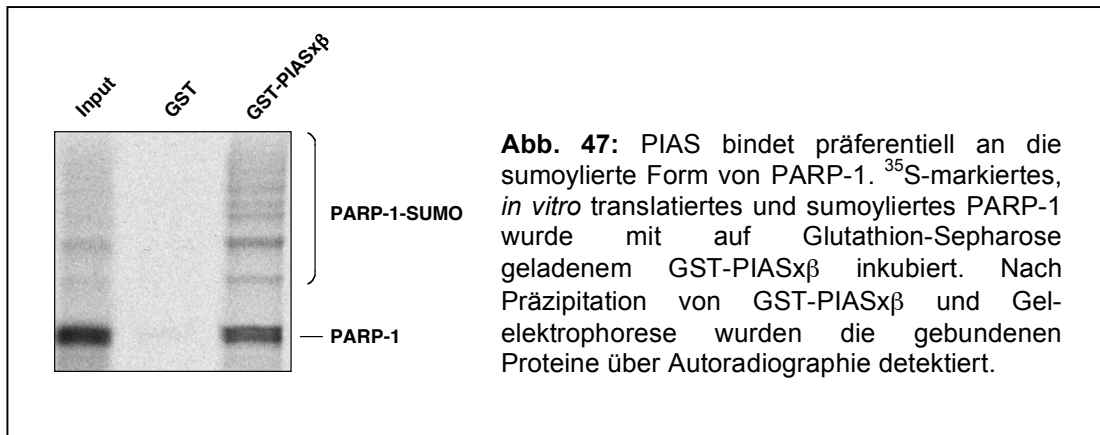
## Ergebnisse

Daher ist ein Einfluss auf die DNA-Bindung von PARP-1 durch eine Modifikation mit SUMO vorstellbar. Hierzu wurden Biotin-markierte DNA-Doppelstrang-Oligonukleotide mit *in vitro* sumoyliertem sowie unsumoyliertem PARP-1 inkubiert und nach Präzipitation mittels Streptavidin-Agarose das gebundene, <sup>35</sup>S-markierte PARP-1 über eine Autoradiographie visualisiert. PARP-1 erkennt und bindet präferentiell geschädigte DNA, bei der einer Base ihre komplementäre Base fehlt und gleichzeitig der an die Lücke angrenzende Zuckerrest an Position 3 phosphoryliert ist („Nick“). Ein dementsprechend synthetisiertes Oligonukleotid soll einen solchen „Nick“ imitieren. Als Kontrollen wurden zwei Oligonukleotide verwendet: Zum einen ein intaktes, doppelsträngiges DNA-Molekül, das PARP-1 nur mit relativ geringer Affinität binden sollte, zum anderen eines, das einen „Gap“ besitzt, d. h. ein Phosphat in der Mitte des einen Strangs ist nicht mit seinem folgenden Zuckerrest verbunden; dieses Oligonukleotid sollte ebenfalls nur suboptimal an PARP-1 binden, theoretisch mit etwas höherer Affinität als das intakte DNA-Molekül. In Abb. 46 ist zu sehen, dass die Sumoylierung von PARP-1 keinen Einfluss auf seine Bindung an DNA hat. Mit dem optimal bindenden Oligonukleotid (c) werden die sumoylierten Formen in gleichem Ausmaß wie das unmodifizierte PARP-1 präzipitiert. PARP-1 bindet wie erwartet nur relativ schwach an die Kontrolloligonukleotide (a und b).

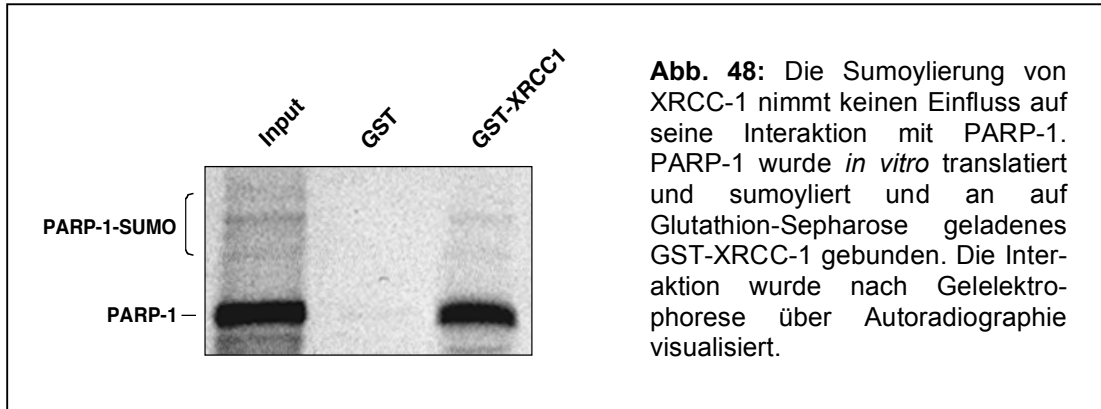


Für verschiedene SUMO-Substrate wurde gezeigt, dass sie in ihrer sumoylierten Form eine höhere Affinität zu ihren Interaktoren besitzen. Ein Beispiel hierfür ist Sp100, dessen Sumoylierung seine Interaktion mit HP-1 verstärkt. Ähnlich konnte für PIAS-Proteine in verschiedenen Fällen gezeigt werden, dass sie mit höherer Affinität an sumoylierte Proteine binden (Minty et al., 2000). Um zu testen, ob die Sumoylierung von PARP-1 einen Einfluss auf seine Interaktion mit PIAS besitzt, wurde PARP-1 *in vitro*

translatiert und sumoyliert und beide Formen einer GST-fusionierten Version von PIASx $\beta$  angeboten. Nach Sedimentierung von PIASx $\beta$  mittels Glutathion-Sepharose wurden die gebundenen Formen von PARP-1 über Autoradiographie detektiert. In Abb. 47 sieht man, dass im Vergleich zum Input die SUMO-modifizierten Formen von PARP-1 angereichert werden. Die Sumoylierung von PARP-1 scheint also die Bindung an PIASx $\beta$  zu verstärken.

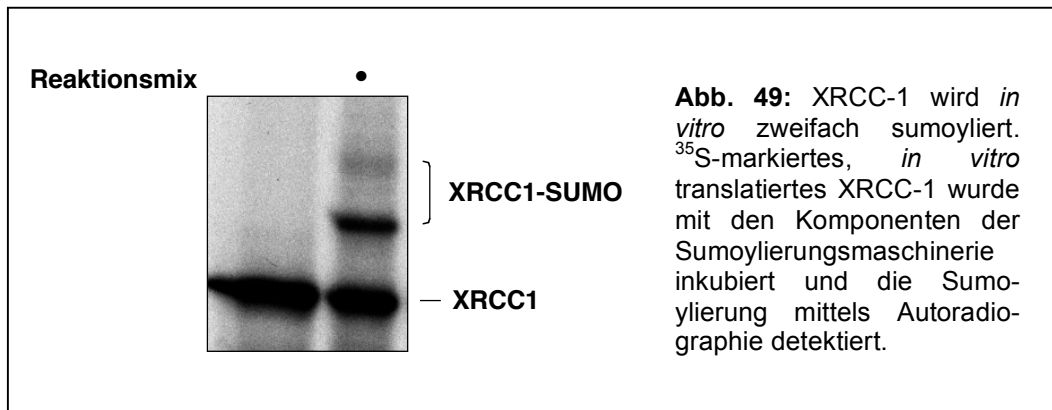


Ein wichtiger Interaktionspartner von PARP-1 in der Basenaustauschreparatur ist XRCC-1. Nach der initialen Bindung an die geschädigte DNA rekrutiert PARP-1 XRCC-1, das wiederum als Scaffold-Protein fungiert und weitere Reparaturenzyme rekrutiert. Wie in PARP-1 findet sich in XRCC-1 eine BRCT-Domäne, wobei XRCC-1 zwei dieser Domänen besitzt. Die Interaktion wird über die BRCT-Domäne in PARP-1 und eine BRCT-Domäne in XRCC-1 vermittelt. Interessanterweise wird die BRCT-Domäne in XRCC-1 von einer Sequenz flankiert, die Homologie zur Sequenz des beschriebenen putativen SUMO-Bindungsmotivs aufweist (Minty et al., 2000). Vor diesem Hintergrund und ob der Tatsache, dass zwei Modifikationsstellen in PARP-1 innerhalb der BRCT-Domäne liegen, wurde untersucht, ob die Sumoylierung von PARP-1 auch einen Einfluss auf die Bindung an XRCC-1 nimmt. Hierzu wurde <sup>35</sup>S-markiertes und *in vitro* sumoyliertes PARP-1 mit an GST fusioniertem und auf Glutathion-Sepharose geladenem XRCC-1 inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Glutathion-Sepharose sedimentiert und die gebundenen Formen von PARP-1 über Autoradiographie analysiert. Man sieht jedoch in Abb. 48, dass die sumoylierten Formen von PARP-1 kein verändertes Bindungsverhalten im Vergleich mit der unsumoylierten Form aufweisen.



**Abb. 48:** Die Sumoylierung von XRCC-1 nimmt keinen Einfluss auf seine Interaktion mit PARP-1. PARP-1 wurde *in vitro* translatiert und sumoyliert und an auf Glutathion-Sepharose geladenes GST-XRCC-1 gebunden. Die Interaktion wurde nach Gelelektrophorese über Autoradiographie visualisiert.

Aufgrund der Tatsache, dass in nukleären Proteinkomplexen häufig mehrere der interagierenden Proteine sumoyliert sind, wurde im Rahmen dieser Bindungsstudien auch XRCC-1 als SUMO-Substrat getestet. In Abb. 49 ist zu sehen, dass XRCC-1 an zwei Lysinen relativ stark sumoyliert wird.

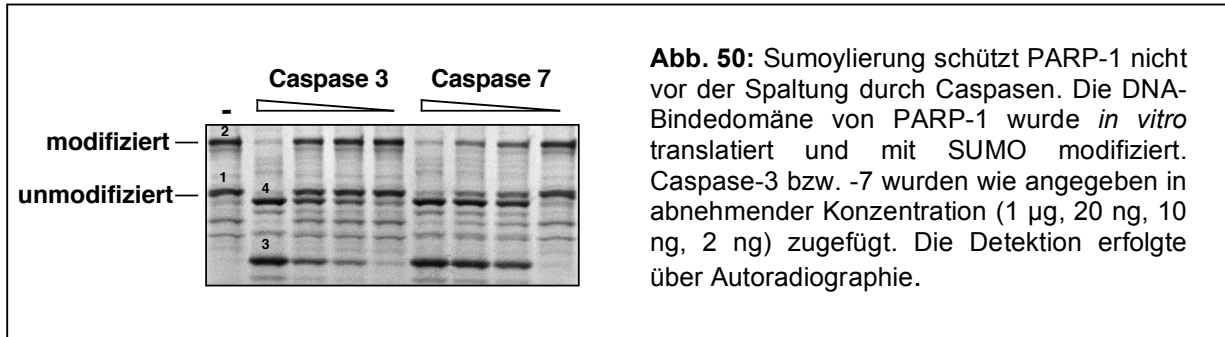


**Abb. 49:** XRCC-1 wird *in vitro* zweifach sumoyliert. <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro* translatiertes XRCC-1 wurde mit den Komponenten der Sumoylierungsmaschinerie inkubiert und die Sumoylierung mittels Autoradiographie detektiert.

## Die Sumoylierung schützt PARP-1 nicht vor seiner Spaltung durch Caspasen

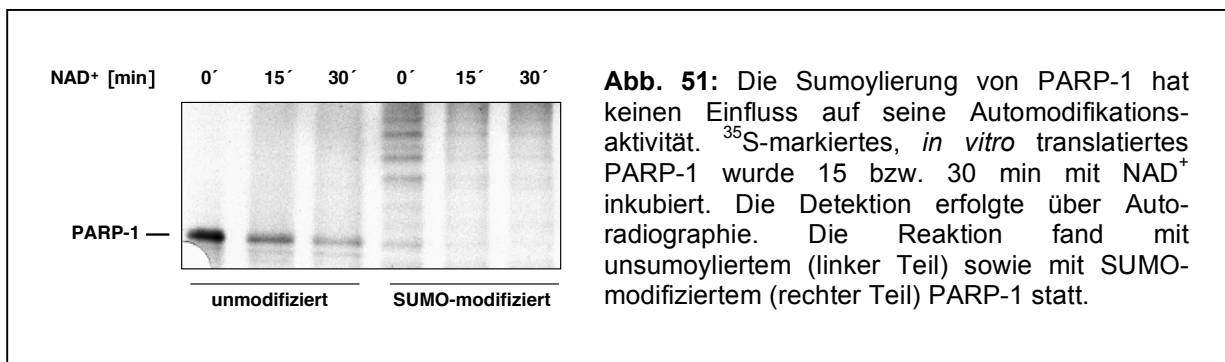
PARP-1 wird während der Apoptose durch Caspase-3 und -7 gespalten. Die Schnittstelle DEVD befindet sich innerhalb der NLS und somit in der DNA-Bindedomäne, die mit SUMO modifiziert wird. Um einen eventuellen Einfluss der Sumoylierung auf die Spaltung durch Caspasen zu testen, wurde das *in vitro* sumoylierte N-terminale Fragment (AS 1-372) von PARP-1 mit rekombinanter Caspase-3 und -7 in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Abb. 50 zeigt, dass die sumoylierten Formen von PARP-1 genauso wie die nichtsumoylierte Form der Spaltung ausgesetzt sind. Bande 1 ist das unmodifizierte N-terminale PARP-1-Fragment mit einer

Größe von ca. 42 kDa. Bande stellt die sumoylierte Form des Fragments dar. Bande 3 in Spur 2 ist das N-terminale Spaltungsfragment von ca. 24 kDa, Bande 4 stellt wiederum dessen sumoylierte Form dar.



## Interferenz der Autoribosylierung und Sumoylierung von PARP-1

Nachdem PARP-1 innerhalb seiner Automodifikationsdomäne mit SUMO modifiziert wird, ist eine Interferenz zwischen Automodifikation mit poly(ADP-Ribose) und SUMO-Modifikation denkbar. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde <sup>35</sup>S-markiertes PARP-1 *in vitro* modifiziert und die sumoylierte Form auf ihre Fähigkeit zur Automodifikation getestet. Nicht sumoyliertes als auch sumoyliertes PARP-1 wurde hierzu mit NAD inkubiert. In der linken Hälfte von Abb. 51 sieht man, dass PARP-1 nach 15 bzw. 30 Minuten großteils poly(ADP-ribosyl)iert ist, wie die Verminderung der nichtmodifizierten Form von PARP-1 Bande indiziert. Die poly(ADP-ribosyl)ierten Formen werden durch den höhermolekularen Schmier repräsentiert. In der rechten Spalte ist das Experiment mit SUMO-modifiziertem PARP-1 zu sehen. Die sumoylierten Formen von PARP-1 verschwinden ebenso wie die nicht modifizierte Form zugunsten der höhermolekularen Banden. Die Modifikation mit SUMO verhindert also nicht die Autoribosylierung von PARP-1. Allerdings können diese Ergebnisse nicht generell ausschließen, dass möglicherweise Unterschiede in der Kinetik der Autoribosylierung in Abhängigkeit von der Modifikation mit SUMO bestehen.



## PIAS-Proteine als E3-Ligasen im SUMO-System

Es war lange Zeit umstritten, ob im SUMO-System analog zum verwandten Ubiquitin-System E3-Ligasen oder Ligase-ähnliche Komponenten am Modifikationsprozess beteiligt sind. Gegen die Beteiligung von E3-Ligasen an der Modifikation eines Zielproteins mit SUMO sprach, dass Ubc9 an verschiedene bekannte Substrate direkt binden kann und somit die Funktion von E3-Ligasen des Ubiquitin-Systems, die Substraterkennung, übernehmen könnte. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ist zumindest *in vitro* für manche Substrate, wie z. B. RanGap, kein E3 für die Modifikation mit SUMO erforderlich. Im Fall von RanGAP1 konnte in der Tat gezeigt werden, dass RanGap einen stabilen Komplex mit Ubc9 bildet, was die Übertragung von SUMO auf RanGAP ohne zusätzliche Faktoren ermöglichen dürfte (Saitoh et al., 1997).

Allerdings spricht die Vielzahl der inzwischen bekannten SUMO-Substrate für eine Beteiligung von E3-ähnlichen Komponenten als Spezifitätsfaktoren, da kaum vorstellbar ist, dass in allen Fällen allein durch die Ubc9-vermittelte Substraterkennung eine ausreichende Regulation der Modifikation gewährleistet werden kann. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Suche nach Faktoren, die als E3- oder als E3-ähnliche Faktoren im SUMO-System agieren. Ein Schwerpunkt hierbei war die mögliche Beteiligung solcher Komponenten im Signalweg von p53.

Ein wichtiger Aspekt in unseren Arbeiten ergab sich aus aktuellen Untersuchungen in der Hefe *S. cerevisiae*, die ergaben, dass das Protein Siz1 als E3-ähnlicher Faktor die Sumoylierung von Septinen stimuliert (Johnson and Gupta, 2001). Außerdem induziert Siz2, ein Siz1-verwandtes Protein, die Sumoylierung weiterer SUMO-Substrate in der Hefe. Die humanen Homologe von Siz gehören zur Familie der PIAS-Proteine (Protein Inhibitor of Activated STAT). Diese Familie besteht aus mindestens vier Mitgliedern, PIAS1, PIAS3, den Spleißvarianten  $\alpha$  und  $\beta$  von PIASx, sowie PIASy. Interessanterweise war für PIAS1, PIASx $\beta$  und PIASy eine Bindung an p53 im Two-Hybrid-System der Hefe gezeigt worden (Gallagher et al., 1999; Minty et al., 2000; Nelson et al., 2001).

Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit war, dass alle Mitglieder der humanen PIAS-Familie als E3-ähnliche Faktoren im SUMO-System fungieren. Eine Stimulierung der Sumoylierung durch PIAS-Proteine wurde hier für p53 sowie weitere transkriptionelle Regulatoren *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt. Zusammen mit Arbeiten anderer Gruppen wurde damit erstmals die Beteiligung E3-ähnlicher Faktoren im SUMO-System in Säugerzellen demonstriert.

Die Untersuchungen zur mechanistischen Funktion von PIAS-Proteinen ergaben zahlreiche Parallelen, aber auch wichtige Unterschiede von PIAS-Proteinen zu Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs, einer Klasse von Ubiquitin-Ligasen. Wir konnten zeigen, dass PIAS-Proteine an Ubc9 und Substrate wie p53 und c-jun binden und somit analog zu RING-Ubiquitin-Ligasen als Adaptermoleküle fungieren, die die Rekrutierung vom E2 zum Substrat vermitteln bzw. die Substratbindung an Ubc9 stabilisieren (Kahyo et al., 2001; Schmidt and Muller, 2002). Bindung an Substrat und Ubc9 konnte auch für Siz1 der Hefe gezeigt werden (Johnson and Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001b).

Für eine mechanistische Analogie zwischen Ubiquitin-Ligasen der RING-Familie und SUMO-Ligasen des PIAS-Typs spricht auch, dass die Integrität der SP-RING-Domäne von PIAS-Proteinen, die Verwandtschaft zur RING-Domäne von Ubiquitin-Ligasen aufweist, essentiell für die Ligaseaktivität ist. In Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs wird

die Interaktion mit dem E2 meist durch die RING-Domäne vermittelt. Die Mutation von kritischen Aminosäureresten innerhalb dieser Domäne führt häufig zum Verlust der Bindung an das E2. Im Fall von PIAS scheint die strukturelle Integrität der SP-RING Domäne ebenfalls Voraussetzung für die E3-SUMO-Ligaseaktivität zu sein, da die Mutation eines konservierten Cysteinrests in der SP-RING-Domäne zum völligen Verlust der Aktivität führt (Abb. 14, 15). Allerdings ergaben unsere *in vitro*-Interaktionsstudien, dass eine solche Mutation die Bindung an Ubc9 nicht beeinträchtigt (Abb. 26). Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Interaktion des Hefehomologen Siz-1 mit Ubc9 in Two-Hybrid-Experimenten durch eine Punktmutation innerhalb der RING-Finger-Domäne verhindert wird (Takahashi et al., 2001a). Die definitive Rolle der SP-RING-Domäne bei der Interaktion mit Ubc9 müssen deshalb wohl endgültig Strukturdaten klären.

Eine weitere Ähnlichkeit zwischen Ubiquitin-RING-Ligasen und PIAS-Proteinen ist ihre Fähigkeit zur Automodifikation. Die Autoubiquitinierung von Ligasen des RING-Typs gilt als charakteristisches Merkmal dieser Gruppe von Proteinen. Für PIAS-Proteine konnte Automodifikationsaktivität *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (Abb. 23, 24). In Abwesenheit anderer Substrate unterliegen beide Moleküle einer starken Modifikation mit Ubiquitin bzw. SUMO.

Ein signifikanter Unterschied von PIAS-SUMO-Ligasen zu E3-Ligasen im Ubiquitin-System besteht offensichtlich in der Substratspezifität. Während Ubiquitin-Ligasen i. d. R. eine hohe Substratspezifität aufweisen und die Ubiquitinierung eines oder weniger Zielproteine stimulieren, belegen unsere Ergebnisse und die anderer Arbeitsgruppen, dass eine spezifische PIAS-Form die Sumoylierung einer Vielzahl von Substraten induzieren kann (Abb. 9, 18-21, 36). Allerdings stimulieren sie nicht in allen Fällen die Sumoylierung, so üben sie z. B. keinen Effekt auf RanGap, I $\kappa$ B und Sp100 aus (Abb. 22). Somit scheint ihnen also eine gewisse Rolle in der Selektion der Substrate zuzukommen. Ein Modell schlägt vor, dass bei Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs die Substraterkennung ausschließlich durch die Ligase erfolgt (Hochstrasser, 2002), während PIAS-Ligasen im SUMO-System in Kooperation mit dem E2-Enzym Ubc9 die Substraterkennung vermitteln. Ein möglicher Wirkungsmechanismus von PIAS wäre also die Stabilisierung von Ubc9/Substrat-Komplexen. Dies würde erklären, dass für manche Substrate, wie z. B. RanGap, die *per se* stark an Ubc9 binden, PIAS als stabilisierender Faktor der Interaktion überflüssig ist, während es für die Sumoylierung von Substraten, die weniger effizient an Ubc9 binden, essentiell ist. Diese Interpretation würde auch die in unseren Experimenten gemachte Beobachtung erklären, dass PIAS-Proteine *in vitro* präferentiell in Anwesenheit geringer Konzentrationen an Ubc9 die Sumoylierung verstärken, während sie bei hohen Konzentrationen an Ubc9 nicht mehr benötigt werden.

Eine wichtige Frage im Zusammenhang mit E3-Ligasen ist, ob PIAS-Proteine für die SUMO-Modifikation *in vivo* essentiell sind oder nur als stimulierende Faktoren dienen. Bei niedrigen Konzentrationen an Ubc9 verstärken PIAS-Proteine bei den meisten Substraten drastisch die geringe Sumoylierung bzw. induzieren die Sumoylierung. Es scheinen drei Klassen von SUMO-Substraten bezüglich ihrer PIAS-Sensitivität, zu existieren: So lässt sich rekombinantes p53 ohne PIAS nicht *in vitro* modifizieren (Abb. 10). PIAS induziert hier auch die Modifikation von weniger benutzten Ziellysinen eines Substrats: Für p53 und c-jun wurden in Anwesenheit von PIAS erstmals Sumoylierung an einer zweiten Stelle beobachtet (Abb. 9, 18). Für eine essentielle Rolle von E3-Ligasen im SUMO-Modifikationssystem sprechen außerdem Knock-out-Experimente in *S. cerevisiae*, in denen das Hefe-Homolog zu PIAS, *Siz-1*, deletiert wurde. In diesen



Mutanten ist die Sumoylierung mehrerer Substrate *in vivo*, u. a. der Septine, nicht mehr möglich (Johnson and Gupta, 2001). Zur zweiten Gruppe von Substraten scheint PARP-1 zu gehören: Hier wird für die Modifikation von rekombinantem Substrat PIAS nicht benötigt (Abb. 37), allerdings zeigt es *in vitro* bei geringen Konzentrationen von Ubc9 einen stimulierenden Effekt auf die SUMO-Modifikation (Abb. 36b). Die dritte Klasse von Substraten wird durch RanGap repräsentiert, für dessen Sumoylierung weder E3-ähnliche Faktoren benötigt werden, noch einen stimulierenden Effekt aufweisen. Möglicherweise determiniert die Bindungsaffinität an Ubc9 eines gegebenen Substrats seine Abhängigkeit von PIAS oder E3-ähnlichen Faktoren für die SUMO-Modifikation. Es ist denkbar, dass ein Substrat, das *per se* hochaffin an Ubc9 bindet, wie z. B. RanGAP, unabhängig von PIAS sumoyliert werden kann, während Substrate, die nur mäßig oder schwach an Ubc9 binden, auf die Unterstützung von PIAS angewiesen sind. Dieser Fall würde eine stabilisierende Rolle von PIAS in der Interaktion von Substrat und Ubc9 implizieren.

Ein weiterer Aspekt in Anbetracht der Existenz von fünf homologen Mitgliedern der PIAS-Familie ist die Spezifität der einzelnen PIAS-Formen in ihrer Rolle als E3-Ligasen bezüglich eines Substrats. Zahlreiche Substrate konnten als Interaktoren von mehreren bzw. allen PIAS-Formen identifiziert werden (Gross et al., 2001; Junicho et al., 2000; Kotaja et al., 2000; Minty et al., 2000; Moilanen et al., 1999; Nelson et al., 2001). Übereinstimmend hiermit üben in manchen Fällen mehrere PIAS-Formen E3-Ligaseaktivität auf dasselbe Substrat aus, d. h. sie scheinen zumindest teilweise überlappende Substratspezifitäten zu besitzen. Diese Annahme wird durch ein unverändertes Sumoylierungsmuster in Mäusen, in denen PIASy deletiert wurde, gestützt (Roth et al., 2004). Andererseits scheinen in manchen Fällen jedoch Substratspezifitäten zu existieren, so stimulieren z. B. PIAS1 und PIASx $\beta$ , nicht jedoch PIASx $\alpha$  die Sumoylierung von Mdm2 (Miyauchi et al., 2002). Während PIAS1 und PIAS3 in allen Zelltypen gefunden werden, wurde für PIASx und PIASy eine spezifische Expression in Testis beschrieben (Chung et al., 1997; Gross et al., 2001; Moilanen et al., 1999). Somit könnte die Spezifität von PIAS-Proteinen in einigen Fällen auf ihre Expression festgelegt werden. Eine plausible Möglichkeit, wie die Substratspezifität von PIAS-Proteinen erhöht werden könnte, wäre z. B. die Interaktion von PIAS mit weiteren, bisher nicht identifizierten substratspezifischen Faktoren.

## Topors als potenzielle E3-Ligase

Es wurden bisher drei Typen von Ligasen im SUMO-Signalweg beschrieben: Proteine der Siz/PIAS-Familie, für die bisher die größte Anzahl an Substraten identifiziert wurde, RanBP2 und hPc2, für das bisher nur CtBP1 und -2 als Substrate bekannt sind. Diese transkriptionellen Korepressoren werden jedoch auch sowohl durch PIAS als auch durch RanBP2 sumoyliert. Es scheinen also in manchen Fällen mehrere Ligasen für dasselbe Substrat zu existieren. Die drei bisher identifizierten Ligase-Typen zeigen in ihrer Sequenz keinerlei Verwandtschaft, wobei PIAS-Proteine sich durch ihre den RING-Domänen von Ubiquitin-Ligasen des RING-Typs verwandten SP-RING-Domänen auszeichnen.

Topors wurde als Interaktor von p53 und Topoisomerase I identifiziert (Haluska et al., 1999; Zhou et al., 1999). Es besitzt eine klassische RING-Domäne und kolokalisiert mit

PML-Foci (Rasheed et al., 2002). Weiterhin ist Topors selbst ein Substrat für SUMO (Weger et al., 2003).

Topors wurde als Ubiquitin-E3-Ligase für p53 beschrieben (Rajendra et al., 2004). Abb. 7 legt eine Funktion als E3-Ligase für die Sumoylierung von p53 *in vitro* nahe. Topors wäre das erste identifizierte Protein, das gleichzeitig Ubiquitin- als auch SUMO-Ligaseaktivität aufweist. Die Regulation, als welcher Typ von Ligase Topors fungiert, könnte entweder durch Interaktion mit anderen regulatorischen Faktoren oder durch die unterschiedliche Lokalisation von Topors determiniert werden.

## Die Rolle des SUMO/PIAS-Systems im p53-Signalweg

Die funktionelle Konsequenz der SUMO-Modifikation von p53 war lange umstritten. In zwei Publikationen wird die Überexpression von SUMO mit der Aktivierung p53-vermittelter Transkription in Reporterexperimenten korreliert (Gostissa et al., 1999; Rodriguez et al., 1999). Spätere Arbeiten konnten diese Aktivierung jedoch nicht bestätigen (Kwek et al., 2001; Minty et al., 2000). Ferner zeigt eine Mutante, deren primäres Ziellysin zu einem Arginin mutiert ist (p53 K386R) eine leichte Aktivierung der p53-vermittelten Transkription in Reporterexperimenten, was für eine inhibitorische Rolle von SUMO spricht. Unsere Experimente konnten die erhöhte transkriptionelle Aktivität der Mutante p53 K386R bestätigen (Abb. 27). Die inhibitorische Funktion des SUMO-Systems im p53-Signalweg wird durch die Experimente, in denen SUMO und PIAS mit p53 koexprimiert wurden, verdeutlicht: Ohne Zugabe von SUMO verursacht PIAS nur eine moderate Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von p53. Ebenso erhält man bei Expression von SUMO allein nur eine geringe Inhibition der transkriptionellen Aktivität. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass unter diesen Bedingungen nur ein sehr geringer Anteil von p53 sumoyliert wird. Die Expression von PIAS und SUMO, die in einer drastischen Akkumulation der SUMO-modifizierten Form von p53 resultiert, korreliert dagegen mit einer signifikanten Reduktion des Transaktivierungspotenzials.

Weiterhin erfordert die Inhibierung von p53 durch PIAS die Integrität des Zinkfingers und scheint damit auf der E3-Ligaseaktivität von PIAS zu beruhen.

Allerdings zeigen unsere Experimente mit einer Mutante von p53, die in ihrer Hauptsumoylierungsstelle zu einem Arginin mutiert ist (p53 K386R), dass die PIAS-vermittelte Inhibierung der Aktivität von p53 nicht ausschließlich auf die Sumoylierung von p53 an Lysin K386 zurückzuführen ist, da sich diese Mutante nach Expression von PIAS ähnlich wie der Wildtyp verhält. Ursache hierfür könnte einerseits die PIAS-vermittelte Modifikation alternativer Lysinreste sein, die unsere Daten zumindest *in vitro* (Abb. 17) belegen. Darüber hinaus regulieren PIAS-Proteine auch die Sumoylierung anderer Faktoren, wie z. B. Mdm2, im p53 Signalweg. Somit könnten die Effekte von PIAS auf die Aktivität von p53 auch aus der PIAS-vermittelten Regulierung von Mdm2 oder anderen Faktoren im p53-Signalweg resultieren. Denkbar wäre auch, dass die Autosumoylierung von PIAS eine determinierende Funktion bei PIAS-vermittelten Repressionseffekten hat.

Für eine Rolle in der transkriptionellen Repression von SUMO im p53-Signalweg sprechen auch die Daten der Reporterexperimente mit p53-SUMO-Fusions-Konstrukten (Abb. 28). Hierbei zeigte das p53-SUMO-Fusionsprotein eine deutlich

verminderte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Protein p53. Der Vorteil dieses experimentellen Ansatzes besteht darin, dass nicht eine Mischpopulation aus unmodifiziertem und modifiziertem Substrat vorliegt, sondern ein vollständig SUMO-„konjugiertes“ Protein der unmodifizierten Form gegenübergestellt wird. Ein Kritikpunkt an diesem experimentellen System ist zum einen, dass bei der gewählten Fusion von SUMO an den C-Terminus von p53 kein freier N-Terminus von SUMO vorliegt. Zum anderen ist zu bedenken, dass aus der Fusion von SUMO eine unnatürliche Konformationsänderung resultieren könnte, die p53 in seiner Aktivität inhibiert. Kontrollexperimente mit dem Ubiquitin-Fusionsprodukt zeigen jedoch, dass die Fusion mit dem strukturell sehr ähnlichen Ubiquitin-Molekül nicht zur Inaktivierung von p53 führt und stützen damit die These, dass SUMO eine spezifische repressorische Funktion auf die Aktivität von p53 ausübt.

Zusammengenommen bestärken diese Daten den Schluss, dass das SUMO/PIAS-System inhibitorisch auf die transkriptionelle Aktivität von p53 wirkt. In Übereinstimmung hiermit wurde vor kurzem gezeigt, dass die PIAS1-vermittelte Sumoylierung von p73, einem funktionell und strukturell engen Verwandten von p53, ebenfalls seine transkriptionelle Aktivität an verschiedenen Promotoren inhibiert. Die SUMO-Modifikation von p73 scheint dessen Lokalisation durch Rekrutierung an die nukleäre Matrix zu beeinflussen (Munarriz et al., 2004). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Expression einer SUMO-Isopeptidase, die SUMO von p53 abspaltet, die Transaktivierung von p53 stimuliert (Chen and Chen, 2003).

## **SUMO/PIAS in der transkriptionellen Regulation**

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu p53 belegen die wichtige Rolle des SUMO-Systems bei der Regulation transkriptioneller Prozesse und demonstrieren insbesondere die Rolle von SUMO bei der Inhibierung von Transkriptionsfaktoren. Obwohl die Mechanismen hierfür noch weitgehend unklar sind, findet man interessanterweise SUMO-Modifikationsstellen häufig in inhibitorischen oder negativ-regulatorischen Domänen von Transkriptionsfaktoren. In den meisten Fällen handelt es sich um PIAS-responsive SUMO-Substrate. Neben p53 werden u. a. Sp3, IRF-1, Steroidhormonrezeptoren, c-myb, c-jun und C/EBP $\alpha$  in ihrer inhibitorischen Domäne modifiziert (Bies et al., 2002; Dahle et al., 2003; Eaton and Sealy, 2003; Kim et al., 2002; Subramanian et al., 2003). In allen Fällen verstärkt die Mutation der Modifikationsstelle die transkriptionelle Aktivität, was eine inhibitorische Rolle der Modifikation mit SUMO bei diesen Faktoren impliziert. Zum anderen wurde für einige Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Sp3, p53 und Steroidhormonrezeptoren deren inhibitorische Domäne als PIAS-Bindungsstelle festgelegt. Diese funktionelle Überlappung von Sequenzen bzw. Domänen, die einerseits Transkription reprimieren und andererseits Motive darstellen, die als Sumoylierungs- bzw. PIAS-Bindungsstellen dienen, legt eine direkte mechanistische Korrelation zwischen transkriptioneller Repression und dem SUMO-Modifikationssystem nahe. Derzeit werden zwei grundsätzliche Mechanismen hierfür diskutiert:

Die Modifikation mit SUMO und/oder die Interaktion mit PIAS-Proteinen verändert die Lokalisierung eines Transkriptionsfaktors und inhibiert damit seine Aktivität. Ein solches Szenario wurde für LEF-1 (beta-catenin and lymphoid enhancer factor 1) und Sp3

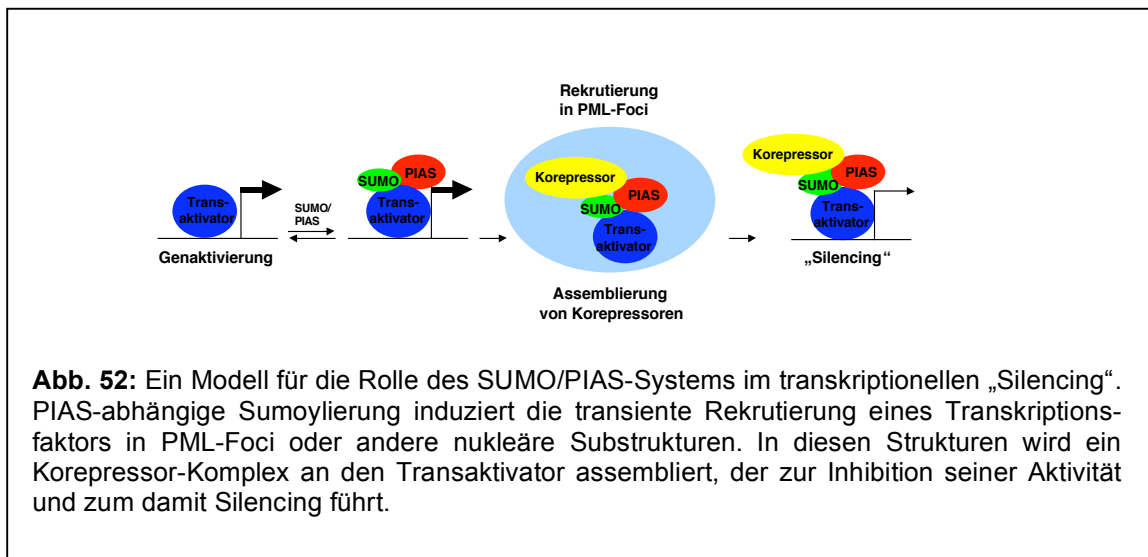
beschrieben. Die inhibitorische Rolle von PIASy gegenüber LEF-1 erfolgt offensichtlich über die PIAS-vermittelte Sequestrierung von LEF-1 in transkriptionell inaktive subnukleäre Strukturen, von denen eine Subpopulation mit PML-Foci kolokalisiert. Die Rekrutierung von LEF-1 in PML-Foci steht der Verfügbarkeit von LEF-1 an seinen Zielgenen entgegen und neutralisiert damit seine transkriptionelle Aktivität. Hierfür ist eine intakte SP-RING-Domäne, und damit offensichtlich die Ligaseaktivität, erforderlich. Allerdings scheint dies nicht direkt mit der Sumoylierung von LEF-1 zu korrelieren, da Versionen von LEF-1, die in den Hauptsumoylierungsstellen mutiert sind, unverändert zum Wildtyp durch PIAS reprimiert werden. Demnach könnte wiederum entweder die PIAS-vermittelte Modifikation alternativer Lysinreste oder die Modifikation anderer Faktoren bzw. die Autosumoylierung von PIAS für die beobachteten Effekte verantwortlich sein (Sachdev et al., 2001). Analog zu LEF-1 wird auch die Aktivität des GC-Box-bindenden Transkriptionsfaktors Sp3 durch SUMO/PIAS-vermittelte Rekrutierung in PML-Foci reprimiert. Hierbei konnte auch ein formaler Zusammenhang zwischen der Modifikation und der Rekrutierung in PML-Foci gezeigt werden, da u. a. die lineare Fusion von SUMO an Sp3 dessen Sequestrierung in PML-Foci bewirkt. Interessanterweise führt die Relokalisierung von Sp3 nicht nur zu einer simplen Neutralisierung der transkriptionellen Aktivität, sondern resultiert in einer Konversion von Sp3 vom Aktivator zum Repressor, was eine aktive Rolle der Sumoylierung bzw. Sequestrierung von Sp3 im transkriptionellen Silencing impliziert (Ross et al., 2002; Sapetschnig et al., 2002). Zusammengenommen zeigen die Daten zu LEF-1 und Sp3, dass die Relokalisierung von Transkriptionsfaktoren in transkriptionell inaktive Strukturen der nukleären Matrix als Folge von Sumoylierung bzw. Bindung von PIAS einen Mechanismus der SUMO/PIAS-vermittelten Repression darstellt.

Ein anderer Mechanismus scheint die Möglichkeit einer SUMO-abhängigen Bindung von, z. B. HDAC-enhaltenden, Korepressoren an Transkriptionsfaktoren zu sein. Ein Beispiel hierfür liefert der transkriptionelle Koregulator p300, der ebenfalls in seiner inhibitorischen Domäne sumoyliert wird. Nach SUMO-Konjugation bindet p300 an HDAC-6, was in seiner Repression resultiert (Girdwood et al., 2003). Ein weiteres Beispiel ist Elk-1; hier resultiert die SUMO-Modifikation in der Rekrutierung von HDAC-2 und somit in der Repression von Zielgenen von Elk-1 (Yang et al., 2003). Ob hierbei jeweils die Sumoylierung die direkte Bindung an HDAC's vermittelt oder die Rekrutierung eines HDAC-bindenden Brückenfaktors unterstützt, ist unklar. Neben Transkriptionsfaktoren werden auch Histone mit SUMO modifiziert. Die Modifikation wird *in vitro* durch PIAS stimuliert (Shiio and Eisenman, 2003) ( Abb. 21). Möglicherweise ist für eine effiziente Repression also nicht nur die Sumoylierung von Transkriptionsfaktoren, sondern auch von Histonen nötig. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit und von anderen gezeigt werden, dass PIAS-Proteine mit Histondeazetylasen interagieren (Abb. 30) (Long et al., 2003; Tussie-Luna et al., 2002). Da PIAS-Proteine außerdem über ihre SUMO-Bindungsdomäne mit SUMO-modifizierten Substratproteinen interagieren (Minty et al., 2000; Sapetschnig et al., 2002), könnten PIAS-Proteine neben ihrer Funktion in der Rekrutierung von Substratproteinen zu spezifischen nukleären Strukturen auch als Assemblierungsfaktoren von HDAC-enhaltenden Repressorkomplexen dienen.

Denkbar ist auch, dass diese beiden Funktionen mechanistisch miteinander verknüpft sind. Hierfür spricht unter anderem, dass transkriptionelle Repressoren wie z. B. HDAC's in den PML-Foci zu finden sind (Khan et al., 2001). Somit könnte die SUMO/PIAS-vermittelte Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren in PML-Foci diese in

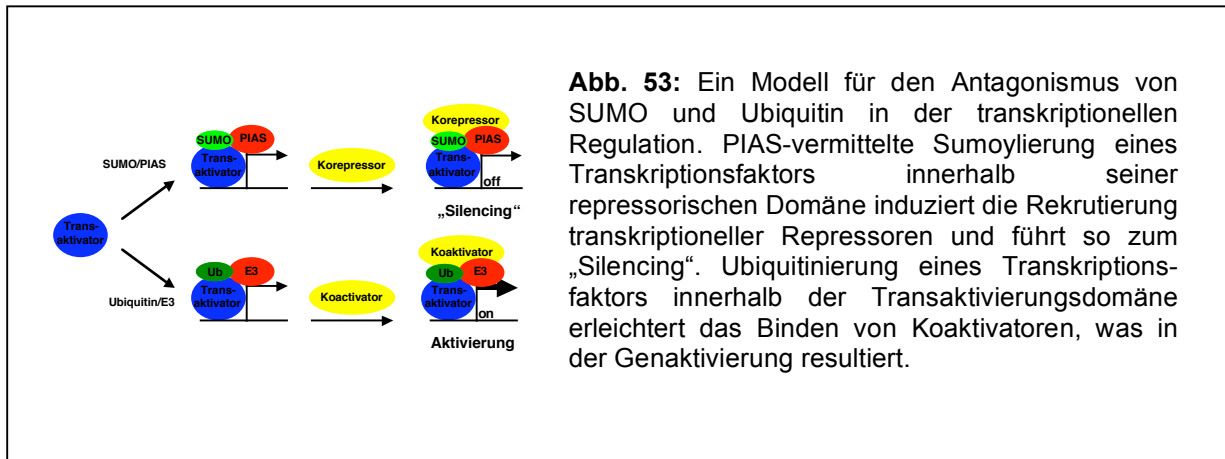
die räumliche Nähe von Repressoren bringen und damit die Assemblierung von Repressorkomplexen erleichtern. Interessanterweise werden neben den jeweiligen Transkriptionsfaktoren auch PIAS und HDAC sumoyliert (David et al., 2002; Kirsh et al., 2002; Kotaja et al., 2002a; Schmidt and Muller, 2002). Eine Möglichkeit wäre, dass die Sumoylierung mehrerer Komponenten die Assemblierung dieser Repressionskomplexe in spezifischen Strukturen, wie PML-Foci, erleichtert. Das Zusammenspiel von SUMO-Modifikation und SUMO-Bindungsmotiven könnte hierbei eine Funktion als „molekularer Klebstoff“ übernehmen. Da p53 ebenfalls in PML-Foci zu finden ist und transkriptionell durch Histondeazetylase-enthaltende Repressorkomplexe inhibiert wird (Guo et al., 2000; Langley et al., 2002), könnte die Rekrutierung in PML-Foci und an HDAC's auch für die inhibitorischen Effekte von PIAS auf p53 verantwortlich sein.

Die Assemblierung von transkriptionellen Korepressoren durch SUMO und PIAS innerhalb subnukleärer Strukturen könnte also einen generellen Mechanismus für die Inhibition der Transkription darstellen. In diesem Modell spielen PIAS-Proteine eine duale Rolle als E3-ähnliche SUMO-Ligasen und als Komponenten oder Assemblierungsfaktoren von transkriptionell koregulatorischen Komplexen (Abb. 52).



Ein ähnlicher Dualismus wurde für einige Ubiquitin-Ligasen beschrieben, die innerhalb der Transaktivierungsdomäne binden und als transkriptionelle Koaktivatoren fungieren (Conaway et al., 2002; Muratani and Tansey, 2003). In vielen instabilen Transkriptionsfaktoren überlappen Regionen, die der Ubiquitinierung unterliegen, mit Transaktivierungsdomänen. Außerdem binden Ubiquitin-Ligasen häufig innerhalb der Transaktivierungsdomäne und fungieren als transkriptionelle Koaktivatoren. Ferner ist die Ubiquitinierung der Transaktivierungsdomäne in mehreren Fällen essentiell für die transkriptionelle Aktivierung. Möglicherweise ist die Bindung von SUMO-Ligasen und/oder die Sumoylierung innerhalb der repressorischen Domänen das funktionelle

Gegenstück zur Ubiquitinierung von Transaktivierungsdomänen (Muratani and Tansey, 2003) (Abb. 53).



### SUMO/PIAS als Regulatoren von PARP-1 und Ku70/Ku80

Zur weiteren Charakterisierung von PIAS-Proteinen wurden mittels eines biochemischen Ansatzes neue zelluläre Bindungspartner von PIAS identifiziert (Abb. 31-34). Als prominenteste Interaktoren von PIASy konnten hierbei PARP-1, Ku70 und Ku80 isoliert werden. Interessanterweise wurde vor kurzem ein Proteinkomplex beschrieben, der mit MAR's (*matrix attachment regions*) assoziiert ist und in dem sich PARP-1, Ku70 und Ku80 befinden (Galante and Kohwi-Shigematsu, 2000; Li et al., 2004; Rodgers et al., 2002). In Übereinstimmung hiermit enthält Ku70 eine N-terminale SAP-Domäne (Aravind and Koonin, 2000). Für eine funktionelle Kooperation von Ku80 und PARP-1 sprechen auch genetische Daten in Mäusen. PARP-1 und Ku70/Ku80 erfüllen diverse Funktionen u. a. in der DNA-Reparatur, Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und der Telomerkontrolle (Hande, 2004; Li et al., 2004).

PARP-1 erkennt und bindet DNA im Signalweg der Basenaustauschreparatur („*base excision repair*“, BER) und der Einzelstrangreparatur („*single strand repair*“). Möglicherweise spielt es zudem eine Rolle im Signalweg der Doppelstrangreparatur („*double strand break repair*“), da Knock-out-Mäuse Defekte in diesem Signalweg aufweisen. Neuere Daten beschreiben eine Rolle von PARP-1 sowohl als strukturelle Komponente in der transkriptionellen Repression (Kim et al., 2004b) als auch als Sensorkomponente des Groucho/TLE1-Repressionskomplexes (Ju et al., 2004). Auch Ku70 und Ku80 sind nach DNA-Doppelstrangbrüchen im Reparatur-Signalweg der nicht-homologen Endverknüpfung („*non homologous end joining*“) involviert (Henrie et al., 2003; Lieber et al., 2003). Hier werden zwei versehrte DNA-Enden ohne die Vorlage eines homologen Templates aneinandergefügt. Das Ku70/Ku80-Heterodimer erkennt DNA-Enden und rekrutiert daraufhin die DNA-Proteinkinase. Diese aktiviert weitere Faktoren, die bei der Progression und der Verknüpfung der DNA-Enden zusammenarbeiten. Weiterhin spielt das Ku70/Ku80-Heterodimer eine regulatorische Rolle in der Aufrechterhaltung der Telomere sowie im transkriptionellen Silencing (Janzen et al., 2004).

Bei vielen der bisher bekannten PIAS-Interaktoren handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. In vielen Fällen sind diese Transkriptionsfaktoren PIAS-sensitive SUMO-Substrate. PIAS-Proteine sind somit in die Regulation der Transkription involviert. Die Identifikation von PARP-1, Ku70 und Ku80 als Interaktoren von PIAS könnten eine neue Rolle von PIAS, nämlich in der DNA-Reparatur, andeuten.

Ku70 und Ku80 sind Substrate für SUMO *in vitro* (Abb. 35). Für das MAR-bindende Protein SATB2 wurde eine PIAS1-sensitive Sumoylierung gezeigt (Dobrova et al., 2003). Die Mutation der SUMO-Akzeptorstelle führt in diesem Fall zu einer verstärkten Assoziation von SATB2 an MAR's. Anscheinend beeinflusst die Modifikation mit SUMO hier die Lokalisation und die Rekrutierung an MAR's. Nachdem Ku70 und Ku80 ebenfalls an die nukleäre Matrix assoziiert sind, könnte ihre Sumoylierung analog ihre Bindung an MAR's beeinflussen (Rodgers et al., 2002).

Für PARP-1 konnte neben der Modifikation mit SUMO auch ein stimulierender Effekt von PIAS bezüglich der Modifikation gezeigt werden (Abb. 36b). Hier konnte die Modifikation mit SUMO von endogenem PARP-1 gezeigt werden (Abb. 38). PARP-1 besitzt in der DNA-Bindedomäne eine, in der Automodifikationsdomäne zwei Modifikationsstellen. Die Sumoylierung der DNA-Bindedomäne legt einen Einfluss der Modifikation auf das DNA-Bindungsverhalten von PARP-1 nahe; es konnte in unseren Experimenten jedoch kein Unterschied bezüglich der DNA-Bindung zwischen modifiziertem und unmodifiziertem PARP-1 festgestellt werden (Abb. 46).

Als weiteres SUMO-Substrat wurde der PARP-1-Interaktor XRCC-1 identifiziert (Abb. 49). Im Signalweg der Basenaustauschreparatur rekrutiert PARP-1 XRCC-1, welches dann wiederum weitere Reparaturenzyme rekrutiert. Die Interaktion mit PARP-1 findet über BRCT-Domänen in beiden Proteinen statt. Darüber hinaus enthält XRCC-1 ein putatives SUMO-Bindungsmotiv, was die Idee aufwirft, ob die Interaktion mit PARP-1 durch die Modifikation von PARP-1 mit SUMO beeinflusst wird. Ein solcher Einfluss konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 48). Denkbar ist jedoch, daß hierzu beide Proteine sumoyliert sein müssen.

Anscheinend bindet PARP-1 in seiner sumoylierten Form besser an PIAS (Abb. 47). Dies passt in oben beschriebenes Modell, in dem SUMO die Interaktion von Proteinen verstärkt und somit die Assemblierung von Komplexen initiiert bzw. stabilisiert. Es wurde gezeigt, daß HDAC6 p300 ausschließlich nach SUMO-Modifikation bindet (Girdwood et al., 2003). In der Regel scheint aber die Sumoylierung die Bindung eher zu modulieren, so bindet z. B. sumoyliertes Sp3 präferentiell an PIAS (Sapetschnig et al., 2002).

## **Chemikalien und Reagenzien**

Sofern nicht anders vermerkt, wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Fluka, Roth, Sigma, Gibco und Merck verwendet. Restriktionsenzyme wurden von den Firmen NEB und Boehringer Mannheim bezogen, Radiochemikalien stammten von Amersham Pharmacia.

## **Mikrobiologische Techniken**

### ***E. coli*-Stämme**

TG1

BL21 pLys

XL1 Blue

XL1 Gold

### **Vektoren zur bakteriellen Expression in *E. coli***

pET28a, -b, -c (Novagen)

pGex-2TK, -4T1, -4T3 (Amersham)

pQE30, -31, -32

### **LB-Medium, LB-Agar**

1% Trypton (Difco)

0.5% Hefeextrakt (Difco)

1% NaCl

(1.5% Agar)

### **CaCl<sub>2</sub>-Lösung zur Herstellung kompetenter Bakterien**

60 mM CaCl<sub>2</sub>

15% Glycerol

10 mM PIPES

steril filtriert

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

Flüssigkulturen in LB-Medium wurden bei 37°C bzw. zur Proteinexpression bei 30°C auf dem Schüttler (200 rpm), Agarplatten bei 37°C inkubiert. Antibiotika zur Selektion transformierter Bakterien wurden in den Konzentrationen 50 µg/ml (Ampicillin), 30 µg/ml (Kanamycin) bzw. 37 µg/ml (Chloramphenicol) eingesetzt. Die Dichte von *E. coli*-Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt. Zur Langzeitlagerung wurden Flüssigkulturen mit Glycerol (Endkonzentration 50%) versetzt und bei -80°C eingefroren.

### **Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Bakterien**

Es wurden sowohl chemisch- (TG1, BL21, XL1 Gold) als auch elektrokompetente (TG1, XL1 Blue) Bakterien verwendet. In beiden Fällen wurde aus einer Einzelkolonie des entsprechenden Stammes eine Übernachtskultur hergestellt. Aus dieser wurden 400 ml



LB-Medium 1:100 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.3-0.4 bei 37°C geschüttelt und danach 10 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 1600 g, 4°C, 7 min ohne Bremse geerntet. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis bzw. im Kühlraum mit gekühlten Materialien und Lösungen durchgeführt.

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurde das Bakterienpellet in 80 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung vorsichtig resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere Sedimentation bei 1100 g, 5 min mit anschließender Resuspension in 10 ml CaCl<sub>2</sub> und 30 min Inkubation auf Eis. Schließlich wurden die Bakterien bei 1100 g 5 min zentrifugiert, in 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und einige Stunden oder über Nacht auf Eis gehalten. Die Bakterien wurden in Aliquots zu 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung elektrokompeter Bakterien wurde das Bakterienpellet in 400 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert und der letzte Schritt in 250 ml Wasser wiederholt. Die Bakterien wurden in 8 ml eiskalter, 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, nochmals zentrifugiert, dann in 1 ml Glycerin-Lösung aufgenommen, in 100 µl-Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **Transformation von *E. coli***

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut.

Für die chemische Transformation wurden 100 µl Bakterien mit 100 ng DNA bzw. 1-4 µl eines Ligationsansatzes versehen und 30 min auf Eis inkubiert. *E. coli* BL21 wurden vor der Zugabe der DNA zusätzlich mit 1.8 µl einer 1:10 Verdünnung 2-ME in Wasser versehen. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C 1 min, bei XL1 Gold 45 s. Es folgte eine zweiminütige Inkubation auf Eis, bevor die Bakterien mit 1 ml LB-Medium versehen und 1 h zur Expression des Resistenzgens bei 37°C geschüttelt wurden. Anschließend wurde der ganze Transformationsansatz auf einer Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen.

Für die Elektroporation wurden 30 µl Bakteriensuspension mit 1 µl dialysiertem Ligationsansatz versehen und 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in eine Küvette (0.1 cm) überführt und bei 1.8 kV und 25 µF elektroporiert. Die Bakterien wurden direkt danach mit 1 ml LB-Medium versehen und 1 h bei 37°C geschüttelt, bevor sie auf den entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen wurden.

### **Expression von Proteinen in *E. coli***

Proteine wurden entweder als Fusion mit GST oder einem His-Epitop exprimiert, um die spätere Aufreinigung über das entsprechende Epitop zu erleichtern. Generell erfolgte die Expression in BL21. Hierzu wurden 500 ml mit 5 ml einer ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4-0.6 bei 37°C hochgezogen. Nach Zugabe von 0.2-1 mM IPTG zur Induktion wurde bei 30°C das entsprechende Protein exprimiert. Nach Zentrifugation bei 5000 g, 20 min wurden die Bakterien im entsprechenden Lysepuffer aufgenommen und bei -20°C über Nacht eingefroren.

## **Molekularbiologische Techniken**

### **Puffer und Lösungen**

#### **TBE-Puffer**

90 mM Tris  
90 mM Borsäure  
2.5 mM EDTA

#### **DNA-Probenpuffer (10x)**

0.5% SDS  
0.25% Bromphenolblau  
25% Glycerol  
25 mM EDTA

### **Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine optische Dichte von eins entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

### **Isolierung von Plasmid-DNA**

Die DNA wurde über Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen nach alkalischer Lyse isoliert. Kleine Mengen DNA (5-10 µg) wurden aus 2 ml-ÜN-Bakterienkulturen gewonnen (Miniprep), für größere Mengen wurden 400 ml-Kulturen (Maxiprep) verwendet. Die Isolierung und Reinigung der Plasmide mittels der Qiagen-Säulen erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers.

### **Restriktionsverdau von DNA**

Die Restriktionsbedingungen wurden entsprechend der Empfehlungen der Hersteller gewählt. Die Konzentration der DNA im Restriktionsansatz betrug 0.1 µg/µl, in der Regel wurde in einem Volumen von 20 µl verdaut. Die Restriktionsansätze wurden 2 h bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Die erforderlichen Salz- und pH-Bedingungen wurden mit den 10-fach konzentrierten Puffern des jeweiligen Enzyms eingestellt.

### **Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Für analytische und präparative Isolierungen von DNA-Fragmenten wurden 1-2 %ige Agarose-Gele verwendet. Die Agarose wurde in 0.5-fachem TBE-Puffer aufgeköcht, in horizontale Gelkammern mit Kämmen für die Geltaschen gegossen und mit Ethidiumbromid (0.2 µg/µl) versetzt. Als Laufpuffer wurde 0.5xTBE verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit DNA-Probenpuffer versetzt. Die angelegte Spannung betrug 110V.

Durch die Interkalation von Ethidiumbromid mit DNA kann die aufgetrennte DNA auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Durch die parallele Auftrennung eines Größenmarkers (1kb DNA-Ladder, Invitrogen) kann die Länge der DNA-Fragmente bestimmt werden.

### **Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die zu isolierende Bande wurde unter langwelligem UV-Licht (324 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers extrahiert. Das isolierte DNA-Fragment wurde dann in einem geeigneten Volumen Wasser (20-30 µl) aufgenommen.

### **Quantitative Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um bei Klonierungen die Religation des Vektors zu vermeiden, wurden 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Hierzu wurde der Vektor nach dem Restriktionsverdau mit ca. 0.1 u CIP (Calf Intestine Phosphatase, (NEB)) versehen und bei 37°C 1 h inkubiert.

### **Ligation von DNA**

Die Mengen der für die Ligationsreaktion eingesetzten DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen abgeschätzt. Für die Ligation wurden das zu klonierende Fragment und der Vektor im Verhältnis 10:1 (ca. 100 ng Vektor) eingesetzt. Zu dem Ligationsansatz (20 µl) wurde 1µl T4 DNA-Ligase (NEB) und die entsprechende Menge ihres Puffers gegeben und das Reaktionsgemisch 1h bei RT inkubiert.

### **Sequenzierung von DNA**

DNA-Sequenzierungen wurden von einem Sequenzierservice im Haus durchgeführt. Die Sequenzierreaktion sowie die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers mit dem Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia). Der Ansatz enthielt 1 µg Plasmid-DNA und 20 pmol des Sequenzierprimers.

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Standard-PCR-Reaktionen fanden in einem Volumen von 50 µl mit 100 ng Plasmid-DNA in einfach konzentriertem PCR-Puffer (entsprechender Puffer der jeweiligen Polymerase) mit jeweils 0.1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0.6 µM der entsprechenden Oligonukleotide (Primer) und 0.2-0.5 u Vent (NEB) oder Pfu-Turbo (Stratagene) statt. Die Amplifizierung wurde in einem „Personal cycler“ (Biometra) durchgeführt. Das Profil der Reaktion richtete sich nach der Quantität und Qualität der Matrizen-DNA, der Länge und dem G/C-Gehalt der beiden Oligonukleotide und der Länge des erwarteten PCR-Fragments.

### **Standard-PCR-Programm:**

95°C 5 min  
(95°C 1 min, 50°C 45 s, 68°C 1 min/kBp), 25-30 Zyklen  
68°C 7 min  
4°C ∞

### **Zielgerichtete *in vitro* Punktmutagenese**

Für einfache oder mehrfache Punktmutationen wurde der QuickChangeXL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Hierfür werden zwei komplementäre Primer mit einer Länge von 25 bis 45 Basen benötigt, die in der Mitte eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz aufweisen. Für die Reaktion wurden Ansätze von 50 µl verwendet (5 µl Pfu Puffer (Stratagene), je 125 ng Primer, 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Pfu

Turbo (Stratagene), 50 ng Plasmid-DNA, 3 µl Quick Solution), und im PCR-Block unter folgenden Bedingungen inkubiert:

95°C 1 min  
(95°C 50 s, 55°C 50 s, 68°C 2 min/kBp) 18 Zyklen  
68°C 7 min  
4°C ∞

Bei der Reaktion wird das gesamte Plasmid amplifiziert. Um die Plasmid-DNA der Matrize zu beseitigen wurde 4 h mit Dpn I, einer Restriktionsendonuklease, die spezifisch methylierte DNA schneidet, bei 37°C verdaut. Anschließend wurde ein 2 µl-Aliquot direkt in *E. coli* XL10 Gold transformiert. Über Sequenzierung wurden die eingefügten Mutationen verifiziert.

## Zellkulturtechniken

### Zelllinien

Hela  
293T  
C33a  
Saos

### Vektoren zur eukaryontischen Expression

pSG5  
pcDNA3.1 (Invitrogen)  
pcDNA3/GS (Invitrogen)  
pRC/CMV  
pCMV-Tag2A, B, C  
pCI

### Zellkultur-Medien

DMEM (Gibco)  
10% FCS

### Transfektion

Für Transfektionen wurden die Zellen jeweils am Vortag in einer Anzahl von  $3 \times 10^5$  (3 cm-Schalen) bzw.  $2.5 \times 10^6$  (10 cm-Schalen) ausgesät. 4-6 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel gegen serumhaltiges DMEM-Medium.

#### a.) Transfektion mit Lipofektamin

Hela-Zellen wurden mit Lipofektamin PLUS laut Angaben des Herstellers in serumfreiem Medium transfiziert. Die Menge an DNA betrug 2-4 µg für einen Ansatz von 200 µl für  $3 \times 10^5$  Zellen (3 cm-Schale). Das jeweilige Verhältnis der DNA-Mengen wurde je nach Anwendung optimiert. In Hela-Zellen führte eine Menge von 5 µl PLUS-Reagenz und 3 µl Lipofektamin pro Ansatz zur höchsten Transfektionseffizienz.

b.) Transfektion nach der Calcium-Chlorid-Methode

Für 293T- und C33a-Zellen wurde die Calcium-Chlorid-Präzipitation angewendet. Für  $2.5 \times 10^6$  Zellen (10 cm-Schale) wurde eine Gesamtmenge von 10 µg DNA in 450 µl Wasser vorgelegt und mit 50 µl einer 2.5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung versehen. Unter Vortexen wurden 500 µl HBS-Puffer tropfenweise zugefügt. Zur Bildung des Präzipitats wurde der Ansatz 45 min bei RT inkubiert, bevor er unter Vortexen tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde.

## **Proteinbiochemische Techniken**

### **Puffer und Lösungen**

#### **Sammelgel/Trenngelpuffer**

0.5 M Tris, pH 6.8/1.5 M Tris, pH 8.8

#### **Elektrophorese-Laufpuffer**

60 mM Tris

0.55% Glycin

0.1% SDS

#### **Protein-Probenpuffer (6x)**

310 mM Tris/HCl pH 6.8

10% SDS

3.5 M 2-ME

50% Glycerol

1% Bromphenolblau

#### **Protein-Transferpuffer**

250 mM Tris

1.92 M Glycin

0.1% SDS

20% Methanol

#### **PBS**

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

pH 7.4

#### **PBS-T**

PBS

0.1% Tween

**Assay-Puffer**

20 mM Tris  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9.8

**Ni-NTA-Anreicherung (denaturierend)**

**Lysepuffer und Waschpuffer A**

8 M Urea  
100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris/HCl pH 6.8  
(zus. 0.05% Tween-20 bei Lysepuffer)  
pH 6.8

**Waschpuffer B**

8 M Urea  
100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
10 mM Tris/HCl pH 8.0  
pH 8.0

**Puffer zur Reinigung von in Bakterien exprimierten Proteinen**

**a.) GST-Reinigung:**

**Lysepuffer**

PBS  
1% Triton  
1 mM DTT  
1 mg/ml Lysozym (Merck)  
1 mM PMSF

**Waschpuffer**

wie Lysepuffer ohne Lysozym

**Elutionspuffer**

50 mM Tris/HCl pH 8.0  
10 mM Glutathion (Merck)

**b.) Reinigung über ein His-Epitop:**

**Lysepuffer**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
30 mM NaCl  
1% Triton X-100  
1 mg/ml Lysozym  
14 mM Imidazol  
1 mM PMSF

### **Waschpuffer**

wie Lysepuffer, nur ohne Lysozym und mit 20 mM Imidazol

### **Elutionspuffer**

wie Waschpuffer mit 250 mM Imidazol

### **Puffer für *in vitro*-Modifikationen (10-fach)**

500 mM Tris pH 7.5

50 mM MgCl<sub>2</sub>

20 mM ATP

### **DNA-Bindepuffer**

12% Glycerol

12 mM HEPES

4 mM Tris pH 8.0

150 mM KCl

1 mM EDTA

1 mM DTT

### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Proteinbestimmungen wurden nach Bradford mit dem „BioRad-Proteinassay“ (Biorad) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurden BSA-Lösungen bekannter Konzentration verwendet.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung von Proteinen über denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gele nach Laemmli wurden 7.5-15%ige Trenngellösungen hergestellt (Angaben für vier Gele: 12.5-25 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid, 12 ml Trenngelpuffer, 500 µl 10% SDS, auf 50 ml mit Wasser aufgefüllt, 300 µl 10%APS, 120 µl TEMED) und in hausgefertigte Gießkammern gegossen. Nach dem Gießen wurden die Trenngele mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Alkohol entfernt und ein 4 %iges Sammelgel (für vier Gele: 5 ml 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid, 7.5 ml Sammelgelpuffer, 300 µl 10% SDS, 17 ml H<sub>2</sub>O, 200 µl APS, 100 µl TEMED) gegossen und die Geltaschen mit einem geeigneten Kamm gesteckt. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt, durch Erhitzen (5-30 min bei 95°C) denaturiert, auf das Gel aufgetragen und bei einer Stromstärke von 140 V aufgetrennt (Molekulargewichts-Standard: Precision Plus All blue Standards, Biorad).

### **Coomassie-Färbung von Proteingelen**

Um Proteinbanden zu visualisieren, wurden Polyacrylamid-Gele drei mal 5 min in Wasser zur Entfernung des SDS gewaschen, 10-90 min in Gelcode-Lösung (Pierce) gefärbt und anschließend bis zur Klärung des Hintergrunds in Wasser entfärbt.

### **Western Blot**

Proteine wurden unmittelbar nach der Elektrophorese in einer hausgefertigten Semidry-Blot-Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C Extra, Amersham) überführt. Hierzu wurden drei Whatman-Papiere in Gelgröße in Transferpuffer getränkt und mit der in Wasser äquilibrierten und anschließend ebenfalls in Transferpuffer getränkten

Membran, dem in Transferpuffer getränktem Gel und wiederum drei getränktem Whatman-Papieren überschichtet. Zum Entfernen von Luftblasen wurde einige Male mit einer Glaspipette über den Aufbau gerollt. Der Transfer erfolgte 1 h bei Proteinen unter 40 kDa, 1.5 h bei Proteinen von 40-100 kDa und 2 h bei Proteinen über 100 kDa bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA.

### **Immunologischer Nachweis von membrangebundenen Proteinen**

Zur Besetzung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran mit den immobilisierten Proteinen 30 min bei RT in Block-Puffer (Tropix) geschwenkt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte 1 h bei RT in PBS-T. Die Membran wurde dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit einem sekundären, AP-markierten Antikörper in einer 1:10.000-Verdünnung in Blocking-Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T wie oben erfolgte ein zweimaliger Waschschrift von je 2 min mit Assay-Puffer und anschließend die Detektion mittels Chemolumineszenz (CDP-Star Western Kit, Tropix) nach Herstellerangaben auf ECL-Hyperfilm (Amersham).

### **Reinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien unter nativen Bedingungen**

Die Reinigung von in *E. coli* BL21 exprimierten rekombinanten Proteinen mit GST-Fusionsanteilen bzw. His-Epitopen erfolgte mittels Affinitätsreinigung unter Verwendung von Glutathion-Sepharose (Pharmacia) bzw. Nickel-NTA-Agarose (Qiagen) unter nativen Bedingungen und nach Angaben der Hersteller. Das Bakteriensediment wurde in 20-40 ml des jeweiligen Lysepuffers mit frisch zugesetzten Proteaseinhibitoren resuspendiert und die Bakterien durch einen dreimaligen Gefrier/Tau-Zyklus (-20°C ÜN/37°C, zweimal -80°C/37°C) lysiert und das Lysat zur Scherung der DNA sonifiziert (16%) bis aus dem viskösen Lysat eine tropfbare Lösung entstand. Nach 30 min Zentrifugation bei 10.000 g erfolgte die Bindung des Überstands an die entsprechende Matrix (1ml Gelsuspension/20 ml Lysat, durch dreimaliges Waschen mit Bindepuffer äquilibriert) 2 h bei 4°C auf einem Roller. Das Gelbett wurde bei 500 g abzentrifugiert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Das gereinigte rekombinante Protein wurde zwei- bis dreimal mit je 0.5 ml des entsprechenden Elutionspuffers eluiert, gegen 50 mM Tris pH 7.5 dialysiert und mittels SDS-Gelelektrophorese auf seine Anwesenheit und Reinheit überprüft. Alle Schritte erfolgten mit vorgekühlten Materialien bei 4°C.

### ***In vitro*-Modifikation mit SUMO**

Als Substrate wurden <sup>35</sup>S-markierte, *in vitro* translatierte (TNT quick coupled reticulocyte lysate system Kit, Promega) oder rekombinant generierte Proteine verwendet. Die Detektion von SUMO-Konjugaten erfolgte dementsprechend über Autoradiographie bzw. Western Blot. Die *in vitro*-Modifikation erfolgte in einem 20 µl-Ansatz mit 1-2 µl Translationsprodukt bzw. 50 ng rekombinantem Protein mit 100 ng E1, 10-100 ng Ubc9, 3 µg SUMO und gegebenenfalls 100 ng PIAS in Modifikationspuffer 2 h bei 30°C. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und entsprechend weiter analysiert.

### **Nachweis von SUMO-Modifikation *in vivo***

Die Modifikation von Proteinen mit SUMO wurden an exo- oder an endogen exprimierten Substraten gezeigt. 3x10<sup>5</sup> Hela-Zellen wurden mit 0.8 µg SUMO, gegebenenfalls 2 µg PIAS und/oder 1 µg des Substrats transfiziert, nach 24 oder 48 h



durch direkte Zugabe von 200 µl SDS-Probenpuffer lysiert und bei 95°C aufgeköcht. 5-20 µl des Zelllysats wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Modifikation mittels Western Blot gegen das Substrat nachgewiesen.

### **Denaturierende Anreicherung von SUMO-Konjugaten**

Hela-Zellen wurden mit dem jeweiligen Substrat und einer das His-Epitop exprimierenden SUMO-Version transfiziert und die modifizierten Proteine über Ni-NTA-Agarose isoliert. Hierzu wurden die Zellen 48 h nach Transfektion mit 200 µl Nickel-Lysepuffer lysiert und davon 20 µl als Input abgenommen und mit 5 µl 6xSDS-Probenpuffer aufgeköcht. Alternativ wurden die Inputs aus der direkten Lyse in SDS-Probenpuffer von Paralleltransfektionen erhalten. Die restlichen 180 µl des Lysats wurden mit Lysepuffer auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und 30 min bei 95°C aufgeköcht. Zur Entfernung der genomischen DNA wurde das Lysat 25 min bei RT in der Tischzentrifuge zentrifugiert (16.000 g) und der Überstand mit 15 µl Ni-NTA-Agarose magnetic beads (Qiagen) versehen. Zur Bindung des His-Epitops wurde ÜN auf einem Rad bei RT inkubiert. Die magnetischen Kügelchen wurden je dreimal mit 800 µl Waschpuffer A und B sowie einmal mit PBS gewaschen und in 20 µl 2xSDS-Probenpuffer aufgeköcht.

### **Immunpräzipitation von Proteinen**

Durch Immunpräzipitation wurden spezifisch Proteine aus einem Zellextrakt isoliert. Dafür wurden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen in Immunpräzipitationspuffer (IP-Puffer) lysiert und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (30 min bei 4°C, 16.000 g) entfernt. Der Überstand wurde mit 20 µl ProteinG-Agarose (Roche) und 2 µg eines gegen das zu präzipitierende Protein gerichteten Antikörpers versehen, bzw. im Fall von mit dem Flag-Epitop fusionierten Proteinen mit 20 µl gebrauchsfertiger Anti-Flag M2-Agarose (Sigma). Die Bindung erfolgte 2 h bei 4°C auf dem Rad. Anschließend wurden die Agarosekügelchen dreimal in IP-Puffer gewaschen (zwischendurch je durch Zentrifugation sedimentiert). Die Flüssigkeit wurde dann möglichst vollständig abgenommen. Zur Elution der Proteine wurden die Kügelchen mit 20 µl 2xSDS-Probenpuffer versehen und aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und die Immunpräzipitation bzw. Koimmunpräzipitation von Proteinen im Western Blot nachgewiesen.

Zur Identifizierung von zellulären Interaktoren wurde das Flag-fusionierte Bait in präparativem Maßstab aus ca.  $1 \times 10^8$  293T-Zellen gereinigt. Hierzu wurde das Lysat zehnmal über eine mit 200 µl Flag-Agarose bepackten Pierce-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule fünfmal mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen und die gebundenen Proteine in 30 Fraktionen à 10 µl gesammelt. Die Fraktionen wurden mit Probenpuffer versehen und auf Gradientengelen aufgetrennt. Die zusätzlich zum Bait sichtbaren Banden wurden ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen.

### **Bestimmung der transkriptionellen Aktivität**

Das Potenzial eines gegebenen Proteins zur Transaktivierung wurde in Reportergenexperimenten bestimmt. Hierzu wurden  $3 \times 10^5$  Zellen mit den zu testenden Transkriptionsfaktoren zusammen mit Reportergen, die in ihren Promotoren entsprechende Bindungsstellen besitzen, transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde ein Luziferase-Kontrollvektor aus *Renilla reniformis*

kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in 300  $\mu$ l passivem Lysepuffer lysiert, von denen 20  $\mu$ l mit dem Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) nach Angaben des Herstellers analysiert wurden.

## Referenzen

- Abraham, J., Kelly, J., Thibault, P., and Benchimol, S. (2000). Post-translational modification of p53 protein in response to ionizing radiation analyzed by mass spectrometry. *J Mol Biol* 295, 853-864.
- Akiyama, T., Takasawa, S., Nata, K., Kobayashi, S., Abe, M., Shervani, N. J., Ikeda, T., Nakagawa, K., Unno, M., Matsuno, S., and Okamoto, H. (2001). Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta-cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosylation). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 48-53.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Ame, J. C., Apiou, F., Jacobson, E. L., and Jacobson, M. K. (1999). Assignment of the poly(ADP-ribose) glycohydrolase gene (PARG) to human chromosome 10q11.23 and mouse chromosome 14B by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 85, 269-270.
- Ame, J. C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26, 882-893.
- Anderson, M. G., Scoggin, K. E., Simbulan-Rosenthal, C. M., and Steadman, J. A. (2000). Identification of poly(ADP-ribose) polymerase as a transcriptional coactivator of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol* 74, 2169-2177.
- Aravind, L., and Koonin, E. V. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* 25, 112-114.
- Bailey, D., and O'Hare, P. (2002). Herpes simplex virus 1 ICP0 co-localizes with a SUMO-specific protease. *J Gen Virol* 83, 2951-2964.
- Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S., and Prakash, L. (1997). Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem* 272, 23360-23365.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J. (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-286.
- Best, J. L., Ganiatsas, S., Agarwal, S., Changou, A., Salomoni, P., Shirihai, O., Meluh, P. B., Pandolfi, P. P., and Zon, L. I. (2002). SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell* 10, 843-855.
- Bies, J., Markus, J., and Wolff, L. (2002). Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem* 277, 8999-9009.
- Bouillet, P., and Strasser, A. (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115, 1567-1574.
- Buki, K. G., Bauer, P. I., Hakam, A., and Kun, E. (1995). Identification of domains of poly(ADP-ribose) polymerase for protein binding and self-association. *J Biol Chem* 270, 3370-3377.
- Busch, H., and Goldknopf, I. L. (1981). Ubiquitin - protein conjugates. *Mol Cell Biochem* 40, 173-187.
- Butler, A. J., and Ordahl, C. P. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 19, 296-306.
- Bylebyl, G. R., Belichenko, I., and Johnson, E. S. (2003). The SUMO isopeptidase Ulp2 prevents accumulation of SUMO chains in yeast. *J Biol Chem* 278, 44113-44120.
- Caldecott, K. W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2, 955-969.
- Carr, A. M. (2000). Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science* 287, 1765-1766.
- Casciola-Rosen, L., Nicholson, D. W., Chong, T., Rowan, K. R., Thornberry, N. A., Miller, D. K., and Rosen, A. (1996). Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 183, 1957-1964.
- Cervellera, M. N., and Sala, A. (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem* 275, 10692-10696.
- Chakrabarti, S. R., Sood, R., Nandi, S., and Nucifora, G. (2000). Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13281-13285.
- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, 616-620.
- Chen, L., and Chen, J. (2003). MDM2-ARF complex regulates p53 sumoylation. *Oncogene* 22, 5348-5357.
- Cherney, B. W., McBride, O. W., Chen, D. F., Alkhatib, H., Bhatia, K., Hensley, P., and Smulson, M. E. (1987). cDNA sequence, protein structure, and chromosomal location of the human gene for poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8370-8374.

## Referenzen

- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* **278**, 1803-1805.
- Conaway, R. C., Brower, C. S., and Conaway, J. W. (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254-1258.
- Dahle, O., Andersen, T. O., Nordgard, O., Matre, V., Del Sal, G., and Gabrielsen, O. S. (2003). Transactivation properties of c-Myb are critically dependent on two SUMO-1 acceptor sites that are conjugated in a PIASy enhanced manner. *Eur J Biochem* **270**, 1338-1348.
- Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* **39**, 7559-7569.
- David, G., Neptune, M. A., and DePinho, R. A. (2002). SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem* **277**, 17171-17176.
- Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E. B., and Poirier, G. G. (2001). Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* **268**, 7-13.
- Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R., and Silverman, R. H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15623-15628.
- Deshaies, R. J. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 435-467.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* **2**, 233-239.
- Desterro, J. M., Thomson, J., and Hay, R. T. (1997). Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Lett* **417**, 297-300.
- Dittmar, G. A., Wilkinson, C. R., Jedrzejewski, P. T., and Finley, D. (2002). Role of a ubiquitin-like modification in polarized morphogenesis. *Science* **295**, 2442-2446.
- Dobrev, G., Dambacher, J., and Grosschedl, R. (2003). SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes Dev* **17**, 3048-3061.
- Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de The, H., Hay, R. T., and Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* **112**, 381-393.
- Eaton, E. M., and Sealy, L. (2003). Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3. *J Biol Chem* **278**, 33416-33421.
- Enkel, C., Lehmann, A., and Kloetzel, P. M. (1999). GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol Biol Rep* **26**, 131-135.
- Farrell, P. J., Broeze, R. J., and Lengyel, P. (1979). Accumulation of an mRNA and protein in interferon-treated Ehrlich ascites tumour cells. *Nature* **279**, 523-525.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *Embo J* **19**, 6185-6195.
- Galante, S., and Kohwi-Shigematsu, T. (2000). Caught in the act: binding of Ku and PARP to MARs reveals novel aspects of their functional interaction. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**, 63-72.
- Gallagher, W. M., Argentini, M., Sierra, V., Bracco, L., Debussche, L., and Conseiller, E. (1999). MBP1: a novel mutant p53-specific protein partner with oncogenic properties. *Oncogene* **18**, 3608-3616.
- Gan-Erdene, T., Nagamalleswari, K., Yin, L., Wu, K., Pan, Z. Q., and Wilkinson, K. D. (2003). Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem* **278**, 28892-28900.
- Germain, M., Affar, E. B., D'Amours, D., Dixit, V. M., Salvesen, G. S., and Poirier, G. G. (1999). Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* **274**, 28379-28384.
- Giaccia, A. J., and Kastan, M. B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* **12**, 2973-2983.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**, 1043-1054.
- Goehring, A. S., Rivers, D. M., and Sprague, G. F., Jr. (2003). Attachment of the ubiquitin-related protein Urm1p to the antioxidant protein Ahp1p. *Eukaryot Cell* **2**, 930-936.
- Gong, L., Li, B., Millas, S., and Yeh, E. T. (1999). Molecular cloning and characterization of human AOS1 and UBA2, components of the sentrin-activating enzyme complex. *FEBS Lett* **448**, 185-189.

## Referenzen

- Goodson, M. L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (2001). Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* 276, 18513-18518.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18, 6462-6471.
- Gottlieb, T. M., and Oren, M. (1998). p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 8, 359-368.
- Gross, M., Liu, B., Tan, J., French, F. S., Carey, M., and Shuai, K. (2001). Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells. *Oncogene* 20, 3880-3887.
- Grossman, S. R., Deato, M. E., Brignone, C., Chan, H. M., Kung, A. L., Tagami, H., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-344.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Paolo Pandolfi, P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-736.
- Ha, H. C., Hester, L. D., and Snyder, S. H. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3270-3275.
- Haluska, P., Jr., Saleem, A., Rasheed, Z., Ahmed, F., Su, E. W., Liu, L. F., and Rubin, E. H. (1999). Interaction between human topoisomerase I and a novel RING finger/arginine-serine protein. *Nucleic Acids Res* 27, 2538-2544.
- Hande, M. P. (2004). DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res* 104, 116-122.
- Hang, J., and Dasso, M. (2002). Association of the human SUMO-1 protease SENP2 with the nuclear pore. *J Biol Chem* 277, 19961-19966.
- Harper, J. W. (2004). Neddylation the guardian; Mdm2 catalyzed conjugation of Nedd8 to p53. *Cell* 118, 2-4.
- Hassa, P. O., and Hottiger, M. O. (1999). A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* 380, 953-959.
- Hassa, P. O., and Hottiger, M. O. (2002). The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* 59, 1534-1553.
- Hendrix, M. J. (2000). De-mystifying the mechanism(s) of maspin. *Nat Med* 6, 374-376.
- Henrie, M. S., Kurimasa, A., Burma, S., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., Li, G. C., and Chen, D. J. (2003). Lethality in PARP-1/Ku80 double mutant mice reveals physiological synergy during early embryogenesis. *DNA Repair (Amst)* 2, 151-158.
- Hershko, A. (1983). Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* 34, 11-12.
- Hicke, L. (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* 9, 107-112.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Hochstrasser, M. (1996). Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 84, 813-815.
- Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, 5-8.
- Hochstrasser, M. (2002). New structural clues to substrate specificity in the "Ubiquitin System". *Mol Cell* 9, 453-454.
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Hofmann, H., Floss, S., and Stamminger, T. (2000). Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J Virol* 74, 2510-2524.
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Mayhew, C. N., Goodson, M., Park-Sarge, O. K., and Sarge, K. D. (2001). Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 276, 40263-40267.
- Hori, T., Osaka, F., Chiba, T., Miyamoto, C., Okabayashi, K., Shimbara, N., Kato, S., and Tanaka, K. (1999). Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* 18, 6829-6834.
- Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H., and Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 115, 565-576.

## Referenzen

- Ikejima, M., Noguchi, S., Yamashita, R., Ogura, T., Sugimura, T., Gill, D. M., and Miwa, M. (1990). The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *J Biol Chem* 265, 21907-21913.
- Janzen, C. J., Lander, F., Dreesen, O., and Cross, G. A. (2004). Telomere length regulation and transcriptional silencing in KU80-deficient *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 32, 6575-6584.
- Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K. H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J. N., *et al.* (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 4, 321-328.
- Jentsch, S., McGrath, J. P., and Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* 329, 131-134.
- Jentsch, S., and Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* 10, 335-342.
- Joazeiro, C. A., and Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.
- Johnson, E. S., and Blobel, G. (1997). Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem* 272, 26799-26802.
- Johnson, E. S., and Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-744.
- Ju, B. G., Solum, D., Song, E. J., Lee, K. J., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2004). Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase Ildelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* 119, 815-829.
- Junicho, A., Matsuda, T., Yamamoto, T., Kishi, H., Korkmaz, K., Saatcioglu, F., Fuse, H., and Muraguchi, A. (2000). Protein inhibitor of activated STAT3 regulates androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 9-13.
- Kadoya, T., Yamamoto, H., Suzuki, T., Yukita, A., Fukui, A., Michiue, T., Asahara, T., Tanaka, K., Asashima, M., and Kikuchi, A. (2002). Desumoylation Activity of Axam, a Novel Axin-Binding Protein, Is Involved in Downregulation of beta-Catenin. *Mol Cell Biol* 22, 3803-3819.
- Kagey, M. H., Melhuish, T. A., and Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-137.
- Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8, 713-718.
- Kaminker, P. G., Kim, S. H., Taylor, R. D., Zebarjadian, Y., Funk, W. D., Morin, G. B., Yaswen, P., and Campisi, J. (2001). TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 276, 35891-35899.
- Kannan, P., Yu, Y., Wankhade, S., and Tainsky, M. A. (1999). PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 27, 866-874.
- Kaye, F. J., Modi, S., Ivanovska, I., Koonin, E. V., Thress, K., Kubo, A., Kornbluth, S., and Rose, M. D. (2000). A family of ubiquitin-like proteins binds the ATPase domain of Hsp70-like Stch. *FEBS Lett* 467, 348-355.
- Khan, M. M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P. P., and Ishii, S. (2001). Role of PML and PML-RARalpha in Mad-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 7, 1233-1243.
- Kickhoefer, V. A., Siva, A. C., Kedersha, N. L., Inman, E. M., Ruland, C., Streuli, M., and Rome, L. H. (1999). The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* 146, 917-928.
- Kim, J., Cantwell, C. A., Johnson, P. F., Pfarr, C. M., and Williams, S. C. (2002). Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J Biol Chem* 277, 38037-38044.
- Kim, J. W., Kim, K., Kang, K., and Joe, C. O. (2000). Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J Biol Chem* 275, 8121-8125.
- Kim, K. I., Giannakopoulos, N. V., Virgin, H. W., and Zhang, D. E. (2004a). Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation ISG15, not just another ubiquitin-like protein. *Mol Cell Biol* 24, 9592-9600.
- Kim, M. Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J. T., and Kraus, W. L. (2004b). NAD<sup>+</sup>-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 119, 803-814.

## Referenzen

- Kim, Y. H., Choi, C. Y., and Kim, Y. (1999). Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 12350-12355.
- Kipp, M., Gohring, F., Ostendorp, T., van Drunen, C. M., van Driel, R., Przybylski, M., and Fackelmayer, F. O. (2000). SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol Cell Biol* *20*, 7480-7489.
- Kirsh, O., Seeler, J. S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F., and Dejean, A. (2002). The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J* *21*, 2682-2691.
- Klionsky, D. J., and Ohsumi, Y. (1999). Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* *15*, 1-32.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* *96*, 635-644.
- Kotaja, N., Aittomaki, S., Silvennoinen, O., Palvimo, J. J., and Janne, O. A. (2000). ARIP3 (androgen receptor-interacting protein 3) and other PIAS (protein inhibitor of activated STAT) proteins differ in their ability to modulate steroid receptor-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol* *14*, 1986-2000.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002a). The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1. *J Biol Chem* *277*, 30283-30288.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2002b). PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* *22*, 5222-5234.
- Kurosaki, T., Ushiro, H., Mitsuuchi, Y., Suzuki, S., Matsuda, M., Matsuda, Y., Katunuma, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., and et al. (1987). Primary structure of human poly(ADP-ribose) synthetase as deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem* *262*, 15990-15997.
- Kwek, S. S., Derry, J., Tyner, A. L., Shen, Z., and Gudkov, A. V. (2001). Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1. *Oncogene* *20*, 2587-2599.
- Lambert, P. F., Kashanchi, F., Radonovich, M. F., Shiekhhattar, R., and Brady, J. N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem* *273*, 33048-33053.
- Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J. M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M., and Estelle, M. (1998). Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev* *12*, 914-926.
- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U. M., Frye, R. A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Kouzarides, T. (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo J* *21*, 2383-2396.
- Lavrik, O. I., Prasad, R., Sobol, R. W., Horton, J. K., Ackerman, E. J., and Wilson, S. H. (2001). Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair. *J Biol Chem* *276*, 25541-25548.
- Leppard, J. B., Dong, Z., Mackey, Z. B., and Tomkinson, A. E. (2003). Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* *23*, 5919-5927.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* *88*, 323-331.
- Li, B., Navarro, S., Kasahara, N., and Comai, L. (2004). Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* *279*, 13659-13667.
- Li, S. J., and Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* *398*, 246-251.
- Li, S. J., and Hochstrasser, M. (2000). The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* *20*, 2367-2377.
- Li, Y., Wang, H., Wang, S., Quon, D., Liu, Y. W., and Cordell, B. (2003). Positive and negative regulation of APP amyloidogenesis by sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 259-264.
- Liakopoulos, D., Busgen, T., Brychzy, A., Jentsch, S., and Pause, A. (1999). Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 5510-5515.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., and Jentsch, S. (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *Embo J* *17*, 2208-2214.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 712-720.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 10626-10631.

## Referenzen

- Long, J., Matsuura, I., He, D., Wang, G., Shuai, K., and Liu, F. (2003). Repression of Smad transcriptional activity by PIASy, an inhibitor of activated STAT. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9791-9796.
- Losko, S., Kopp, F., Kranz, A., and Kolling, R. (2001). Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the *doa4* Mutant. *Mol Biol Cell* *12*, 1047-1059.
- Lowe, S. W. (1999). Activation of p53 by oncogenes. *Endocr Relat Cancer* *6*, 45-48.
- Luders, J., Demand, J., Papp, O., and Hohfeld, J. (2000). Distinct isoforms of the cofactor BAG-1 differentially affect Hsc70 chaperone function. *J Biol Chem* *275*, 14817-14823.
- Luders, J., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2003). The ubiquitin-like protein HUB1 forms SDS-resistant complexes with cellular proteins in the absence of ATP. *EMBO Rep* *4*, 1169-1174.
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* *107*, 137-148.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* *88*, 97-107.
- Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Kim, K. I., Ritchie, K. J., and Zhang, D. E. (2002). UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem* *277*, 9976-9981.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* *18*, 3563-3571.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P. A., and Roeder, R. G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem* *255*, 11992-11996.
- Matunis, M. J., Wu, J., and Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* *140*, 499-509.
- Matuschewski, K., Hauser, H. P., Treier, M., and Jentsch, S. (1996). Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *J Biol Chem* *271*, 2789-2794.
- Mazen, A., Menissier-de Murcia, J., Molinete, M., Simonin, F., Gradwohl, G., Poirier, G., and de Murcia, G. (1989). Poly(ADP-ribose)polymerase: a novel finger protein. *Nucleic Acids Res* *17*, 4689-4698.
- McNally, T., Huang, Q., Janis, R. S., Liu, Z., Olejniczak, E. T., and Reilly, R. M. (2003). Structural analysis of UBL5, a novel ubiquitin-like modifier. *Protein Sci* *12*, 1562-1566.
- Meek, D. W. (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* *18*, 7666-7675.
- Meek, D. W. (2004). The p53 response to DNA damage
- Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *DNA Repair (Amst)* *3*, 1049-1056.
- Megidish, T., Xu, J. H., and Xu, C. W. (2002). Activation of p53 by protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1). *J Biol Chem* *277*, 8255-8259.
- Melchior, F. (2000). Sumo Nonclassical Ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 591-626.
- Mendoza, H. M., Shen, L. N., Botting, C., Lewis, A., Chen, J., Ink, B., and Hay, R. T. (2003). NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates Cullins. *J Biol Chem* *278*, 25637-25643.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* *275*, 36316-36323.
- Miyauchi, Y., Yogosawa, S., Honda, R., Nishida, T., and Yasuda, H. (2002). Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J Biol Chem* *277*, 50131-50136.
- Mo, Y. Y., Yu, Y., Shen, Z., and Beck, W. T. (2002). Nucleolar delocalization of human topoisomerase I in response to topotecan correlates with sumoylation of the protein. *J Biol Chem* *277*, 2958-2964.
- Moilanen, A. M., Karvonen, U., Poukka, H., Yan, W., Toppari, J., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (1999). A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *J Biol Chem* *274*, 3700-3704.
- Momand, J., Wu, H. H., and Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* *242*, 15-29.
- Mossessova, E., and Lima, C. D. (2000). Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol Cell* *5*, 865-876.
- Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J. S., Haupt, Y., and Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* *275*, 13321-13329.
- Muller, S., and Dejean, A. (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* *73*, 5137-5143.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 202-210.



## Referenzen

- Muller, S., Matunis, M. J., and Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17, 61-70.
- Munarriz, E., Barcaroli, D., Stephanou, A., Townsend, P. A., Maisse, C., Terrinoni, A., Neale, M. H., Martin, S. J., Latchman, D. S., Knight, R. A., *et al.* (2004). PIAS-1 is a checkpoint regulator which affects exit from G1 and G2 by sumoylation of p73. *Mol Cell Biol* 24, 10593-10610.
- Muratani, M., and Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.
- Nelson, V., Davis, G. E., and Maxwell, S. A. (2001). A putative protein inhibitor of activated STAT (PIASy) interacts with p53 and inhibits p53-mediated transactivation but not apoptosis. *Apoptosis* 6, 221-234.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., and *et al.* (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.
- Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Nie, J., Sakamoto, S., Song, D., Qu, Z., Ota, K., and Taniguchi, T. (1998). Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* 424, 27-32.
- Nirodi, C., NagDas, S., Gygi, S. P., Olson, G., Aebersold, R., and Richmond, A. (2001). A role for poly(ADP-ribose) polymerase in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression. *J Biol Chem* 276, 9366-9374.
- Nishida, T., Kaneko, F., Kitagawa, M., and Yasuda, H. (2001). Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat axam, which is an axin-binding protein promoting beta-catenin degradation. *J Biol Chem* 276, 39060-39066.
- Nishida, T., Tanaka, H., and Yasuda, H. (2000). A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem* 267, 6423-6427.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000a). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., and Taya, Y. (2000b). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.
- Oei, S. L., Griesenbeck, J., Schweiger, M., and Ziegler, M. (1998). Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosylation) of transcription factors. *J Biol Chem* 273, 31644-31647.
- Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000). Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem* 275, 22627-22630.
- Okano, S., Lan, L., Caldecott, K. W., Mori, T., and Yasui, A. (2003). Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol* 23, 3974-3981.
- Oliver, A. W., Ame, J. C., Roe, S. M., Good, V., de Murcia, G., and Pearl, L. H. (2004). Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Nucleic Acids Res* 32, 456-464.
- Osaka, F., Kawasaki, H., Aida, N., Saeki, M., Chiba, T., Kawashima, S., Tanaka, K., and Kato, S. (1998). A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev* 12, 2263-2268.
- Panse, V. G., Kuster, B., Gerstberger, T., and Hurt, E. (2003). Unconventional tethering of Ulp1 to the transport channel of the nuclear pore complex by karyopherins. *Nat Cell Biol* 5, 21-27.
- Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2003). Mitochondria, AIF and caspases--rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* 5, 97-99.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-120.
- Pickart, C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *Faseb J* 11, 1055-1066.
- Plaza, S., Aumercier, M., Bailly, M., Dozier, C., and Saule, S. (1999). Involvement of poly (ADP-ribose)-polymerase in the Pax-6 gene regulation in neuroretina. *Oncogene* 18, 1041-1051.
- Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., and Mandel, P. (1982). Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3423-3427.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14145-14150.

## Referenzen

- Prasad, R., Lavrik, O. I., Kim, S. J., Kedar, P., Yang, X. P., Vande Berg, B. J., and Wilson, S. H. (2001). DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J Biol Chem* 276, 32411-32414.
- Prives, C., and Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol* 187, 112-126.
- Rajendra, R., Malegaonkar, D., Pungaliya, P., Marshall, H., Rasheed, Z., Brownell, J., Liu, L. F., Lutzker, S., Saleem, A., and Rubin, E. H. (2004). Topors functions as an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53. *J Biol Chem* 279, 36440-36444.
- Rasheed, Z. A., Saleem, A., Ravee, Y., Pandolfi, P. P., and Rubin, E. H. (2002). The topoisomerase I-binding RING protein, topors, is associated with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Exp Cell Res* 277, 152-160.
- Robzyk, K., Recht, J., and Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* 287, 501-504.
- Rodel, B., Tavassoli, K., Karsunky, H., Schmidt, T., Bachmann, M., Schaper, F., Heinrich, P., Shuai, K., Elsasser, H. P., and Moroy, T. (2000). The zinc finger protein Gfi-1 can enhance STAT3 signaling by interacting with the STAT3 inhibitor PIAS3. *Embo J* 19, 5845-5855.
- Rodgers, W., Jordan, S. J., and Capra, J. D. (2002). Transient association of Ku with nuclear substrates characterized using fluorescence photobleaching. *J Immunol* 168, 2348-2355.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* 18, 6455-6461.
- Rolli, V., O'Farrell, M., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1997). Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching. *Biochemistry* 36, 12147-12154.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10, 831-842.
- Roth, W., Sustmann, C., Kieslinger, M., Gilmozzi, A., Irmer, D., Kremmer, E., Turck, C., and Grosschedl, R. (2004). PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signaling. *J Immunol* 173, 6189-6199.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088-3103.
- Saitoh, H., Pu, R., Cavenagh, M., and Dasso, M. (1997). RanBP2 associates with Ubc9p and a modified form of RanGAP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3736-3741.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., and Suske, G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J* 21, 5206-5215.
- Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81-83.
- Schmidt, D., and Muller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2872-2877.
- Schwarz, S. E., Matuschewski, K., Liakopoulos, D., Scheffner, M., and Jentsch, S. (1998). The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 560-564.
- Schwienhorst, I., Johnson, E. S., and Dohmen, R. J. (2000). SUMO conjugation and deconjugation. *Mol Gen Genet* 263, 771-786.
- Seeler, J.-S., and Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 690-699.
- Seeler, J. S., and Dejean, A. (2001). SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7243-7249.
- Seeler, J. S., Marchio, A., Losson, R., Desterro, J. M., Hay, R. T., Chambon, P., and Dejean, A. (2001). Common properties of nuclear body protein SP100 and TIF1alpha chromatin factor: role of SUMO modification. *Mol Cell Biol* 21, 3314-3324.
- Seimiya, H., Muramatsu, Y., Smith, S., and Tsuruo, T. (2004). Functional subdomain in the ankyrin domain of tankyrase 1 required for poly(ADP-ribosyl)ation of TRF1 and telomere elongation. *Mol Cell Biol* 24, 1944-1955.
- Sherr, C. J., and Weber, J. D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10, 94-99.

## Referenzen

- Shiio, Y., and Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13225-13230.
- Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* *19*, 2638-2644.
- Simonin, F., Hofferer, L., Panzeter, P. L., Muller, S., de Murcia, G., and Althaus, F. R. (1993). The carboxyl-terminal domain of human poly(ADP-ribose) polymerase. Overproduction in *Escherichia coli*, large scale purification, and characterization. *J Biol Chem* *268*, 13454-13461.
- Slattery, E., Dignam, J. D., Matsui, T., and Roeder, R. G. (1983). Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* *258*, 5955-5959.
- Smith, S., and de Lange, T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* *10*, 1299-1302.
- Smith, S., Giriat, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* *282*, 1484-1487.
- Soldatenkov, V. A., Chasovskikh, S., Potaman, V. N., Trofimova, I., Smulson, M. E., and Dritschilo, A. (2002). Transcriptional repression by binding of poly(ADP-ribose) polymerase to promoter sequences. *J Biol Chem* *277*, 665-670.
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G., and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14373-14378.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* *139*, 1621-1634.
- Subramanian, L., Benson, M. D., and Iniguez-Lluhi, J. A. (2003). A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J Biol Chem* *278*, 9134-9141.
- Sun, Z. W., and Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* *418*, 104-108.
- Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E. A., Yasuda, H., and Kikuchi, Y. (2001a). Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem* *276*, 48973-48977.
- Takahashi, Y., Mizoi, J., Toh, E. A., and Kikuchi, Y. (2000). Yeast Ulp1, an Smt3-specific protease, associates with nucleoporins. *J Biochem* *128*, 723-725.
- Takahashi, Y., Toh-e, A., and Kikuchi, Y. (2001b). A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* *275*, 223-231.
- Tan, J. A., Hall, S. H., Hamil, K. G., Grossman, G., Petrusz, P., and French, F. S. (2002). Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators. *J Biol Chem* *277*, 16993-17001.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraiishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* *404*, 42-49.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* *276*, 35368-35374.
- Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1995). Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* *81*, 801-809.
- Tlsty, T. D. (1997). Genomic instability and its role in neoplasia. *Curr Top Microbiol Immunol* *221*, 37-46.
- Tussie-Luna, M. I., Bayarsaihan, D., Seto, E., Ruddle, F. H., and Roy, A. L. (2002). Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASxbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 12807-12812.
- Ulrich, H. D. (2004). How to activate a damage-tolerant polymerase: consequences of PCNA modifications by ubiquitin and SUMO. *Cell Cycle* *3*, 15-18.
- Vaziri, H., Dessain, S. K., Ng Eaton, E., Imai, S. I., Frye, R. A., Pandita, T. K., Guarente, L., and Weinberg, R. A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* *107*, 149-159.
- Vaziri, H., West, M. D., Allsopp, R. C., Davison, T. S., Wu, Y. S., Arrowsmith, C. H., Poirier, G. G., and Benchimol, S. (1997). ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *Embo J* *16*, 6018-6033.

## Referenzen

- Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M., and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302, 1036-1038.
- Vispe, S., Yung, T. M., Ritchot, J., Serizawa, H., and Satoh, M. S. (2000). A cellular defense pathway regulating transcription through poly(ADP-ribosyl)ation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9886-9891.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Wahl, G. M., Linke, S. P., Paulson, T. G., and Huang, L. C. (1997). Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv* 29, 183-219.
- Weger, S., Hammer, E., and Engstler, M. (2003). The DNA topoisomerase I binding protein topors as a novel cellular target for SUMO-1 modification: characterization of domains necessary for subcellular localization and sumolation. *Exp Cell Res* 290, 13-27.
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.
- West, M. H., Pantazis, P., and Bonner, W. M. (1985). Studies on nuclease digestion of chromatin phosphorylated in vivo. *J Biol Chem* 260, 4558-4560.
- Wible, B. A., Wang, L., Kuryshv, Y. A., Basu, A., Haldar, S., and Brown, A. M. (2002). Increased K<sup>+</sup> efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3beta in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277, 17852-17862.
- Woods, Y. L., Xirodimas, D. P., Prescott, A. R., Sparks, A., Lane, D. P., and Saville, M. K. (2004). p14 Arf promotes small ubiquitin-like modifier conjugation of Werners helicase. *J Biol Chem* 279, 50157-50166.
- Wu, L., Wu, H., Ma, L., Sangiorgi, F., Wu, N., Bell, J. R., Lyons, G. E., and Maxson, R. (1997). Miz1, a novel zinc finger transcription factor that interacts with Mx2 and enhances its affinity for DNA. *Mech Dev* 65, 3-17.
- Wyndham, A. M., Baker, R. T., and Chelvanayagam, G. (1999). The Ubp6 family of deubiquitinating enzymes contains a ubiquitin-like domain: SUB. *Protein Sci* 8, 1268-1275.
- Xirodimas, D. P., Saville, M. K., Bourdon, J. C., Hay, R. T., and Lane, D. P. (2004). Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 118, 83-97.
- Xu, W., Gong, L., Haddad, M. M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E. T., and Medrano, E. E. (2000). Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res* 255, 135-143.
- Yang, S. H., Jaffray, E., Hay, R. T., and Sharrocks, A. D. (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell* 12, 63-74.
- Yeh, E. T., Gong, L., and Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248, 1-14.
- Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.
- Yuan, W., and Krug, R. M. (2001). Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J* 20, 362-371.
- Yung, T. M., and Satoh, M. S. (2001). Functional competition between poly(ADP-ribose) polymerase and its 24-kDa apoptotic fragment in DNA repair and transcription. *J Biol Chem* 276, 11279-11286.
- Zacchi, P., Gostissa, M., Uchida, T., Salvagno, C., Avolio, F., Volinia, S., Ronai, Z., Blandino, G., Schneider, C., and Del Sal, G. (2002). The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* 419, 853-857.
- Zhang, H., Saitoh, H., and Matunis, M. J. (2002a). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* 22, 6498-6508.
- Zhang, Z., Hildebrandt, E. F., Simbulan-Rosenthal, C. M., and Anderson, M. G. (2002b). Sequence-specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the human T cell leukemia virus type-I tax responsive element. *Virology* 296, 107-116.
- Zheng, H., You, H., Zhou, X. Z., Murray, S. A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K. P., and Xiao, Z. X. (2002). The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* 419, 849-853.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., and Pandolfi, P. P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2752.
- Zhou, R., Wen, H., and Ao, S. Z. (1999). Identification of a novel gene encoding a p53-associated protein. *Gene* 235, 93-101.

**Peptidabdeckung Ku70**

1 SGWESYYK**TE GDEEAEQQE ENLEASGDYK** YSGRDSLIFL VDASKAMFES  
 51 QSEDELT PFD MSIQCIQSVY ISK**IISSDRD LLAVVFGTE** KDKNSVNFKN  
 101 IYVLQELDNP GAKR**ILEDQ FK**GGQQGQKRF QDMMGHGSDY SLSEVLWVCA  
 151 NLFSDVQFKM SHKR**IMLFTN EDNPHGNDSA** KASRARTKAG DLR**DTGIFLD**  
 201 **LMHLKPPGGF DISLFYRDII SIAEEDLRV** HFEESKLED LLRKVRACKET  
 251 RKRALSRLKL KLNKDIVISV GIYNLVQKAL KPPPIKLYRE TNEPVKTKTR  
 301 **TFNTSTGGLL LPSDTKRSQI YGSR**QIILEK EETEELKRFD DPGLMLMGFK  
 351 PLVLLKHHY LRPSLFVYPE ESLVIGSSTL FSALLIKCLE KEVAALCRYT  
 401 PRRNIPPYFV ALVPQEEELD DQK**IQVTPPG FQLVFLPFAD DKR**KMPFTEK  
 451 IMATPEQVGK MKAIVEKLRF TYR**SDSFENP VLQQHFRNLE** ALALDLMEPE  
 501 QAVDLTLPKV EAMNKRLGSL VDEFKELVYP PDYNPEGKVT KRKHDNEGSG  
 551 SKRPKVEYSE EELKTHISKG TLGKFTVPML KEACRAYGLK SGLKKQELLE  
 601 ALTKHFQD

**Peptidabdeckung Ku80**

1 VRSGNKAADV LCMDVGFTMS NSIPGIESPF EQAK**KVITMF VQR**QVFAENK  
 51 DEIALVLFGT DGTDNPLSGG DQYQNTVHR HLMLPDFDLL EDIESKIQPG  
 101 SQQADFLDAL IVSMDVIQHE TIGKKFEKR**H IEIFDLSR** FSKSQLDIII  
 151 HSLKKCDISL QFFLPFSLGK **EDGSGDRGDG PFR**LGGHG**PS FPLK**GITEQQ  
 201 KEGLEIVKMV MISLEGEDGL DEIYSFESL RKLCVFKKIE RHSIHWPCRL  
 251 **TIGSNLSIRI** AAYKSILQER VKKTWTVVDA KTLKKEDIQK ETVYCLNDDD  
 301 ETEVLK**EDII QGFR**YGSDIV PFSKVDEEQM KYKSEGKCFVS VLGFCSSQV  
 351 QR**RFFMGNQV LK**VFAARDDE AAVALSSLI HALDDDMVA IVRY**AYDKRA**  
 401 **NPQGVAFPH IK**HNYECLVY VQLPFMEDLR QYMFSSLKNS KKYAPTEAQL  
 451 NAVDALIDSM SLAKKDEKTD TLEDLFPTTK IPNPRFQRLF QCLLHRALHP  
 501 REPLPIQQH IWNMLNPPAE VTTKSQIPLS KIKTLFPLIE AKKK**DQVTAQ**  
 551 **EIQDNHEDG PTA**KLK**TEQ GGAHFSVSSL AEGSVTSVGS** VNPAENFRVL  
 601 VKQKKASFEE ASNQLINHIE QFLDTNETPY FMKSIDCIRA **FREEAIK**FSE  
 651 EQRFNNFLKA LQEKVEIKQL NHFWIVVQD GITLITKEEA SGSSVTAEAA  
 701 KKFLAPKDKP SGDTAAVFEE GGDVDDLLDM I

**Peptidabdeckung PARP-1**

1 AESSDKLYRV EYAKSGRASC KKCSESIPKD SLRMAIMVQS PMFDGKVPWH  
 51 YHFCFWKVG HSIRHPDEVV DGFSELRWDD QQKVKTAEAGGVTGKGQDG  
 101 IGSKAEKTLG DFAAEYAKSN RSTCKGCMK IEKGQVRLSK KMVDPEKPQL  
 151 GMIDRWYHPG CFVK**NREELG FRPEYSASQL** KGFSLLATED KEALKKQLPG  
 201 VKSEGKRKGD EVDGVDEVAK KKSKEKDKD SKLEKALKAQ NDLIWNIKDE  
 251 LKKVCSTNDL KELLIFNK**QQ VPSGESAILD** RVADGMVFGA LLPCEECSSGQ  
 301 LVFKSDAYYC TGDVTAWTKC MVKTQTPNRK EWVTPKEFRE ISYLKCLKVK  
 351 KQDRIFPPET SASVAATPPP STASAPAAVN SSASADKPLS NMKILTLGKL  
 401 SRNKDEVKAM IEKLGKLTG TANKASLCIS TKKEVEKMNK KMEEVKEANI  
 451 RVVSEDFLQD VSASTKSLQE LFLAHILSPW GAEVKAEPVE VVAPRGKSGA  
 501 ALSKSKSGQV KEEGINKSEK RMKLTGKGA AVDPDSGLEH SAHVLEKGGK  
 551 VFSATLGLVD IVKGTNSYYK **LQLEDDKEN** RYWIFRSWGR VGTVIGSNKL  
 601 EQMPSKEDAI EHFMKLYEEK TGNAWHKNF TKYPKKFYPL EIDYGDDEEA  
 651 VKKLTVPNGT KSKLPKPQVD LIKMIFDVES MKKAMVEYEI DLQKMPLGKL  
 701 SKRQIQAAYS ILSEVQQAQS QGSSDSQILD LSNRFYTLIP HDFGMK**KPPL**  
 751 **LNNADSVQAK** VEMLDNLLDI EVAYSLLR**GG SDDSSKDPID VNYEK**LKTDI  
 801 **KVVDRDSEEA EIIR**KYVKNT HATTHNAYDL EVIDIFKIER EGECQRYKPF  
 851 KQLHNRRL**LLW HGSRTTNFAG ILSQGLRI**AP PEAPVTGYMF GKGIYFADMV  
 901 SKSANYCHTS QGDPIGLILL GEVALGNMYE LKHASHISKL PKGKHSVKGL  
 951 GKTTPDPSAN ISLDGVDVPL GTGISSGVND TSLLYNEYIV YDIAQVNLKY  
 1001 LLLKLFNFKT SLW

## **Danksagung**

Bei Herrn Dr. S. Müller bedanke ich mich bei für die Betreuung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. D. Zink sowie Herrn Prof. S. Jentsch von der Ludwig-Maximilians-Universität München für ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Außerdem danke ich Dr. Paul Hassa und Christian Pohl für rekombinante Proteine.

Vielen Dank auch an Dirk Kempe, Margaretha Kirezoglou und Massimo Bossi für technischen Service.

Zuletzt noch an meine Doktorandenkollegen Ursula Sauer, Andreas Ledl, Per Stehmeier und Markus Haindl sowie alle Mitglieder der Abteilung Jentsch.

## Lebenslauf

Darja Schmidt  
Widenmayerstr. 8  
80538 München

### **Persönliche Daten**

geboren am 26.12.1974 in Bad Oldesloe/Schleswig-Holstein  
Familienstand: ledig

### **Promotion**

seit 04/2001 Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried: "Charakterisierung von PIAS-Proteinen als E3-ähnliche Faktoren im SUMO-System"

### **Wissenschaftliche Angestellte**

11/2000 – 03/2001 Genzentrum der Ludwig-Maximilian-Universität München, Entwicklung von Vektoren für DNA-Vakzinierungen

### **Universität**

10/1999 – 09/2000 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Immunbiologie in Freiburg "Antigenpräsentation des HIV-Nef-Proteins"  
Diplomprüfung 10/2000, Note 1.3

05/1998 – 09/1999 Studium der Biologie an der Albert-Ludwig-Universität Freiburg, Schwerpunkte Immunologie, Genetik, Zellbiologie, Virologie

11/1995 – 04/1998 Studium der Biologie an der Universität Regensburg, Vordiplomprüfung 10/1997, Note 2.0

11/1994 – 10/1995 Studium der Ökotoxikologie an der TU München/Weihenstephan

### **Schule**

1990-1994 Martin-Niemöller-Gymnasium Wiesbaden, Abitur Juni 1994

1985-1990 Gymnasium Neutraubling