

# **Identifizierung und Charakterisierung eines phospho-regulierten SUMO-Interaktions-Motivs**

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

**vorgelegt von  
Diplom-Biologe  
Per Stehmeier**

**März 2009**

## **Ehrenwörtliche Erklärung:**

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

München, den 25. 03. 2009

Promotionsgesuch eingereicht am	25. 03. 2009
Tag der mündlichen Prüfung	30. 04. 2009
Erster Gutachter	Prof. Dr. Stefan Jentsch
Zweiter Gutachter	Prof. Dr. Michael Ackmann

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen April 2004 und März 2009 unter Anleitung von Dr. Stefan Müller in der Abteilung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Stehmeier, P.**, Muller, S. (2009). Phospho-Regulated SUMO Interaction Modules Connect the SUMO System to CK2 Signaling. **Mol Cell**, **33**, 400-409

**Stehmeier, P.**, Muller, S. (2009). Regulation of p53 family members by the ubiquitin-like SUMO system. **DNA Repair (Amst)**., im Druck

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>2</b>
2.1 Posttranslationale Modifikationen	2
2.2 Das Ubiquitin-System	7
2.3 Ubiquitin-ähnliche Proteine	10
2.4 Das SUMO-System	12
2.4.1 Konjugation und Dekonjugation	12
2.4.2 Funktionelle Konsequenzen der SUMO-Modifikation am Beispiel des NF $\kappa$ B-Signalwegs	18
2.5 Das SUMO-Interaktions-Motiv (SIM)	20
2.5.1 Strukturelle Kennzeichen	20
2.5.2 Funktionelle Auswirkungen von nicht-kovalenter SUMO-Bindung	23
2.6 Das PML ( <i>promyelocytic leukemia</i> ) Protein	26
2.7 Die <i>protein inhibitor of activated Stat</i> (PIAS) Familie	27
2.8 Das Exosom und PMSCL1 ( <i>Polymyositis-Sclerodermie</i> )	29
2.9 CK2 – eine Kinase, involviert in viele Signalwege	31
2.10 Zielsetzung der Arbeit	32
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1 PIAS Proteine sind über ein SIM zur nicht-kovalenten Interaktion mit SUMO befähigt	34
3.2 PIAS1 wird durch CK2 in einem regulierbaren Prozess in unmittelbarer Nähe zum SIM phosphoryliert	36
3.3 Zur nicht-kovalenten Interaktion mit SUMO wird eine Phosphorylierung von PIAS Proteinen benötigt	41
3.4 Identifizierung von phosphoSIM-abhängigen PIAS Bindungspartnern	46

## Inhaltsverzeichnis

3.5	Spezielle Lysine in SUMO dienen als Rezeptoren für negative Ladungen in der SUMO/phosphoSIM-Interaktion _____	49
3.6	PhosphoSIM-Module regulieren die transkriptionelle Koregulator-Funktion von PIAS Proteinen _____	51
3.7	PML und PMSCL1 besitzen funktionelle phosphoSIM-Module _____	56
3.8	PML und PMSCL1 sind CK2-Substrate _____	57
3.9	Die CK2-abhängige Phosphorylierung von PML und PMSCL1 unterstützt die nicht-kovalente Bindung an SUMO _____	60
<b>4</b>	<b>Diskussion _____</b>	<b>63</b>
4.1	Zusammenspiel zwischen dem CK2- und dem SUMO-Signalweg _____	63
4.2	Strukturelle Charakteristika der phosphoSIM/SUMO-Interaktion _____	66
4.3	Die Bedeutung des phosphoSIM-Moduls bei der Regulation transkriptioneller Prozesse _____	68
4.4	Genereller Einfluss auf die zelluläre Homöostase durch das phosphoSIM-Modul _____	70
<b>5</b>	<b>Material und Methoden _____</b>	<b>74</b>
5.1	Computeranalysen _____	74
5.2	Chemikalien und Reagenzien _____	74
5.3	Mikrobiologische Methoden _____	75
5.3.1	Methoden für <i>E. coli</i> _____	75
5.3.1.1	Verwendete <i>E. coli</i> Stämme _____	75
5.3.1.2	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> Zellen _____	75
5.3.1.3	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen _____	76
5.3.1.4	Herstellung „ultra-kompetenter“ <i>E. coli</i> Zellen _____	76
5.3.1.5	Transformation von Plasmid-DNA in bakterielle Zellen _____	77
5.3.2	Methoden für <i>S. cerevisiae</i> _____	77
5.3.2.1	Verwendeter <i>S. cerevisiae</i> Stamm _____	77
5.3.2.2	Verwendete <i>S. cerevisiae</i> Vektoren _____	77
5.3.2.3	Kultivierung und Lagerung von <i>S. cerevisiae</i> Zellen _____	78

## Inhaltsverzeichnis

5.3.2.4	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen	78
5.3.2.5	Transformation vektorieller DNA in <i>S. cerevisiae</i>	78
5.3.2.6	Analyse von Protein/Protein-Interaktionen mittels des Hefe <i>two-hybrid</i> -Systems	79
5.3.2.7	Proteinbestimmung aus <i>S. cerevisiae</i> Extrakten	79
5.4	Zellbiologische Methoden	80
5.4.1	Verwendete Zelllinien	80
5.4.2	Expressionsvektoren für Säugetierzellen	80
5.4.3	Kultivierung von Säugetierzellen	80
5.4.4	Lagerung von Säugetierzellen	81
5.4.5	Transfektion von vektorieller DNA in Säugetierzellen	81
5.4.6	Immunfluoreszenzmikroskopie	82
5.5	Molekularbiologische Methoden	83
5.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	83
5.5.2	Restriktionsverdau von DNA	83
5.5.3	Dephosphorylierung von DNA	84
5.5.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	84
5.5.5	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	84
5.5.6	Ligation von DNA	85
5.5.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	85
5.5.8	Sequenzieren von DNA	86
5.5.9	Zielgerichtete Punktmutagenese vektorieller DNA	86
5.5.10	Verwendete Plasmidkonstrukte	87
5.6	Proteinbiochemische Methoden	90
5.6.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	90
5.6.2	Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen	91
5.6.3	Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran	91
5.6.4	Western Blot	91
5.6.5	Lyse und Präparation von Zelllysaten	92
5.6.6	Verwendete Antikörper	92
5.6.7	Immunpräzipitation	93
5.6.8	Denaturierende Anreicherung von <i>in vivo</i> SUMO-Substraten	93
5.6.9	Anreicherung und Reinigung von GST- und SBP-Fusionsproteinen	94
5.6.10	Bestimmung der Konzentration gelöster Proteine	94
5.6.11	Bindungsstudien Matrix gekoppelter Proteine	94
5.6.12	Identifikation von GST-pSIM-Interaktoren	95
5.6.13	CK2-katalysierte <i>in vitro</i> Phosphorylierungen	95

## Inhaltsverzeichnis

5.6.14	<i>In vitro</i> Modifikationen mit SUMO	96
5.6.15	Reporterexperimente	96
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>108</b>
7.1	Per Massenspektrometrie identifizierte GST-pSIM-Interaktoren	108
7.2	Abkürzungsverzeichnis	111
7.3	Danksagung	114
7.4	Lebenslauf	115

## Zusammenfassung

### 1 Zusammenfassung

Posttranslationale Modifikationen kontrollieren Protein/Protein-Interaktionen. Dabei schaffen diese Modifikationen häufig neue Bindungsstellen an ihren Substraten, die von spezifischen Interaktionsmodulen erkannt werden. Im Ubiquitin-ähnlichen SUMO-System kann dementsprechend ein SUMO-modifiziertes Protein durch eine nicht-kovalente Bindung einen Bindungspartner, der ein spezifisches SUMO-Interaktions-Motiv (SIM) besitzt, rekrutieren. Als zentrale Region aller bislang gefundenen SUMO-Interaktions-Motive wurde ein Bereich von drei hydrophoben Aminosäuren beschrieben. Durch die Verwendung des transkriptionellen Koregulators und der SUMO-Ligase PIAS1 als Modellprotein konnte in dieser Arbeit ein erweitertes phosphorylierungsreguliertes SIM definiert werden. Dabei wurde ersichtlich, dass an die hydrophoben Aminosäuren angrenzende Serine durch die Kinase CK2 phosphoryliert werden und diese Phosphorylierung für eine *in vivo* Interaktion von freiem SUMO oder SUMO-Konjugaten mit PIAS1 und weiteren Mitgliedern der PIAS Familie von entscheidender Bedeutung ist. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierten Aminosäuren eine elektrostatische Wechselwirkung zu den Lysin 39 bzw. 35 in SUMO1 bzw. SUMO2 eingehen. Die phosphorylierungsabhängige SUMO-Bindung beeinflusst nicht die E3 Ligase-Aktivität von PIAS1, verändert aber die transkriptionellen Eigenschaften von PIAS1 und anderen PIAS Familienmitgliedern. Durch zusätzliche Untersuchungen am Tumorsuppressor PML und der Exosomenkomponente PMSCL1 konnte das Konzept einer CK2-abhängigen SUMO-Bindung generalisiert werden. Die phosphorylierungsabhängige SUMO-Bindung definiert so ein neues Zusammenspiel zwischen Sumoylierung und Phosphorylierung und zeigt eine Verknüpfung von CK2- und SUMO-regulierten Signalwegen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Posttranslationale Modifikationen

Für eine Zelle ist es essentiell auf Veränderungen der Umwelt oder, in mehrzelligen Organismen, auf Veränderungen der physiologischen Umgebung variabel reagieren zu können. Auf molekularer Ebene werden diese Anpassungen über Proteine gesteuert. Die Menge und dementsprechend die Aktivität eines Proteins kann dabei durch veränderte Transkription oder Translation reguliert werden.

Ebenso wichtig und sehr mannigfaltig ist die Regulation von Proteinen mittels posttranslationaler Modifikationen. Posttranslationale Modifikationen sind Veränderungen eines Proteins nach der Translation, was z.B. eine Konformationsänderung einzelner Proline, die proteolytische Spaltung bestimmter Aminosäuresequenzen oder, in der Mehrzahl der Fälle, die kovalente Bindung von verschiedenen Molekülen bzw. Molekülgruppen bedeuten kann.

Eine einfache Modifikation eines Proteins ist die Isomerisation der Iminosäure Prolin. In Peptide gebundene Aminosäuren bevorzugen aus sterischen Gründen die *trans*-Konformation. In einem gebundenen Prolin sind die *cis*- und *trans*-Konformation aber energetisch fast gleichwertig, so dass bis zu 10% der Proline in *cis* vorliegen. Durch Prolyl-isomerasen kann auch eine gezielte Konformationsänderung erreicht werden (Lu und Zhou, 2007). Eine derartige Veränderung ist gleichbedeutend mit einer erheblichen Strukturänderung, so findet man *cis*-Proline oft in  $\beta$ -Schleifen. Ein prominentes Beispiel für eine Prolyl-isomerase ist PIN1, die zur Familie der Parvulin-Isomerasen gehört. PIN1 ist in der Lage die Transkription von RNA-Polymerase-II zu inhibieren, aber auch die Transkriptionsfaktoren p53, Jun oder Fos zu aktivieren (Takahashi et al., 2008). Gleichzeitig findet man in diesem Modifikationssystem eine Eigenschaft, die man in vielen anderen Systemen wieder findet: die Abhängigkeit und das Zusammenspiel zwischen verschiedenen Modifikationssystemen. So benötigt

## Einleitung

PIN1 eine Phosphorylierung N-terminal vom Prolin um seine volle enzymatische Aktivität zu zeigen (Lu und Zhou, 2007).

Eine weitere Form posttranslationaler Modifikation ist die proteolytische Spaltung. Hierbei wird ein Proprotein durch Proteasen oder das Enzym selbst in seine aktive Form überführt. Beispiele für diese Art der Regulation finden wir bei Verdauungsenzymen, die ansonsten eventuell verfrüht andere Enzyme oder Strukturproteine des Körpers angreifen könnten. Beispielsweise kann eine vorzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen eine Pankreatitis hervorrufen (Hirota et al., 2003). Auch viele Proteine der Blutgerinnungskaskade werden als inaktive Gerinnungsfaktoren (Zymogene) durch proteolytische Spaltung in die aktiven Gerinnungsenzyme überführt (Dahlback und Villoutreix, 2005).

Die am häufigsten zu findende Form der posttranslationalen Modifikation ist eine kovalente Verbindung zu einem anderen Molekül oder einer Molekülgruppe. Bis zu 70% der Masse eines modifizierten Proteins kann ein Saccharid erreichen. Bei diesen kovalenten Modifikationen können Serine und Threonie O-glykosiliert bzw. Asparagin N-glykosiliert werden. Da verschiedene Zucker genutzt werden und auch eine Verzweigung der Zuckerreste möglich ist, sind die Variationsmöglichkeiten dieser Modifikationen enorm (Haines und Irvine, 2003). Glykoproteine haben eine veränderte Polarität und erreichen eine hohe Löslichkeit. Viele der Serumproteine, z.B. Hormone oder Immunglobuline, liegen als Glykoproteine vor. Zuckerreste können auch die Abfolge der Faltung verändern oder einen Schutz vor proteolytischer Spaltung bieten. Einen besonders hohen Anteil an glykolisierten Proteinen finden wir unter den Membranproteinen. Hier kann eine Glykosilierung die Beweglichkeit dieser Proteine erhöhen. Ein prominentes Beispiel für einen Zuckerrest, der Membranproteine modifiziert, ist der GPI-Anker (Paulick und Bertozzi, 2008).

Wichtig für viele Organismen ist eine posttranslationalen Modifikation mit Poly-ADP-Ribose. PARP-1, die Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1, benötigt diese selbst katalysierte Modifikation um nach DNA-Schäden die Bindung an DNA wieder zu lösen (Wang et al., 2006). Von Bedeutung scheint bei diesem Vorgang

## Einleitung

die Ladung von Poly-ADP-Ribose zu sein, die wie die Ladung der DNA, ebenfalls negativ ist.

Die Modifikation mit Lipiden kann über eine Amidbindung an einer Aminogruppe oder über einen Thioester am Thiol eines Cysteins erfolgen. Häufig werden Proteine der Signaltransduktion mit Lipiden modifiziert. Bekannte Beispiele sind Proteine der Src-Familie, eine Familie cytoplasmatischer Tyrosinkinasen, oder Ras (Resh, 2006).

Die posttranslationale Modifikation mit niedermolekularen Gruppen wie Methyl-, Acetyl- und Phosphatresten soll im Folgenden exemplarisch an einer Familie von Proteinen, den Histonen, verdeutlicht werden. Histone nehmen in Bezug auf posttranslationale Modifikationen eine besondere Rolle ein, da sie vielfältig und effizient modifiziert werden und verschiedene funktionelle Konsequenzen der Modifikation detailliert untersucht sind. Am Beispiel der Histonmodifikation lässt sich auch das Prinzip der modularen Erkennung von posttranslationalen Modifikationen durch spezifische Bindungsdomänen oder Motive eindrücklich darstellen. Histone bestehen aus fünf Klassen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) deren Aufgabe es ist, die DNA in einer kompakt gebundenen Form zu halten. Dies geschieht indem sich je zwei H2A, H2B, H3 und H4 Proteine zu einem oktamerischen Nukleosom zusammenfinden. H1 bindet an diese Struktur. Bei speziellen Aufgaben, z.B. der DNA-Reparatur, können einzelne Histone durch spezielle Varianten ersetzt werden (van Attikum und Gasser, 2005). Da ein Gen nur effizient transkribiert werden kann, wenn sein Promoter für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich ist, kommt dem Grad der kompakten Faltung der DNA eine wichtige regulatorische Aufgabe bei der Genexpression zu. Die Umsetzung dieser Regulation erfolgt durch die Modifikation von Histonen mit Methyl-, Acetyl- oder Phosphatgruppen. Diese Modifikationen erfolgen bevorzugt im N-terminalen Bereich der Nukleosomenbildenden Histone (Berger, 2007).

Methylierungen von Histonen an Lysin- oder Argininresten werden durch Methyltransferasen vermittelt. Dass eine solche Modifikation an Lysinen reversibel ist, konnte durch die erst im Jahr 2004 entdeckten Demethylasen

## Einleitung

gezeigt werden (Shi et al., 2004). Methylierungen können sowohl aktivierend als auch reprimierend auf die Genexpression wirken (Berger, 2007). Die Methylierung von Histon H3 am Lysinrest 9 dient beispielsweise als Bindungsstelle für Mitglieder der HP1 Familie, was die Entstehung einer dicht gebundenen Struktur aus Nukleosomen und DNA nach sich zieht. Diese wird als Heterochromatin bezeichnet und ist in der Regel mit „*gene silencing*“ gekoppelt. Bei diesem Prozess bindet eine als Chromodomäne bezeichnete Region aus HP1 Proteinen spezifisch an methylierte Lysinreste. Eine Acetylierung von Histonen wirkt dazu im Gegensatz meist aktivierend (Bhaumik et al., 2007). Durch sie wird die Struktur der 30nm Chromatin-Fiber destabilisiert. Dies scheint zum Teil durch die Neutralisation der zuvor elektrisch positiv geladenen Lysinreste erreicht zu werden. Des Weiteren rekrutieren acetylierte Histone Chromatin-Remodellierungsfaktoren über die spezifische Bindung einer sogenannten Bromodomäne. Histon-Acetylierungen sind ebenfalls reversibel und werden durch das antagonistische Gegenspiel von Acetyltransferasen und Deacetylasen (HDACs) realisiert. Phosphorylierungen der nukleosomalen Histone bewirken zumeist ebenfalls eine Aktivierung der Gene, wie z.B. für die Phosphorylierung am Serinrest 10 im Histone H3 gezeigt wurde (Bhaumik et al., 2007).

Im Allgemeinen kann eine Phosphorylierung an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten erfolgen. Die modifizierten Aminosäuren liegen sehr häufig in einem spezifischen Motiv, dass als Konsensussequenz bezeichnet wird. Phosphorylierungen werden durch Kinasen katalysiert, die demodifizierenden Enzyme werden als Phosphatasen bezeichnet. Man findet diese Modifikation häufig in Kaskaden, was oft eine Signalamplifikation nach sich zieht. Besonders viele Phosphorylierungssubstrate findet man unter den Zellzyklus regulierenden Proteinen. Viele dieser Proteine zeigen eine von der jeweiligen Phase des Zellzyklus abhängige Phosphorylierung. So ist es auch nicht überraschend, dass einige Kinasen und Phosphatasen entscheidende Bedeutung für den korrekten Ablauf des Zellzyklus besitzen (Sullivan und Morgan, 2007).

## Einleitung

Auf molekularer Ebene können die durch Phosphatgruppen eingefügten negativen Ladungen zu einer Wasserstoffbrückenbildung mit Amidgruppen in  $\alpha$ -Helices,  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten oder Guanidiniumgruppen von Argininen führen. Es können aber auch negativ geladene Aspartat- und Glutamatreste abgestoßen werden.

Des Weiteren sind viele phosphorylierungsabhängige Bindungsdomänen, wie die Polo-Box-, die WW-, die SH2-, die WD40- oder die BRCT-Domäne bekannt (Seet et al., 2006). Manche dieser Domänen finden sich in Ubiquitin-Ligasen, wodurch diese spezifisch Substrate mit speziellen Phospho-Degrone erkennen und degradieren (Welcker und Clurman, 2008). Das Cdc4 Phospho-Degron (CDP) kann hier als prominentes und besonders gut untersuchtes Beispiel gelten. In der Hefe ist das F-box Protein Cdc4 Bestandteil des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes. Der Kernkomplex dieser Ligase kann, zur Substraterkennung mit verschiedenen F-box Proteinen assembliert werden. So kann Cdc4 durch Cdc28 phosphoryliertes Cdk1 erkennen und durch dessen Degradation den Eintritt in die S-Phase einleiten (Welcker und Clurman, 2008). Cdk1 besitzt dafür drei CPDs mit je zwei phosphorylierten Serinen oder Threoninen. Erkannt werden diese Motive durch eine WD40-Domäne in Cdc4. Darüber hinaus scheinen in jedem CPD auch hydrophobe Aminosäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung zu haben. Homologe Proteine finden sich auch in Säugetieren, wobei hier die Substrate CyclinE und p27<sup>KIP1</sup> durch das F-box Protein FBW7 gebunden und Ubiquitin-abhängig abgebaut werden.

Eine weitere wichtige Modifikation, die wir z.B. auch bei Histonen finden, ist die kovalente Verknüpfung mit Proteinen, wie Ubiquitin und SUMO. Der Mechanismus dieser beiden Modifikationen wird in den nächsten Kapiteln eingehender erläutert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass posttranslationale Modifikationen diverse und wichtige Regulationen bei der Homöostase von Organismen haben und essentiell sind. Die Modifikationen sind chemisch von großer Diversität und dadurch in der Lage Proteinen neue chemische Eigenschaften zu verleihen. Interessanterweise können posttranslationale

## Einleitung

Modifikationen einander überlappen oder voneinander abhängen, wobei die Effekte je nach System synergistisch oder antagonistisch sein können.

## 2.2 Das Ubiquitin-System

Der Nobelpreis für Chemie 2004 wurde vergeben an Avram Hershko, Aaron Ciechanover und Irwin Rose für die Entdeckung der Funktion eines aus 76 Aminosäuren bestehenden, ubiquitären Proteins, bekannt als Ubiquitin. Ubiquitin bindet über eine Isopeptidbindung an die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins in einem Zielprotein und verändert dadurch die molekulare Bestimmung dieses Zielproteins (Hicke, 2001). Typisch für Ubiquitin ist dabei der Weg der Konjugation. Charakteristisch ist auch die Faltung von Ubiquitin, bei der mehrere  $\beta$ -Faltblätter um eine  $\alpha$ -Helix herum angeordnet sind und einen hydrophoben Kern umschließen. Diese beiden Eigenschaften machen Ubiquitin zu dem prototypischen Mitglied der Familie der *ubiquitin-like modifiers*. Andere Mitglieder dieser Familie werden im folgenden Kapitel detaillierter besprochen. Neben der Fähigkeit zur kovalenten Modifikation finden wir auch Proteine, die lediglich eine Domäne mit einer Ubiquitin-ähnlichen Faltung enthalten und demzufolge als *ubiquitin domain proteins* (UDPs) bezeichnet werden (Hartmann-Petersen und Gordon, 2004). UDPs agieren nicht als Modifikatoren, können aber, wie beispielsweise für Rad23 gezeigt, die Bindung zum 26S Proteasom vermitteln. Die UBX-Domäne hat nur geringe Sequenzhomologie zu Ubiquitin, die Faltung ist jedoch identisch. UBX-Proteine sind meist Kofaktoren der AAA-ATPase CDC48/p97 (Schuberth und Buchberger, 2008).

Der Konjugationsprozess von Ubiquitin ist für eine posttranslationale Modifikation verhältnismäßig aufwendig und verläuft über einen mehrstufigen Prozess. Im ersten Schritt wird Ubiquitin in seine aktive Form überführt (Abb. 1). Dafür wird es durch eine Protease geschnitten, was zur Freisetzung eines Di-Glycinmotivs am C-Terminus führt (Jentsch und Pyrowolakis, 2000). Anschließend kann unter der Hydrolyse der  $\gamma$ -ständigen Phosphatgruppe von

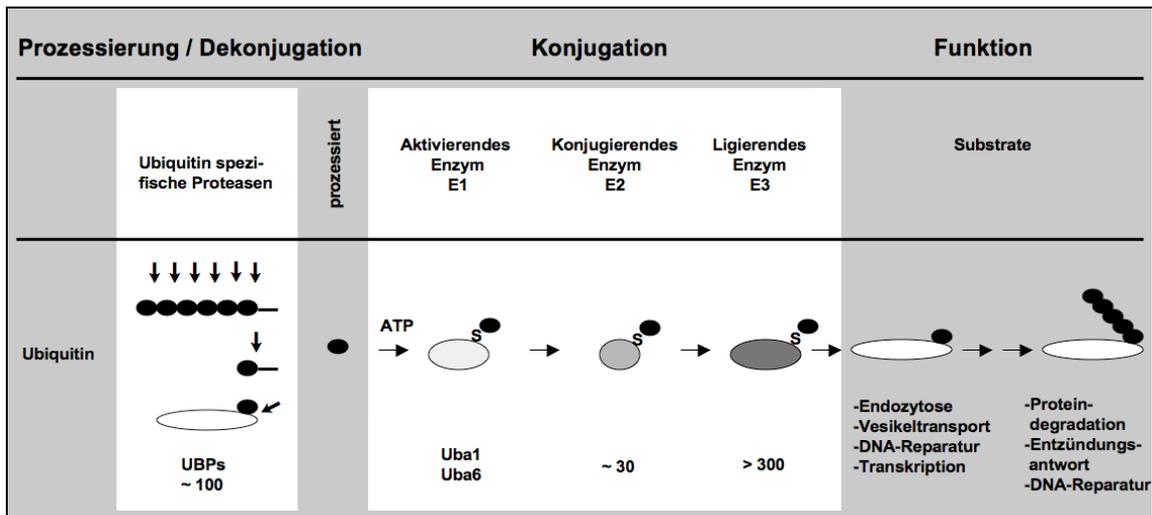
## Einleitung

ATP ein Thioester zwischen Ubiquitin und dem aktivierenden Enzym (E1) gebildet werden. Bis vor kurzem schien UBA1 das einzige aktivierende Enzym der Ubiquitinkonjugation zu sein, doch neuere Ergebnisse zeigen, dass auch UBA6 diese Aufgabe übernehmen kann (Groettrup M et al., 2008). Durch eine Transesterifizierung wird Ubiquitin weiterführend auf ein konjugierendes Enzym (E2) übertragen. E2 Proteine enthalten eine UBC-Domäne und man findet ca. 30 verschiedene Vertreter dieser Gruppe beim Menschen. In Säugetierzellen sind ca. 300 Proteine zu finden, die eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität (E3) zeigen. Unterteilen lassen sich Ubiquitin-Ligasen in zwei Gruppen. Zum einen treffen wir die HECT-Ligasen (*homolgy to E6AP C-terminus*) an (Scheffner und Staub, 2007). Sie besitzen eine katalytische Aktivität und sind fähig konjugierende Enzyme zu binden. Dabei übernehmen sie Ubiquitin als Thioester und übertragen es auf das Ziellysin des Substrates. Ligasen vom sogenannten RING-Typ (*really interesting new gene*) koordinieren ein Zinkion in einer RING-Domäne, die benötigt wird um das konjugierende Enzym zu binden (Barry und Fruh, 2006). RING-Ligasen besitzen also keine katalytische Aktivität, sondern dienen viel mehr als Adapter zwischen E2 und Substrat. Interessanterweise kann eine funktionelle RING-Ligase als Monomer auftreten, wie z.B. die p53-Ubiquitin-Ligase Mdm2, oder aus höheren Komplexen bestehen, wie im Fall des SCF-Komplexes, bei denen das RING-Finger Protein lediglich eine Untereinheit der Ligase ist. Die Notwendigkeit von Ligasen bei der Konjugation von Ubiquitin galt lange als Dogma, doch Hoeller *et al.* konnten zeigen, dass Substrate mit einer Ubiquitin-bindenden Domäne diese Unterstützung nicht benötigen (Hoeller et al., 2007). Dieser Mechanismus scheint aber nur auf eine kleine Gruppe von Substraten zuzutreffen.

Ubiquitin kann in Form eines Monomers (Monoubiquitylierung) oder auch als Kette (Polyubiquitylierung) an einem Zielprotein gebunden sein. Zum Teil wird zur Synthese einer Kette eine eigene Enzymklasse benötigt, die E4 Ligasen (Hoppe, 2005). Sie sind fähig weitere Ubiquitinreste an eine bereits vorhandene Monoubiquitylierung zu konjugieren. Ein Charakteristikum einer Gruppe dieser Enzyme ist das Vorhandensein einer RING-ähnlichen Struktur, der U-BOX. Die

## Einleitung

Form der Ubiquitylierung, d.h. Mono- oder Poly-, und die Art der Kette beeinflussen erheblich die molekulare Bestimmung eines Substrates. Ketten, die über die Lysinreste 29 und 48 (K29, K48) verknüpft sind, führen in der Regel zu einer Substratdegradation durch das 26S Proteasom. Monoubiquitylierung und Ketten über das Lysin 63 (K63) können, abhängig vom Zielprotein, die DNA-Reparatur, die Transkription, die Endozytose oder auch Signalwege, wie den NF- $\kappa$ B-Weg, beeinflussen (Hicke, 2001; Terzic et al., 2007).



**Abb. 1: Prozessierung, Aktivierung, Konjugation und Dekonjugation von Ubiquitin**

Die spezifische Modifikation von Proteinen mit Ubiquitin erfolgt indem zunächst eine Vorläuferform von Ubiquitin am C-Terminus von einer Hydrolase prozessiert wird. Die Konjugation wird dann in einer dreistufigen Enzymkaskade aus aktivierenden, konjugierenden und ligierenden Enzymen vollzogen. Je nach Beschaffenheit der Ubiquitylierung verändert sich die molekulare Bestimmung der modifizierten Substrate.

Zumeist werden die Ubiquitin-vermittelten Effekte durch die direkte Bindung spezifischer Ubiquitin Bindungsdomänen (UBDs) in entsprechenden Interaktionspartnern erzielt (Hicke et al., 2005). UBDs zeigen eine große Diversität und werden derzeit in 17 verschiedene Untergruppen eingeordnet. Die Interaktionsstärke zwischen Ubiquitin und UBDs liegt in einem weiten Bereich, ist zu meist aber mit einem  $K_D > 100\mu\text{M}$  schwach. Um die Affinität zu erhöhen, gibt es eine Entwicklung von unterschiedlichen Strategien. Polyubiquitylierung, Modifikationsmultiplizität, Oligomerisierung von ubiquitylierten Proteinen, Tandembindedomänen und Bindedomänen mit multiplen Ubiquitinbindestellen

## Einleitung

verstärken die Bindung beträchtlich (Hurley et al., 2006). Als zentrale Bindestelle für die UBDs fungiert meist das Isoleucin 44 (I44) im Ubiquitin, das sich in einer hydrophoben Umgebung befindet. UBDs mit einem Zinkfinger (ZnF-Domänen) können zusätzlich auch Aspartat 58 (D58), einen polaren Rest, und den im C-terminalen Di-Glycinmotiv liegenden Glycinrest 76 (G76) registrieren.

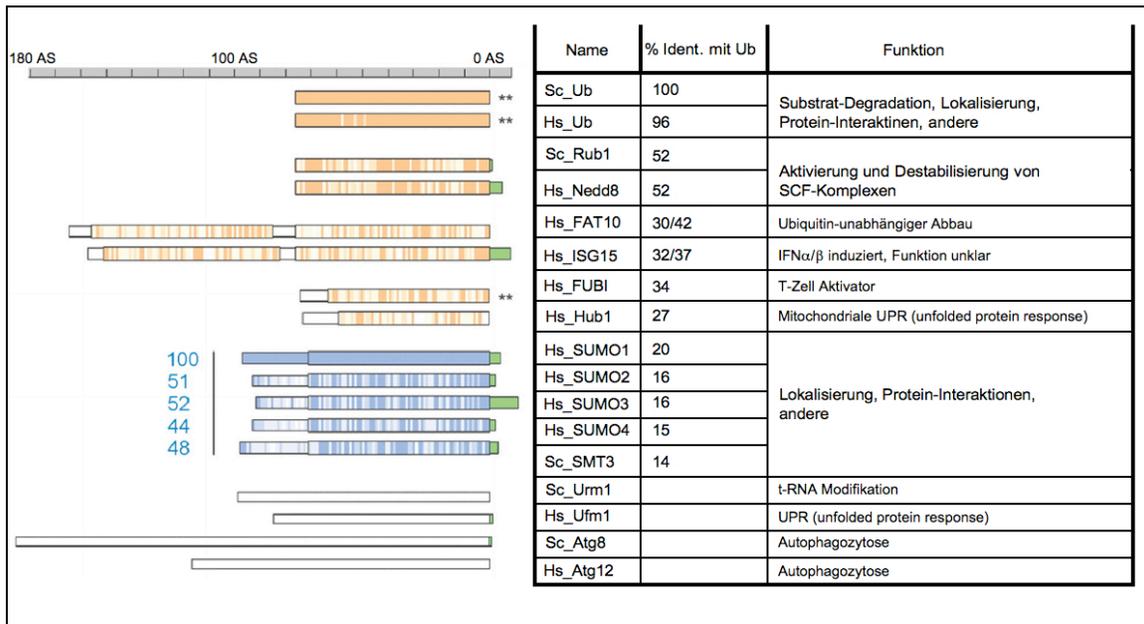
### 2.3 Ubiquitin-ähnliche Proteine

Wie im vorangegangenen Kapitel erwähnt, ist Ubiquitin das prototypische Mitglied einer Superfamilie von Proteinen. Diese Gruppe wird als UBLs (*ubiquitin-like proteins*) bezeichnet. Mitglieder dieser Familie können eine Sequenzähnlichkeit, eine strukturelle Verwandtschaft oder eine analoge Konjugation zu Ubiquitin aufweisen (Kerscher et al., 2006). Zurzeit sind beim Menschen 14 bzw. in *Saccharomyces cerevisiae* sieben derartige Proteine bekannt (Abb. 2). Die größte Homologie zu Ubiquitin besitzt Nedd8. Nedd8 wird durch das heterodimere E1 ULA1/UBA3 und durch das E2 UBC12 an Zielproteine gebunden. Bei den Zielproteinen handelt es sich überwiegend um Culline, die Bestandteil von SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexen sind. Der SCF-Komplex kann durch diese Modifikation aktiviert und später auch destabilisiert werden. Ein weiteres Nedd8-Substrat ist p53, dessen transkriptionelle Aktivität durch eine Konjugation inhibiert wird.

Zwei Ubiquitin-ähnliche Domänen in einer Tandemanordnung, mit bis zu 42% Identität zu Ubiquitin, besitzen ISG15 und FAT10. Beiden Modifikatoren scheint eine Rolle in der Immunabwehr zuzufallen. Während ISG15 durch Interferon  $\alpha$  und  $\beta$  induziert wird und PML-RAR, Nedd4, Enolase und 4EHP modifiziert (Malakhova und Zhang, 2008; Okumura et al., 2007; Shah et al., 2008), wird FAT10 durch Interferon  $\gamma$  und TNF $\alpha$  induziert. FAT10 scheint einen Ubiquitin-unabhängigen proteasomalen Abbau zu vermitteln (Hipp et al., 2005). Als hoch konserviert zwischen den verschiedenen Spezies gilt HUB1. Für dieses Protein wurde zunächst eine kovalente Konjugation an Substrate beschrieben (Dittmar et al., 2002), die allerdings von anderen Gruppen nicht bestätigt werden

## Einleitung

konnte. Bei den für HUB1-Konjugate gehaltenen Proteinbanden scheint es sich wahrscheinlich um SDS-resistente nicht-kovalente Proteinaddukte zu handeln (Luders et al., 2003). Auch das Fehlen eines Doppelglycinmotivs am C-Terminus spricht gegen eine Funktion von HUB1 als kovalenter Modifikator.



**Abb. 2: Schematischer Vergleich der Ubiquitin-ähnlichen Proteine (UBLs)**

Die Tabelle zeigt die große Diversität Ubiquitin-ähnlicher Proteine aus dem Menschen und der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Verglichen wird die Sequenzhomologie zu Ubiquitin, wobei die Entstehung von Untergruppen, wie z.B. FAT10/ISG15 oder der SUMO-Gruppe, auffällt. Ebenfalls interessant ist die Vielfalt an zellulären Funktionen, die die Ubiquitin-ähnlichen Proteine hervorbringen.

Mit ca. 15% weisen Proteine der SUMO-Familie eine geringe, aber noch deutliche Identität zu Ubiquitin auf. Der genaue Konjugationsmechanismus, einzelne Substrate und mit der Konjugation verbundene Funktionsänderungen werden in den nächsten Kapiteln eingehender erläutert.

Zwei interessante Ubiquitin-ähnliche Modifizierungsproteine sind Atg12 und Atg8. Beide sind in der Autophagozytose involviert und essentiell. Atg12 modifiziert Atg5, was eine verbesserte Bindung an Atg16 schafft und zu der Bildung eines Komplexes von ca. 350kDa führt (Mizushima et al., 1999; Mizushima et al., 1998). Der Komplex lokalisiert membranständig und ist Bestandteil der prä-autophagosomalen Struktur (PAS) durch die

## Einleitung

Autophagosomen generiert werden. Atg8 besitzt mit Phosphatidylethanolamin ein nicht proteinogenes Substrat, das erst durch die Konjugation mit Atg8 an Autophagosomen übermittelt werden kann (Ichimura et al., 2000).

Einen faszinierenden Einblick in die Evolutionsgeschichte der Ubiquitin Superfamilie ermöglicht Urm1. Urm1 besitzt eine größere Homologie zu den bakteriellen Schwefel-übertragenden Proteinen als zu Ubiquitin (Leidel et al., 2009; Leidel S, 2009; Nakai et al., 2008). Experimentell konnte eine Thioester-Bindung an das Protein UBA4 nachgewiesen werden, das wiederum einem verkürzten Ubiquitin-aktivierenden Enzym ähnelt. So finden wir eine ATP-bindende Domäne, während andere typische Domänen fehlen. Auffällig ist die Sequenz- und Strukturhomologie zum prokaryotischen Moad (Xu et al., 2006). Dieses Protein spielt eine entscheidende Rolle in der Biosynthese des Kofaktors Molybdopterin (MPT). Unter ATP-Verbrauch kann Moad mit Hilfe von MoadE und MoadB die Thiocarboxylierung von MPT katalysieren (Wuebbens und Rajagopalan, 2003). Der fertige Kofaktor wird dann in Enzymen wie der Sulfidoxidase oder Nitratreduktase benötigt. Ein weiteres Schwefel-übertragendes Protein ist ThiS. Unter zu Hilfenahme von ThiF überträgt ThiS eine Schwefelgruppe, die zur Synthese des Thiazolringes im Thiamin erforderlich ist (Taylor et al., 1998). Thiamin ist auch als Vitamin B1 bekannt und gehört zu den essentiellen Vitaminen.

Es lässt sich festhalten, dass Urm1 mit hoher Wahrscheinlichkeit das früheste Ubiquitin-ähnliche Protein ist und noch eine große Homologie zu bakteriellen Proteine besitzt. Dieses System bildet scheinbar durch die Entwicklung von ATP-verbrauchenden E1-ähnlichen Enzymen die Basis für alle anderen, weitaus komplexeren, Konjugationssysteme.

## 2.4 Das SUMO-System

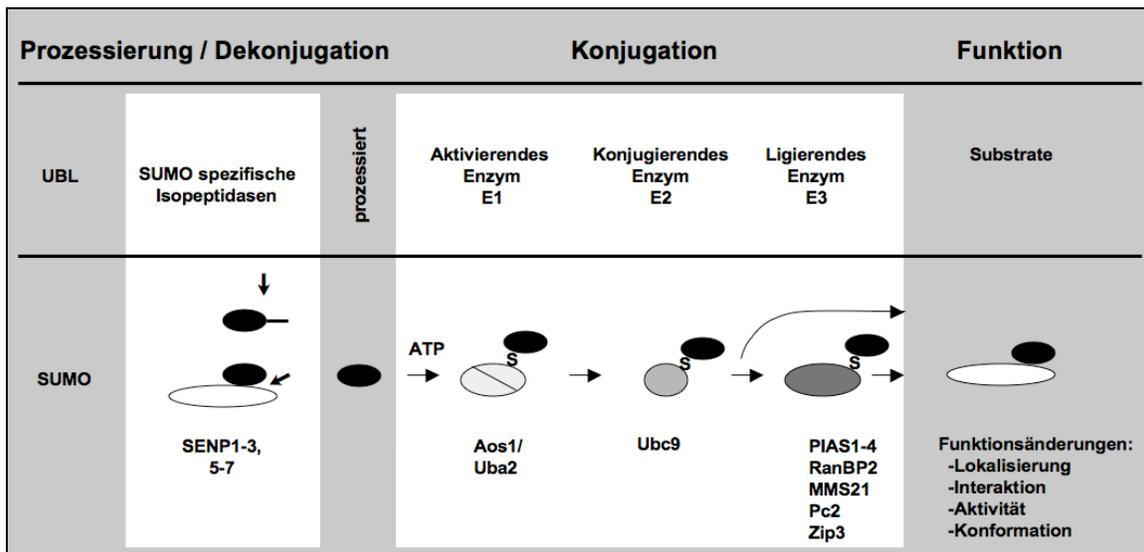
### 2.4.1 Konjugation und Dekonjugation

Im vorherigen Kapitel wurden Ubiquitin-ähnliche Proteine vorgestellt. Eine Familie dieser Proteinsuperfamilie sind die *small ubiquitin-like modifier* (SUMOs).

## Einleitung

Die verschiedenen SUMO-Mitglieder besitzen ca. 15% Sequenzidentität zu Ubiquitin und zeigen wie dieses dieselbe Faltung (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* tritt lediglich eine SUMO-Variante, SMT3, auf, in Säugetierzellen hingegen lassen sich vier finden. Die Bedeutung von SUMO4 scheint allerdings noch unklar, da es sich hierbei möglicherweise um ein Pseudogen handelt (Smyth et al., 2005).

SUMO1-3 gelten als konstitutiv exprimierte Gene. Vergleicht man diese drei SUMO-Paraloge untereinander, so ist auffällig, dass SUMO2 und SUMO3 eine Identität von 97% besitzen und aufgrund dessen experimentell nur schwer zu unterscheiden sind (Muller et al., 2001). SUMO1 grenzt sich von diesen beiden Proteinen mit einer Identität von 43% deutlich ab.



**Abb. 3: Prozessierung, Aktivierung, Konjugation und Dekonjugation von SUMO**

In einem ersten Schritt wird SUMO durch Isopeptidasen prozessiert und in seine konjugierbare Form überführt. In einer ATP-abhängigen Reaktion kann die prozessierte SUMO-Form kovalent über einen Thioester an das heterodimere E1 binden. Durch eine Transesterifizierung wird SUMO dann an das konjugierende Enzym Ubc9 gebunden. Ubc9 ist in der Lage SUMO alleine, oder optional zusammen mit ligierenden E3 Enzymen, auf ein Substratprotein zu übertragen. Die Sumoylierung eines Substrats ist reversibel und kann durch spezifische SUMO-Isopeptidasen gelöst werden.

Die Konjugation von SUMO erfolgt analog zu der von Ubiquitin, benötigt aber spezifische enzymatische Komponenten (Abb. 3). Durch SUMO-spezifische Cysteinproteasen (SENPs) wird der C-Terminus von SUMO entfernt und ein Di-

## Einleitung

Glycinmotiv freigesetzt (Muller et al., 2001). Unter ATP-Verbrauch bindet SUMO als Thioester an das heterodimere E1 Aktivierungsenzym Aos1/Uba2. Vom E1 wird SUMO durch eine Transesterifizierung auf Ubc9 übertragen. Im Gegensatz zum Ubiquitin-System ist im SUMO-System nur ein einziges konjugierendes Enzym bekannt.

Ligierende Enzyme sind im SUMO-System nur für einige spezifische Substrate essentiell. Obwohl zurzeit neun bekannte SUMO-Ligasen existieren, benötigen viele Substrate diese Enzyme für eine *in vitro* Konjugation nicht. In diesen Fällen findet eine direkte SUMO-Übertragung von Ubc9 auf das Substrat statt.

Die größte Gruppe von SUMO-Ligasen bilden die PIAS Proteine (*protein inhibitor of activated Stat*) (Schmidt und Muller, 2003). Es existieren fünf Proteine, PIAS1-4, wobei PIAS2 als eine  $\alpha$  und eine  $\beta$  Spleißvariante vorliegen kann. Unter den SUMO-Ligasen besitzen die PIAS Proteine die weitaus meisten Substrate. Für die Ligase-Aktivität von Bedeutung ist eine als SP-RING bezeichnete Domäne, die den RING Domänen von Ubiquitin-Ligasen der RING Familie ähnelt.

Eine vergleichbare SP-RING Domänenstruktur besitzen die PIAS-ähnlichen Proteine Zimp10 und Zimp7. Für Zimp10 konnte eine ligierende Aktivität bei der Sumoylierung des Androgen Rezeptors (AR) nachgewiesen werden und vergleichbar mit den PIAS Proteinen ist auch Zimp10 in der Lage die transkriptionelle Aktivität diverser Transkriptionsfaktoren (z.B. AR, p53 und Smad3) zu kontrollieren.

Ebenfalls eine SP-RING Domäne besitzt MMS21/NSE2. Diese Ligase ist Bestandteil des oktamerischen SMC5/6-Komplexes und bekannte Substrate sind SMC5 und das DNA-Reparaturprotein TRAX. Eine durch siRNA induzierte Depletion von MMS21/NSE2 leitet eine Hyperaktivierung von ATM/ATR ein und verstärkt durch DNA-Schäden induzierte Apoptose (Potts und Yu, 2005). Zudem wurde eine Funktion zur Erhaltung der Integrität von Telomeren beschrieben, wobei diese Funktion höchstwahrscheinlich über die Zielproteine TRF1/2 gesteuert wird (Potts und Yu, 2007).

## Einleitung

Auch das in *Saccharomyces cerevisiae* beschriebene Zip3 besitzt eine SP-RING Domäne. Für diese Ligase ist derzeit kein Substrat bekannt und die Ligase-Aktivität konnte bislang lediglich durch Analyse der Gesamtsumoylierung gezeigt werden. Als putatives Substrat gilt Red1, was im Einklang zur unabdingbaren Funktion von Zip3 bei der Assemblierung des synaptomalen Komplexes in der Meiose steht. Des Weiteren konnte ein Zusammenspiel mit Zip1 gezeigt werden, das in der Lage ist sehr effizient an SUMO zu binden (Cheng et al., 2006a).

RanBP2 wurde nach der PIAS Familie als zweite SUMO-Ligase identifiziert (Pichler et al., 2002). RanBP2 gehört zu den Kernporinen und lokalisiert in der Interphase am Kernporen-Komplex, wandert aber in der Mitose zum Centromer/Kinetochor. Diese Ligase verfügt nicht über eine SP-RING Domäne. Die ligierende Aktivität von RanBP2 konnte so genannten *internal repeats* (IR) zugeordnet werden. Das erste gefundene *in vivo* Substrat von RanBP2 ist Topoisomerase-II $\alpha$  (Dawlaty et al., 2008). Erst eine RanBP2 katalysierte Sumoylierung der Topoisomerase ermöglicht es dieser die Auflösung von Schwestercentromeren zu initiieren.

Eine SUMO-Ligase mit nur wenigen bekannten Substraten ist Pc2 (*polycomb2*) (Kagey et al., 2003). Pc2 besitzt ebenfalls wie RanBP2 keinen SP-RING. Die Ligase-Aktivität konnte zwei Domänen zugeordnet werden, dabei erwies sich eine C-terminale Domäne mit Fähigkeit zur Substrat- und Ubc9-Bindung und eine N-terminale Chromodomäne als wichtig.

Für alle SUMO-Varianten ist in Bezug auf die Konjugationstelle ein Konsensusmotiv beschrieben (Duprez et al., 1999). Dies definiert ein Lysin zwischen einer hydrophoben Aminosäure und der sauren Aminosäure Glutamat ( $\psi$ KxE) als preferentielles Ziel für eine SUMO-Modifikation. Viele der gefundenen sumoylierten Lysine liegen aber nicht in einem derartigen Motiv. Interessanterweise findet das SUMO-Konsensusmotiv noch eine Erweiterung im PDSM (*phospho-dependent SUMO motif*). Die Erweiterung besteht aus einem Serin- und einem Prolinrest ( $\psi$ KxExxSP), wobei eine Phosphorylierung des Serins die SUMO-Modifikation stark induziert (Hietakangas et al., 2006). Hierbei

## Einleitung

scheint die negative Ladung der Phosphatgruppe von entscheidender Bedeutung zu sein, da ein ähnliches Motiv auch mit sauren Aminosäuren nachgewiesen werden konnte ( $\psi KxExx(E/D)_4$ ) (Yang et al., 2006).

SUMO wird sowohl als Monomer als auch als Polymer in Form von SUMO-Ketten an Zielproteine konjugiert. Dabei können diese Ketten aus einer Mischung von SUMO1 und SUMO2/3 bestehen, jedoch ist mit dem Lysin 11 (K11) die hauptsächliche interne Konjugationsstelle ausschließlich in SUMO2/3 zu finden, so dass SUMO1 wahrscheinlich den Abschluss einer gemischten Kette bildet (Matic et al., 2008b). Vorläufige Ergebnisse zeigen auch, dass Ketten an Ubc9 gebildet und konjugiert werden können (Knipscheer et al., 2007). Funktionelle Unterschiede zwischen Mono- und Polysumoylierung sind derzeit ebenso wie die Paralog-spezifischen Effekte von SUMO noch weitgehend unklar. *In vivo* Relevanz konnte jedoch für SUMO2/3-Ketten beim Ubiquitin-abhängigen Abbau von PML gezeigt werden (Tatham et al., 2008). Außerdem scheint zellulärer Stress (Hitzeschock, erhöhte Osmolarität usw.) eine Kettenformation zu begünstigen (Saitoh und Hinchey, 2000).

Wie die Ubiquitylierung ist auch die Sumoylierung ein reversibler Prozess. Die Hydrolyse vom Substrat wird, wie auch die Prozessierungsreaktion, von SUMO-spezifischen Proteasen durchgeführt. In menschlichen Zellen werden sechs dieser Proteasen (SEN1-3,5-7) gefunden, in der Bäckerhefe sind zwei (Ulp1/2) bekannt (Hay, 2007; Mukhopadhyay und Dasso, 2007; Seeler und Dejean, 2003). Gemeinsam ist diesen Proteinen eine C-terminale Domäne, die durch eine katalytische Triade (Cystein, Histidin, Aspartat) hydrolytische Reaktionen katalysiert. Entsprechend gehören alle SUMO-spezifischen Proteasen zur Familie der Cysteinproteasen (Hay, 2007). Durch unterschiedliche Lokalisierung in Zellkompartimenten und eine Präferenz für die einzelnen SUMO-Formen scheinen den verschiedenen Mitgliedern der SENP-Familie individuelle Funktionen bei der Regulation von SUMO-Zielproteinen zuzukommen. So lokalisiert z.B. eine der beiden Ulp-Formen aus *Saccharomyces cerevisiae* im Kernporen-Komplex (Ulp1), während die andere Protease (Ulp2) eine nukleäre Lokalisierung zeigt.

## Einleitung

In Säugerzellen hat SENP1 ein weites Spektrum an Zielproteinen, lokalisiert in subnukleären Foci und katalysiert die Hydrolyse von SUMO1-3 (Mukhopadhyay und Dasso, 2007). Dass dieses Protein einen entscheidenden Anteil am Niveau der zellulären Sumoylierung hat unterstreichen Versuche an einer *knock-out* Maus. Diese Mäuse weisen eine gestörte Entwicklung im embryonalen Stadium auf und sterben 13-15 Tage nach der Befruchtung (Cheng et al., 2007).

SENP2 katalysiert ebenfalls wie SENP1 die Spaltung aller drei SUMO-Formen, lokalisiert dabei aber vorwiegend an der Kernmembran (Mikolajczyk et al., 2007). In der Mitose demodifiziert SENP2 CENP-E, ein Kinetochor-assoziiertes Protein und trägt so zum Fortschreiten des Zellzyklus bei (Zhang et al., 2008). Neben der Transkription (Best et al., 2002; Ross et al., 2002) kann SENP2 zusätzlich die Entwicklung der Plazenta steuern (Chiu et al., 2008).

Im Nukleolus lokalisieren SENP3 und SENP5. Diese beiden Proteasen präferieren die Hydrolyse von SUMO2/3, unterscheiden sich aber zum Teil in ihren Substraten (Gong und Yeh, 2006). SENP3 fällt eine wichtige Funktion in der Prozessierung ribosomaler RNA zu, hierfür scheint ein Hauptzielprotein Nukleophosmin zu sein (Haindl et al., 2008). Eine derartige Substratpräferenz ist für SENP5 nicht bekannt. Eine Depletion dieser Protease ruft Störungen in der Zellteilung hervor (Di Bacco et al., 2006). Zusätzlich ist auch eine Lokalisierung in Mitochondrien beschrieben, wo es möglicherweise eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Morphologie spielt (Zunino et al., 2007).

Die SUMO-Isopeptidase SENP6 ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma zu finden. Eine Affinität zu SUMO-Ketten wird berichtet und zeigt sich nach RNAi-vermittelter Depletion in einem Anstieg von SUMO-Ketten. Bei dieser wird SUMO2/3 verstärkt in PML *nuclear bodies* gefunden und hochmolekulare Signale zeigen eine vermehrte Modifikation mit SUMO-Ketten an (Mukhopadhyay et al., 2006).

SENP7 ist die am schlechtesten beschriebene SUMO-Isopeptidase. Gesichert scheint eine Lokalisierung im Nukleoplasma und diskutiert wird eine Präferenz für SUMO-Ketten (Cheng et al., 2006b).

## Einleitung

### 2.4.2 Funktionelle Konsequenzen der SUMO-Modifikation am Beispiel des NF $\kappa$ B-Signalwegs

Im Gegensatz zu Ubiquitinketten, deren Konjugation überwiegend zu einem proteasomalen Abbau führt, wirkt sich eine kovalente Modifikation mit SUMO sehr individuell und vielseitig auf die jeweiligen Zielproteine aus. Die Vielseitigkeit der SUMO-Zielproteine spiegelt sich auch in der Diversität wieder, die SUMO auf die Funktion von zellulären Prozessen hat. SUMO beeinflusst den Zellzyklus, die Ribosomenbiogenese, den nukleo-zytoplasmatischen Austausch ebenso wie transkriptionelle Prozesse und die DNA-Reparatur (Muller et al., 2004).

Diese diversen Funktionen lassen sich aber auf molekularer Ebene durch einige wenige Mechanismen erklären. So kann SUMO in einigen untypischen Fällen die Faltung von Zielproteinen beeinflussen, scheint aber in den meisten Fällen als eine Interaktionsplattform zu dienen, über die spezifische Bindungspartner durch eine nicht-kovalente Bindung rekrutiert werden (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). Dieser Mechanismus wird in den nächsten beiden Kapiteln eingehender beschrieben. In seltenen Fällen, wie z. B. zwischen CtBP und nNos, kann eine Sumoylierung auch Proteininteraktionen unterbinden (Lin et al., 2003).

Um den Einfluss von SUMO auf einen zellulären Signalweg zu zeigen, soll hier stellvertretend der NF $\kappa$ B-Weg betrachtet werden. Der NF $\kappa$ B-Weg wird über verschiedene Liganden und Rezeptoren aktiviert (Abb. 4). Die Aktivierung des Signalweges führt zur Phosphorylierung der Kinase IKK, die wiederum in der Lage ist den NF $\kappa$ B-Inhibitor I $\kappa$ B zu phosphorylieren. Eine Phosphorylierung von I $\kappa$ B bewirkt eine anschließende Ubiquitin-abhängige Degradation, so dass das jetzt ungebundene NF $\kappa$ B in den Nukleus transloziert und dort Zielgene aktivieren kann (Perkins, 2007).

Eine Sumoylierung von I $\kappa$ B wirkt sich auf diesen Signalweg deaktivierend aus, da SUMO an dasselbe Lysin (K21) konjugiert wie Ubiquitin und so den Abbau von I $\kappa$ B verhindert. I $\kappa$ B ist damit weiterhin in der Lage NF $\kappa$ B zu inhibieren (Desterro et al., 1998). Mechanistisch handelt es sich hier also um eine zur

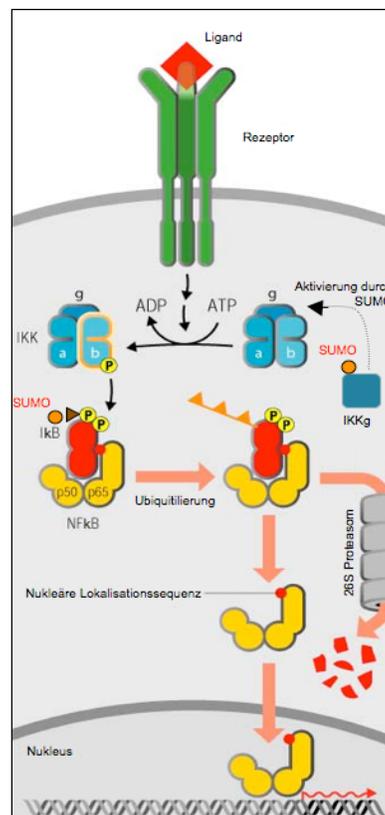
## Einleitung

Ubiquitylierung antagonistische Konjugation von SUMO. Durch diese Modifikation des ansonsten ubiquitylierten Lysins wird ein proteasomaler Abbau verhindert.

Neben I $\kappa$ B wird auch die als NEMO bekannte  $\gamma$ -Untereinheit der Kinase IKK sumoyliert (Huang et al., 2003). Eine Sumoylierung von NEMO wirkt sich auf den gesamten Signalweg aktivierend aus. Durch eine Sumoylierung lokalisiert NEMO vom Zytoplasma in den Zellkern (Mabb et al., 2006). Dort wird die Sumoylierung entfernt und das Protein ubiquityliert. Durch eine weitere Translokation vom Kern zum Zytoplasma ist NEMO fähig mit den beiden weiteren Untereinheiten von IKK zu interagieren und einen funktionellen Komplex zu bilden. Dieser kann den Inhibitor I $\kappa$ B phosphorylieren und abbauen.

**Abb. 4: Der NF $\kappa$ B-Signalweg**

NF $\kappa$ B ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, der Gene einer großen biologischen Bandbreite kontrolliert. Die Kontrolle von NF $\kappa$ B erfolgt dabei über eine Bindung und Inhibition durch I $\kappa$ B. Zytokine, LPS und Wachstumsfaktoren aktivieren den IKK-Komplex (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und NEMO), der wiederum I $\kappa$ B phosphoryliert. Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B führt zur Ubiquitylierung und zu einem anschließenden proteasomalen Abbau, so dass NF $\kappa$ B aktiviert wird. Zusätzlich eingezeichnet sind die Sumoylierungen von I $\kappa$ B und NEMO und deren funktionelle Konsequenzen.



Bei einem weiteren Blick zeigt der NF $\kappa$ B-Signalweg auch, wie SUMO Transkriptionsprozesse beeinflussen kann. Das iNos-Gen ist ein Zielgen, das

## Einleitung

durch NF $\kappa$ B aktiviert wird. Dafür muss ein Repressorkomplex, bestehend aus HDAC3-NCoR, der sich am iNos-Promotor befindet, degradiert und durch NF $\kappa$ B ersetzt werden. Durch eine Sumoylierung des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  und eine anschließende Bindung von SUMO-PPAR $\gamma$  an HDAC3-NCoR kann der Repressorkomplex aber vor einem Abbau bewahrt werden und ist weiter fähig das iNos-Gen zu reprimieren (Pascual et al., 2005).

Mit fortschreitender Arbeit wird immer deutlicher, dass SUMO in Verbindung mit diversen anderen posttranslationalen Modifikationssystemen steht. So wurden Signalintegrationen von SUMO und Phosphatgruppen, aber auch mit Ubiquitin und Acetylgruppen beobachtet. Ein, in diesem Zusammenhang, gut untersuchtes Protein ist MEF2A, bei dem eine Phosphorylierung an Serin 408 das Umschalten von Sumoylierung auf Acetylierung an Lysin 403 bewirkt. Dieses Umschalten wiederum bewirkt eine Inhibierung der dendritischen Differenzierung (Shalizi et al., 2006).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass SUMO im Zusammenspiel mit anderen Modifikationen auftritt und in vielen Signalwegen wichtige Funktionen besitzt, wobei die Anzahl an Substraten und Funktionen stetig wächst. Die Variabilität und Bedeutung des Systems zeigt sich auch darin, dass Viren das SUMO-System ihrer Wirte nutzen und es für sie eine essentielle Bedeutung erlangt hat.

## 2.5 Das SUMO-Interaktions-Motiv (SIM)

### 2.5.1 Strukturelle Kennzeichen

Im Jahr 2000 beschrieben *Minty et al.* in Hefe *two-hybrid* (Y2H) Untersuchungen eine Sequenz von 10 Aminosäuren (P-I-I-L-S-D-S-E-E-E-E) aus dem Protein PMSCL1, die eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO vermittelt (Minty et al., 2000). Die Feinkartierung ergab, dass für diese Bindung vor allem das S-x-S Motiv entscheidend ist. Diese Sequenzabfolge findet sich auch in anderen SUMO-bindenden Proteinen, wie PML und Mitgliedern der PIAS Familie.

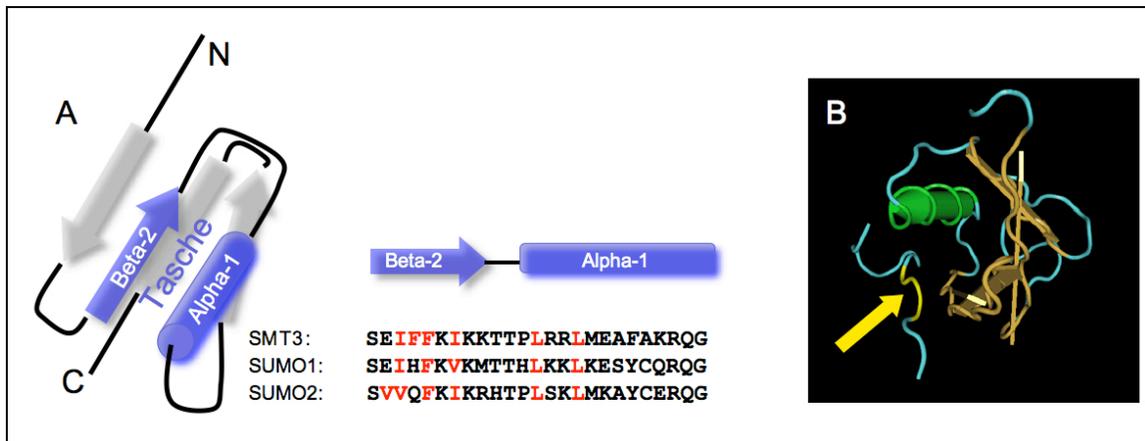
## Einleitung

Dadurch schlossen Minty *et al.*, dass es sich hierbei um ein allgemeines Motiv zur SUMO-Bindung handelt. Allerdings konnten spätere Arbeiten, vor allem an PML und PIAS zeigen, dass die Hauptbindestelle für SUMO nicht die S-x-S Sequenz ist, sondern in einem benachbarten hydrophoben Bereich von drei bis vier aliphatischen Aminosäuren liegt (Song *et al.*, 2004). Eine derartige Sequenz mit Fähigkeit zur SUMO-Bindung wird als SUMO-Interaktions-Motiv (SIM) bezeichnet. Es lässt sich nur eine vage Konsensussequenz angeben, da zumeist aber Valin- (V) und Isoleucinreste (I) den Kern bilden, werden häufig [V/I]-x-[V/I]-[V/I] oder [V/I]-[V/I]-x-[V/I] Sequenzen gefunden (Kerscher, 2007). Aber auch der Einbau eines Leucins (L) oder eine Extension von hydrophoben und unspezifischen Aminosäuren ist nicht ungewöhnlich. Neben dem hydrophoben Kern konnte in einigen Fällen auch ein Einfluss von benachbarten sauren Aminosäuren auf die SUMO-Bindung beobachtet werden (Hecker *et al.*, 2006). Durch die Lösung der Struktur von SUMO mit einem SIM-beinhaltenen Peptid konnten weitere Details der Interaktion geklärt werden (Abb. 5B). So wurde klar, dass das SIM in einer hydrophoben Tasche, gebildet durch das zweite  $\beta$ -Faltblatt (Beta-2) und die  $\alpha$ -Helix (Alpha-1) von SUMO, bindet (Song *et al.*, 2005). Diese Tasche wird hauptsächlich aus hydrophoben und aromatischen Aminosäuren gebildet. Für SUMO1 konnte für eine ganze Reihe dieser Aminosäuren (I34, F36, V38, L44, L48) durch Kernmagnetresonanz-Experimente der direkte Nachweis an einer SIM-Bindung erbracht werden (Hecker *et al.*, 2006) (Abb. 5A). Durch Versuche mit entsprechenden Mutanten konnten diese Ergebnisse verifiziert werden. Neben den hydrophoben und aromatischen ist auch für einige positiv geladene Aminosäuren, wie z. B. Lysin 39, eine Beteiligung an der Bindung bekannt. Interessanterweise scheinen Teile des SUMO-Interaktions-Motivs auch ein  $\beta$ -Faltblatt auszubilden, was eine Interaktion zum  $\beta$ -Faltblatt von SUMO verstärkt (Baba *et al.*, 2005).

Eine Präferenz von SIMs zur Bindung einer speziellen SUMO-Form besteht in der Regel nicht, doch konnte eine aktuelle Publikation die bevorzugte Bindung von SUMO2 über SUMO1 durch die Ubiquitin-Protease Usp25 zeigen

## Einleitung

(Meulmeester et al., 2008). Eine erhöhte Affinität zu SUMO-Ketten konnte bisher nur für die Ubiquitin-Ligase RNF4 nachgewiesen werden (Tatham et al., 2008).



**Abb. 5: Strukturkomponenten der nicht-kovalenten SUMO-Interaktion**

(A) Model der Faltung von SUMO. Hervorgehoben sind das  $\beta$ -2 Faltblatt und die  $\alpha$ -1 Helix und die von ihnen geformte hydrophobe Tasche. Der zusätzliche Sequenzvergleich von SMT3, SUMO1 und SUMO2 zeigt die an der Formung der hydrophoben Tasche beteiligten Aminosäuren (rot dargestellt). (B) Struktur eines 14 Aminosäure großen Peptides von PIAS1, das an SUMO gebunden ist. Das Peptid beinhaltet unter anderem die hydrophoben Aminosäuren, für die eine Beteiligung an der nicht-kovalenten SUMO-Bindung beschrieben ist. Diese Aminosäuren (Valin, Isoleucin, Aspartat und Leucin) sind in gelb hervorgehoben und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Sehr gut ist die Bindung in die hydrophobe Tasche zwischen der  $\alpha$ -1 Helix (grün) und dem  $\beta$ -2 Faltblatt (braun) zu erkennen (nach Song *et al.*).

Werden nicht-kovalente Interaktionen von SUMO und Ubiquitin verglichen, ist auffällig, dass im Gegensatz zum Ubiquitin mit 17 bekannten Interaktionsdomänen für SUMO nur eine einzige, das SIM, bekannt ist. Während Ubiquitin-Bindedomänen eine globuläre Struktur (z.B. Zinkfinger) bilden, ist dies beim SIM nicht nötig. Auch in der Interaktionsoberfläche unterscheiden sich Ubiquitin und SUMO. Ubiquitin interagiert größtenteils über das Leucin 44, eine homologe Aminosäure ist in SUMO nicht zu finden. SUMO/SIM-Interaktionen finden in einer vollständig abweichenden Fläche, der hydrophoben Tasche zwischen  $\beta$ -2 und  $\alpha$ -1, statt, die keine Entsprechung in Ubiquitin hat. Mit  $K_D$  Werten von 2-3 $\mu$ M bindet ein SIM bedeutend stärker an SUMO als Ubiquitin-Bindedomänen an Ubiquitin ( $K_D$  10-500 $\mu$ M) (Kerscher, 2007). Wie zuvor erwähnt besitzen Ubiquitin-bindende Proteine ein großes Arsenal an Möglichkeiten die Bindung zu verstärken um physiologische Relevanz zu erreichen. Derartige

## Einleitung

Mechanismen sind in der SUMO/SIM-Bindung bisher kaum bekannt. Einzig für RNF4 konnten sich wiederholende Tandem-SUMO-Interaktions-Motive erkannt werden, die eine Bindung an SUMO-Ketten von PML ermöglichen (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008).

### 2.5.2 Funktionelle Auswirkungen von nicht-kovalenter SUMO-Bindung

Nach dem im letzten Kapitel strukturelle Aspekte der nicht-kovalenten SUMO-Bindung besprochen wurden, soll dieses Kapitel die funktionellen Facetten hervorheben. Obwohl die Untersuchungen zur nicht-kovalenten SUMO-Interaktion durch das SIM erst am Anfang stehen, sind doch einige gut verstandene und physiologisch relevante Beobachtungen darunter, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

Bei der Replikation stellen DNA-Schäden oder blockierte Replikationsgabeln erhebliche Probleme für eine Zelle dar. PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) ist ein an der Replikation beteiligtes Protein, das die Prozessivität verschiedener DNA-Polymerasen erhöht. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* konnten Monoubiquitylierung, Polyubiquitylierung und Sumoylierung von PCNA gezeigt werden (Hoegel et al., 2002), wobei die Sumoylierung mit einer verstärkten fehlerfreien DNA-Replikation einhergeht. Wie sich herausstellte, kann PCNA in der S-Phase sumoyliert werden und spezifisch mit der Helikase SRS2 interagieren, die an ihrem C-terminalen Ende ein SIM besitzt (Papouli et al., 2005; Pfander et al., 2005). Des Weiteren ist SRS2 fähig, über die Zerstörung von nukleären Rad51-Filamenten, homologe Rekombination zu beeinträchtigen. So haben wir hier einen SUMO-abhängigen Mechanismus, mit dem sich replizierende DNA, speziell in der S-Phase, vor homologer Rekombination schützen kann.

Ein besonders faszinierendes Beispiel für eine SUMO/SIM-Interaktion ist von der Uracil/Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) bekannt. Hier interagieren SIM und SUMO intramolekular. TDG besitzt eine Funktion im *base excision repair*

## Einleitung

(BER). Das Enzym kann dazu von falsch gepaartem Thymin und Uracil die Basen herausschneiden und einen DNA-Doppelstrang ohne entsprechende Base schaffen. Danach verbleibt TDG fest mit der DNA verbunden. Es stellte sich heraus, dass die Sumoylierung von TDG ein Signal zur Freigabe des Enzyms von der DNA ist (Hardeland et al., 2002). Des Weiteren wird auch ein nahe gelegenes SIM benötigt (Steinacher und Schar, 2005). Durch Strukturanalysen wurde zusätzlich gezeigt, dass ein kovalent gebundenes SUMO-Protein fähig ist, intramolekular mit dem benachbarten SIM zu interagieren und so wahrscheinlich eine Konformationsänderung im C-Terminus induziert, die zur Freigabe der TDG von der DNA führt (Baba et al., 2005).

Anhand der nächsten Beispiele wird deutlich, dass über SUMO/SIM-Interaktionen auch Lokalisierungsveränderungen erfolgen können. So ist die Lokalisierung von RanGAP1 am NPC (*nuclear pore complex*) abhängig von der Interaktion zu RanBP2 und von der eigenen Sumoylierung (Mahajan et al., 1997). Dabei ist der C-Terminus von RanBP2 von essentieller Bedeutung für diese Interaktion. In späteren Studien konnte ein SIM in diesem C-Terminus gefunden werden, so dass eine SUMO/SIM-Bindung als maßgeblicher Aspekt für die NPC-Lokalisierung von RanGAP1 gilt.

Auch die Rekrutierung von CENP-E zum Kinetochor verläuft über eine SUMO/SIM-Interaktion. Einen grundlegenden Stellenwert besitzt dabei das SIM von CENP-E (Zhang et al., 2008). Die gebundenen SUMO-Substrate hingegen sind nicht genau bekannt. BubR1 und Nuf2 gelten hier als viel versprechende sumoylierte Interaktoren.

Auch die katalytische Aktivität von Proteinen kann durch SUMO/SIM-Interaktionen beeinflusst werden. Die oben erwähnte Ubiquitin-spezifische Protease Usp25 wird durch eine kovalente Modifikation mit SUMO2 in ihrer katalytischen Aktivität inhibiert. Die kovalente Modifikation andererseits ist von der Integrität eines SIMs abhängig (Meulmeester et al., 2008).

Diese SIM-abhängige Sumoylierung ist höchst wahrscheinlich an eine SUMO-Modifikation von Ubc9 gekoppelt. Für SUMO-modifiziertes Ubc9 konnte eine veränderte Substratselektivität gezeigt werden, wobei bestimmte SIM-

## Einleitung

beinhaltende Proteine, wie z. B. Sp100, verstärkt sumoyliert werden (Knipscheer et al., 2008).

Eine besondere Bedeutung besitzen SUMO/SIM-Interaktionen im Aufbau von PML *nuclear bodies* / PML Foci. PML Foci sind distinkte subnukleäre Strukturen, deren Hauptstrukturkomponente das Protein PML (*promyelocytic leukemia*) ist. In einem Nukleus befinden sich ca. 10-20 dieser Foci, für die Funktionen in der Transkription, der Apoptose und der Immunabwehr beschrieben sind. PML war das zweite beschriebene SUMO-Substrat und wird an drei verschiedenen Lysinen stark sumoyliert (Muller et al., 1998). Zudem besitzt PML ein SIM. In einer aktuellen Publikation konnte eine Trans-Interaktion von SUMO modifizierten PMLs und PML-SIMs gezeigt werden (Shen et al., 2006). Da ein PML Protein drei modifizierte Lysine besitzt ist es in der Lage an drei verschiedene andere PML Proteine zu binden und so einen hoch verzweigten Komplex, den PML Foci, aufzubauen.

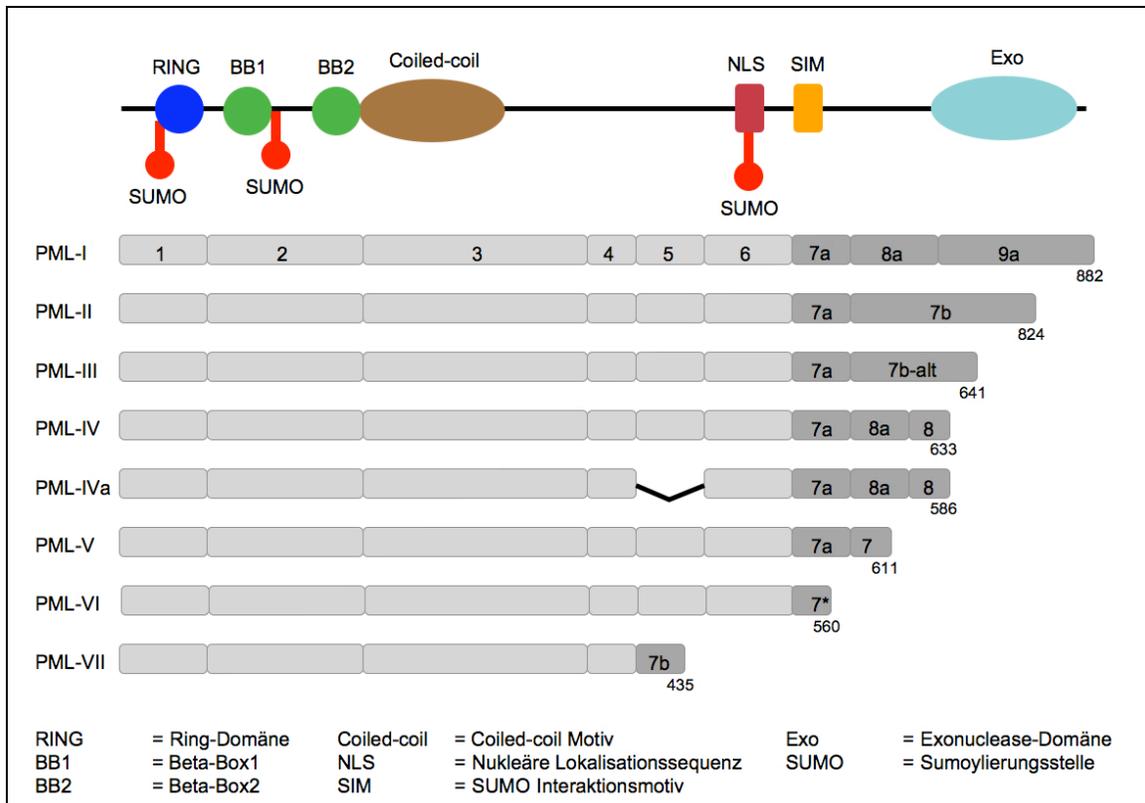
Interessanterweise sind auch andere Proteine fähig durch Sumoylierung oder ein SIM in PML Foci zu lokalisieren. So ist für den Korepressor Daxx ein Modell postuliert worden, in dem Daxx abhängig von seinem SIM zwischen PML Foci und sumoylierten Transkriptionsfaktoren lokalisiert (Lin et al., 2006).

SUMO/SIM-Bindungen können auch die Stabilität von Proteinen kontrollieren. Mit Slx5/Slx8 und Ris1 in der Hefe bzw. RNF4 beim Menschen wurden Ubiquitin-Ligasen beschrieben, die ein SIM enthalten und über dieses mit ihren Substraten interagieren (Prudden et al., 2007; Sun et al., 2007; Uzunova et al., 2007). Allgemein werden die SIM-beinhaltenden Ubiquitin-Ligasen als Stubbs (*SUMO-target ubiquitin ligases*) bezeichnet (Perry et al., 2008). Bevorzugt gebunden werden wahrscheinlich SMT3/SUMO-Ketten, was mit der Beobachtung sehr hoch molekularer Zielproteine übereinstimmt. Im humanen System konnte für RNF4 gezeigt werden, dass dieses Enzym PML SIM-abhängig degradiert. PML muss für diesen Ubiquitin-abhängigen Abbau mit SUMO-Ketten modifiziert werden (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008).

## Einleitung

### 2.6 Das PML (*promyelocytic leukemia*) Protein

PML erscheint in der Zelle in sieben Isoformen (Abb. 6). Allen Isoformen, eine Ausnahme bildet PML-VII, ist eine Modifikation mit SUMO an drei verschiedenen Lysin gemeinsam (Bernardi und Pandolfi, 2007). Auch die N-terminalen Domänen sind in allen Isoformen zu finden.



**Abb. 6: Domänenstruktur und *Splice*-Varianten von PML**

Dargestellt sind alle Domänen und posttranslationalen SUMO-Modifikationen von PML in den verschiedenen Isoformen. Am N-Terminus sind die zum Trim gehörenden Domänen (RING, Beta-Box und das Coiled-coil Motiv) gut zu erkennen. Zwei der drei Sumoylierungsstellen liegen in diesem Sequenzabschnitt. Interessanterweise fehlt der Isoform PML-VII neben der dritten Sumoylierungsstelle auch das SIM. Da sich aber Untersuchungen an einzelnen PML-Isoformen als kompliziert herausgestellt haben, können über funktionelle Auswirkungen dieses Fehlens keine Aussage getroffen werden. Die Exonuklease Domäne ist für PML-I spezifisch.

Dabei sind die RING-Domäne, die B-Boxen und die *Coiled-coil*-Domäne charakteristisch für die Familie der so genannten Trim Proteine (*tripartite motif*) (Jensen et al., 2001). Für viele dieser Trim Proteine konnte, basierend auf dem Vorkommen der RING-Domäne, eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität gezeigt werden

## Einleitung

(Meroni und Diez-Roux, 2005). Eine solche Aktivität ist für PML nicht bekannt. Vielmehr wird durch die enge Verknüpfung von PML zu SUMO (PML ist ein starkes SUMO-Substrat, PML beinhaltet ein SIM und viele Proteine lokalisieren SUMO-abhängig mit PML) eine SUMO-Ligase-Aktivität postuliert (Bernardi und Pandolfi, 2007). Versuche, die diese Aktivität an diversen Substraten zeigen sollten, blieben bislang ohne Erfolg. Den einzigen Hinweis auf eine SUMO-Ligase-Aktivität liefert ein Experiment, in dem in Hefe transfiziertes humanes PML eine Depletion der SUMO-Ligasen Siz1 und Siz2 kompensieren konnte (Quimby et al., 2006). Charakteristisch für PML ist die Lokalisierung in PML Foci. Interessanterweise ist die Lokalisierung in Foci für die Aktivität von PML von größter Bedeutung. PML besitzt Funktionen in der Transkription, der Immunantwort, der Proliferation, der Seneszenz und der Apoptose (Salomoni et al., 2008).

Durch eine chromosomale Translokation (t15;17) in einer Leukämieform kommt es zu einer Fusion mit dem Retinsäurerezeptor- $\alpha$ . Interessanterweise führt dies zum Fehlen des SIM und eine Lokalisierung in Foci ist nicht mehr gegeben. Durch diese Misregulation ist neben den proliferatorischen und apoptotischen Aufgaben von PML auch die Differenzierung reifer Granulozyten auf der Stufe der Promyelozyten blockiert (Melnick und Licht, 1999).

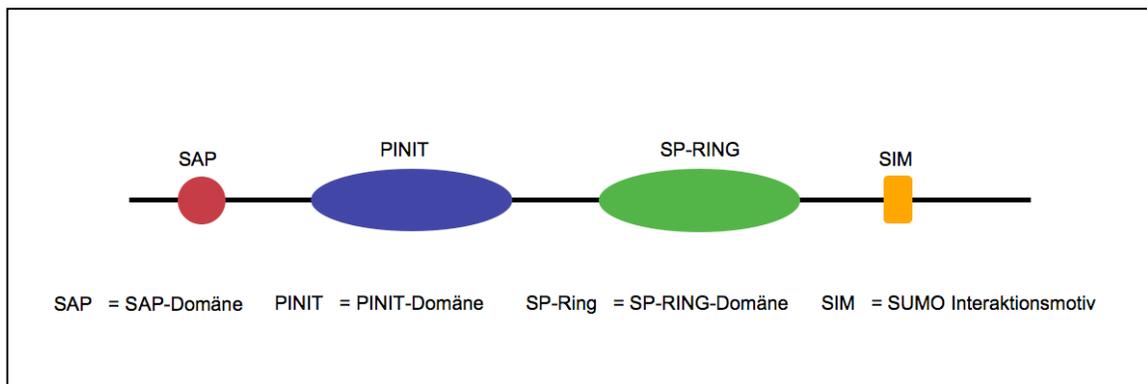
## 2.7 Die *protein inhibitor of activated Stat* (PIAS) Familie

Die PIAS (*protein inhibitor of activated Stat*) Familie hat im Menschen fünf Mitglieder. Proteine dieser Familie sind auch in der Hefe zu finden, dort allerdings nur mit zwei Mitgliedern (Siz1 und Siz2). Die fünf humanen PIAS Proteine besitzen, mit Ausnahme des C-Terminus, eine hohe Sequenzhomologie (Shuai, 2000; Shuai, 2006) (Abb. 7). Die vier bisher bekannten Domänen, SAP-Domäne, PINIT-Domäne, SP-RING-Domäne und das SIM, werden daher in allen Proteinen gefunden. Die SAP-Domäne (SAF-A/B, Acinus, PIAS) wird in Chromatin assoziierten Proteinen angetroffen und vermittelt eine direkte Bindung an DNA (Aravind und Koonin, 2000; Palvimo, 2007). Diese Domäne verfügt über

## Einleitung

eine große Bedeutung an der Lokalisierung in subnukleären Foci, in denen alle PIAS Proteine lokalisieren. Die Foci der einzelnen Familienmitglieder sind allerdings nicht identisch (Kotaja et al., 2002). Ebenfalls an der nukleären Lokalisierung von PIAS Proteinen beteiligt ist die 180 Aminosäuren große PINIT-Domäne (Duval et al., 2003). Die anderen beiden PIAS Domänen, die SUMO-Ligase-Aktivität-vermittelnde SP-RING Region und das SUMO-bindende SIM, wurden an anderer Stelle schon eingehender beschrieben.

Ursprünglich wurden PIAS Proteine als nukleäre Inhibitoren von Stat Proteinen gefunden (Chung et al., 1997; Liu et al., 1998). Stat Proteine werden zytoplasmatisch durch Janus Kinasen aktiviert und translozieren dann als Dimer in den Nukleus um dort Gene, wie z.B. der Immunabwehr, zu aktivieren. PIAS Proteine inhibieren die DNA-Bindung von Stat Proteinen und üben so einen reprimierenden Einfluss auf Stat aktivierte Gene aus. Neben den Stat Proteinen konnte eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. p53, als Interaktoren und zum Teil auch als SUMO-Substrate nachgewiesen werden (Schmidt und Muller, 2002).



### Abb. 7: Domänenstruktur der PIAS Proteine

In allen fünf PIAS Proteinen ist die selbe Ordnung von Domänen zu finden. Die Chromatin bindende SAP Domäne ist N-ständig. In etwa der Sequenzmitte der Proteine befindet sich der SP-RING. Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der enzymatischen SUMO-Ligase-Aktivität von PIAS Proteinen. Die C-terminalste Domäne ist das SUMO-bindende SIM.

Da in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit PIAS1 gearbeitet wurde und Auswirkungen einer spezifischen Phosphorylierung untersucht wurden, soll

## Einleitung

hier an einem analogen Beispiel beschrieben werden, welche Folgen eine Phosphorylierung von PIAS1 haben kann.

Für PIAS1 ist eine Regulation der Gene des Immunoglobulins Mu oder auch von MyoD über die DNA-Bindung von Msx1 bekannt (Dobrevá et al., 2003; Lee et al., 2006). Wie PIAS1 selbst aber reguliert werden kann war lange Zeit unklar. Erst 2007 konnten Liu *et al.* zeigen, dass PIAS1 durch die, aus dem NF $\kappa$ B-Weg stammende Kinase IKK $\alpha$  an Serin 90 phosphoryliert werden kann (Liu et al., 2007). Induziert wird die Phosphorylierung durch endzündungsspezifische Signale wie LPS und TNF $\alpha$ . Interessanterweise wirkt sich eine derartige Phosphorylierung negativ auf die Transkription NF $\kappa$ B-induzierter Gene wie Mip2 und Irf1 aus. Somit wird durch die Phosphorylierung von PIAS1 eine negative Regulation des NF $\kappa$ B-Weges erreicht. Ein entzündungshemmender Stimulus ist die Folge. Diese Experimente sind auch konsistent mit Daten aus einer PIAS1<sup>-/-</sup> Maus, in der die NF $\kappa$ B-regulierten Gene verstärkt transkribiert werden (Liu et al., 2004).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt neben der Phosphorylierung von PIAS1 eine Regulation durch eine Methylierung des Arginins 303. PRMT1 (*protein arginine methyltransferase 1*) fungiert dabei als Methyltransferase. Erst diese Modifikation erlaubt es PIAS1 an STAT1-abhängige Promotoren rekrutiert zu werden und diese zu reprimieren (Weber et al., 2009).

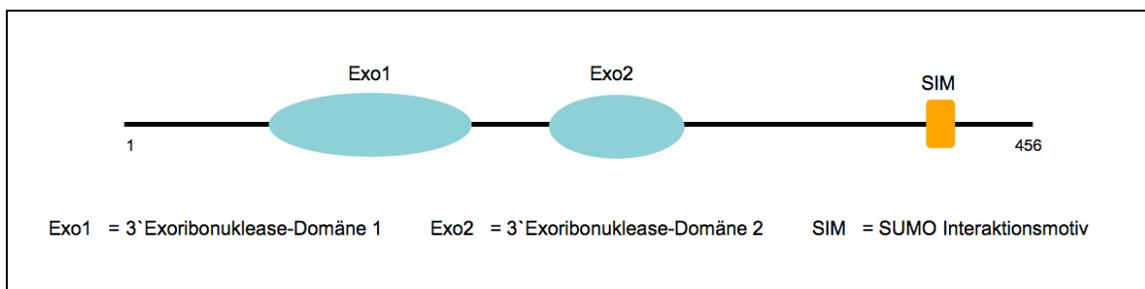
Diesese Beispiele zeigen eindrücklich, dass PIAS Proteine in ihrer Aktivität erheblich durch Phosphorylierungen und andere Modifikationen reguliert werden können.

## 2.8 Das Exosom und PMSCL1 (*Polymyositis-Sclerodermie*)

Das Protein PMSCL1 ist Bestandteil des humanen Exosomkomplexes. Das humane Exosom besteht aus neun zwischen 28 und 49kDa großen Proteinen (Brouwer et al., 2001b). Von diesen neun Proteinen bilden sechs eine

## Einleitung

Ringstruktur, wobei alle Ring-bildenden Proteine eine RNase PH Domäne (Abb. 8) besitzen und eine 3'-Exoribonuklease Aktivität aufweisen (Liu et al., 2006). Zu diesen Proteinen gehört auch PMSCL1. Ein häufig mit diesen neun Proteinen assoziiertes Protein ist PMSCL2. Interessanterweise lokalisiert PMSCL2 überwiegend im Nukleolus wohingegen die anderen Exosomkomponenten sowohl im Nukleolus als auch im Zytoplasma gefunden werden (Allmang et al., 1999; Brouwer et al., 2001a). Da im Nukleolus die Prozessierung von rRNA und kleinen nukleolären RNAs vom Exosom katalysiert wird, während zytoplasmatisch zu meist mRNAs degradiert werden, ist es möglich das PMSCL2 ein Schlüsselmodul für diesen funktionellen Wechsel ist. Für PMSCL1 zumindest konnte durch Depletierungsexperimente deutlich eine Beteiligung am Abbau von mRNAs mit ARE (*AU-rich elements*) Sequenzen nachgewiesen werden (Stoecklin et al., 2006).



### Abb. 8: Domänenstruktur von PMSCL1

PMSCL1 besitzt zwei 3'- Exoribonuklease Domänen mit deren Hilfe das Protein befähigt ist, rRNAs und mRNAs mit ARE Sequenzen zu degradieren. Auf molekularer Ebene ist PMSCL1 weitestgehend uncharakterisiert, so dass zusätzlich zu den Exoribonuklease Domänen nur die Existenz eines SIMs als gesichert gelten kann. Die molekularbiologischen Konsequenzen der nicht-kovalenten SUMO-Bindung sind allerdings nicht bekannt.

Das Exosom ist ein in der Evolution sehr konservierter und essentieller Komplex, auch in Archäen findet sich ein homologer Proteinaufbau, deshalb ist es nicht verwunderlich, dass Störungen der Aktivität zu Erkrankungen führen. Hierbei steht das Exosom in Verbindung mit Autoimmunerkrankungen, insbesondere bei einer Überschneidung von Polymyositis und Sklerodermie können in 31% der Fälle Antikörper gegen PMSCL1 und PMSCL2 nachgewiesen werden (Mahler und Raijmakers, 2007). Dabei ist die Angriffsstruktur der

## Einleitung

körpereigenen Antikörper gegen PMSCL1 der C-Terminus, in dem ein SUMO-Interaktions-Motiv zu finden ist (siehe Abb.8 ).

### 2.9 CK2 – eine Kinase, involviert in viele Signalwege

CK2 (ehemals Casein Kinase II) ist eine ubiquitär exprimierte Serin/Threonin Kinase, die eine konstitutive Aktivität aufweist und essentiell ist. Von CK2 phosphorylierte Serine und Threonine liegen bevorzugt in Anhäufungen von sauren Aminosäuren, wie Aspartat- und Glutamatresten ([T/S]-x-x-[E/D]) und vermitteln so eine gewisse Spezifität der Phosphorylierung (Duncan und Litchfield, 2008). Da ein derartiges Konsensusmotiv aber ein großes Spektrum an Proteinen betrifft, konnten bis heute über 300 verschiedene Substrate gefunden werden. Weil diese große Anzahl an Substraten zum Teil auch auf *in vitro* Daten basiert, bleibt zu untersuchen welche der Substrate auch *in vivo* Relevanz besitzen (Meggio und Pinna, 2003).

Das aktive heterotetramerische Holoenzym besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\alpha'$ ) und zwei regulatorischen Untereinheiten ( $\beta$ ), die in  $\alpha_2\beta_2$ , oder  $\alpha\alpha'\beta_2$ , oder  $\alpha'_2\beta_2$  Konfiguration existieren (Litchfield, 2003). CK2 ist in verschiedene Signalwege involviert, unter anderem auch in Wege, die Zellwachstum und Proliferation betreffen. So kann CK2 den Wnt-Signalweg durch Phosphorylierung und anschließende Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin beeinflussen oder reguliert den NF $\kappa$ B-Weg durch Phosphorylierung von Card9 und I $\kappa$ B (Kato et al., 2003; Seldin et al., 2005; Yang et al., 2007). Bemerkenswerterweise wird der Promotor des CK2 $\alpha$  Gens wiederum stark durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B reguliert (Krehan et al., 2000). Des Weiteren ist CK2 in der Kontrolle von p53 und Zytokin-Signalwegen involviert. Zusätzlich ist die Kinase ein bekannter Apoptose-Suppressor, obgleich sie selber nicht onkogen ist. Interessanterweise zeigen Krebszellen ein erhöhtes CK2-Proteinlevel im Kern und CK2 kann deshalb als prognostischer Marker genutzt werden (Sarno und Pinna, 2008). Zusätzlich ist es wahrscheinlich, dass das

## Einleitung

Zellwachstum von Kern-assoziierten CK2-Substraten reguliert wird. Neben der Tumor-fördernden Wirkung scheint CK2 auch Antitumorwirkstoffen entgegen zu wirken.

Die Aktivität von CK2 kann spezifisch gehemmt werden, wie das Vorhandensein von ca. 20 kommerziell erhältlichen Inhibitoren beweist (Pagano et al., 2008). Die Tumor-fördernde Wirkung und die Existenz mehrerer bekannter Inhibitoren machen CK2 entsprechend zu einem aussichtsreichen Ziel neuer Krebsmedikamente, deren Entwicklung Gegenstand aktueller Forschung ist (Sarno und Pinna, 2008).

Ein Zusammenhang zwischen CK2- und dem SUMO-Signalweg war, vor dem Anfertigen dieser Arbeit, nicht bekannt.

### 2.10 Zielsetzung der Arbeit

Posttranslationale Modifikationen durch das SUMO-System sind in viele zelluläre Schlüsselfunktionen wie der DNA-Reparatur, der Transkriptionskontrolle oder dem Kerntransport involviert. Dabei zeigte sich eine nicht-kovalente Bindung zwischen SUMO und SUMO-Interaktions-Motiven (SIMs) als bedeutender, einheitlicher Funktionsmechanismus. Als charakteristisch für alle bisher gefundenen SIM-Module gilt ein Bereich von hydrophoben Aminosäuren. Durch einen Sequenzvergleich aller vier Mitglieder der PIAS Familie, die ein oben genanntes SIM tragen, wurde ersichtlich, dass zusätzlich zum hydrophoben Kern Serine und azide Aminosäuren für die nicht-kovalente SUMO-Bindung von Bedeutung sein können.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Relevanz der genannten Serine für die nicht-kovalente Bindung zu untersuchen. Diese, so wurde angenommen, könnte in einer Phosphorylierung der Serine liegen. Auf diese Weise könnte neben der hydrophoben Wechselwirkung auch eine elektrostatische Wechselwirkung an SUMO entstehen. Als entscheidend galt hier der Nachweis dieser Phosphorylierung und die Identifikation einer Kinase. Zusätzlich sollten im Fall einer elektrostatischen Wechselwirkung die entsprechenden

## **Einleitung**

Akzeptoraminosäuren in SUMO charakterisiert und biologische Funktionen für eine derartige Bindung aufgezeigt werden.

Da durch einen Sequenzvergleich weitere Proteine mit einer den PIAS Proteinen vergleichbaren SIM-Struktur identifiziert werden konnten, sollte durch Untersuchungen des Tumorsuppressors PML und der Exosomenkomponente PMSCL1 das Konzept einer phosphorylierungsabhängigen SUMO-Bindung generalisiert werden.

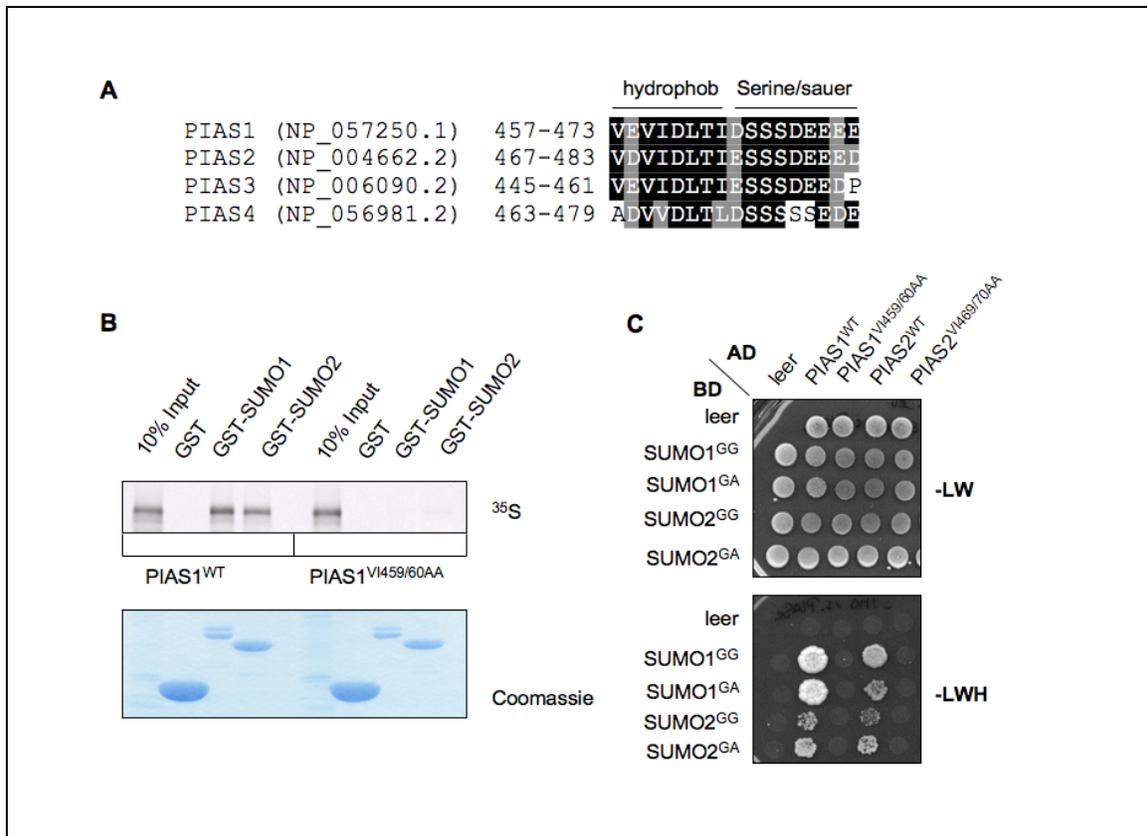
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 PIAS Proteine sind über ein SIM zur nicht-kovalenten Interaktion mit SUMO befähigt

In diversen Publikationen wurden zunächst verschiedene Sequenzmotive beschrieben über die eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO vermittelt wird. Letztendlich konnte ein Bereich von hydrophoben Aminosäuren als gemeinsame Voraussetzung für alle bisher gefundenen SUMO-Interaktoren charakterisiert werden. Dieser Bereich enthält die Konsensussequenz [V/I]-[V/I]-x-[V/I] bzw. [V/I]-x-[V/I]-[V/I] (Song et al., 2004).

Für Mitglieder der PIAS Familie wurde eine nicht-kovalente Bindung an SUMO gezeigt (Minty et al., 2000) und ein Sequenzvergleich aller PIAS Proteine offenbart ein SUMO-Interaktions-Motiv der oben beschriebenen Konsensusform (Abb. 9A). Um die Relevanz der hydrophoben Aminosäuren bei der Bindung an SUMO zu überprüfen, wurden zunächst exemplarisch mit PIAS1 Bindungsstudien durchgeführt. Dafür wurden PIAS1<sup>WT</sup> und PIAS1<sup>V1459/60AA</sup>, eine Mutante in der zwei der hydrophoben Aminosäuren des Konsensusmotivs gegen Alanine ausgetauscht wurden, *in vitro* transkribiert und translatiert und die Proteine hierbei mit <sup>35</sup>S radioaktiv markiert. Die so synthetisierten PIAS Formen wurden anschließend mit rekombinant erzeugten GST-SUMO-Isoformen inkubiert und die gebundenen Proteine nach intensivem Waschen durch SDS-PAGE separiert. Hierbei zeigte sich eine vergleichbare Bindung von PIAS1<sup>WT</sup> an GST-SUMO1 und GST-SUMO2 (Abb. 9B). PIAS1<sup>V1459/60AA</sup> dagegen zeigte keine derartige Bindung, was in Einklang mit bisher publizierten Daten steht (Song et al., 2004) und für eine essentielle Rolle der hydrophoben Aminosäuren bei der nicht-kovalenten Bindung zu SUMO spricht.

## Ergebnisse



**Abb. 9: PIAS Proteine sind über ein SIM zur nicht-kovalenten Interaktion mit SUMO befähigt**

(A) Sequenzvergleich der hydrophob-sauren SIM Region von humanen Mitgliedern der PIAS Familie. (B) Bindungsstudie von an einer Matrix immobilisiertem GST-SUMO1 und GST-SUMO2 mit <sup>35</sup>S-markiertem PIAS1<sup>WT</sup> bzw. PIAS1<sup>V1459/60AA</sup>. (C) Hydrophobe Aminosäuren in PIAS1 und PIAS2 sind essentiell für eine kovalente Bindung an SUMO1 und SUMO2 in einem gerichteten Hefe *two-hybrid*-System. Konjugierbare (SUMO<sup>GG</sup>) und nicht-konjugierbare (SUMO<sup>GA</sup>) Varianten von SUMO1 und SUMO2 wurden auf die Interaktion zu Wildtyp PIAS1 oder PIAS2 und den entsprechend bezeichneten Mutanten untersucht. Das Wachstum der Hefen wurde auf Kontrollplatten ohne Leucin und Tryptophan (-LW) und auf Platten denen zusätzlich Histidin fehlt (-LWH) verfolgt. Das Wachstum auf -LWH ist ein Indikator für die Interaktionsintensität.

Neben *in vitro* Untersuchungen sollte zusätzlich versucht werden, *in vivo* Bindungsstudien zu etablieren. Hierzu wurde das gerichtete Hefe *two-hybrid*-Systems benutzt. Alle zu testenden PIAS Varianten wurden hierzu mit der Transaktivierungsdomäne von GAL4 fusioniert, während konjugierbare und nicht-konjugierbare SUMO-Isoformen als Fusionsproteine mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne exprimiert wurden. Die Eignung des Hefe *two-hybrid*-Systems zur Untersuchung von nicht-kovalenter Bindung zeigte sich in der erfolgreichen Interaktion von SUMO-Mutanten, deren C-terminales Di-Glycinmotiv in ein GA-

## Ergebnisse

Motiv mutiert wurde. Diese SUMO-Mutanten sind nicht mehr befähigt Substrate kovalent zu modifizieren und müssen folglich nicht-kovalent interagieren. Beide nicht-konjugierbaren SUMO-Isoformen zeigten sowohl mit PIAS1<sup>WT</sup> als auch mit PIAS2<sup>WT</sup> ein ähnliches Interaktionsverhalten wie nicht mutierte SUMO-Proteine, was eine nicht-kovalente Interaktion der Proteine beweist (Abb. 9C). Im Einklang mit den vorangegangenen *in vitro* Studien zeigten PIAS Proteine, deren hydrophober Sequenzbereich mutiert wurde (PIAS1<sup>VI459/60AA</sup> bzw. PIAS2<sup>VI469/70AA</sup>), keine Bindung zu SUMO.

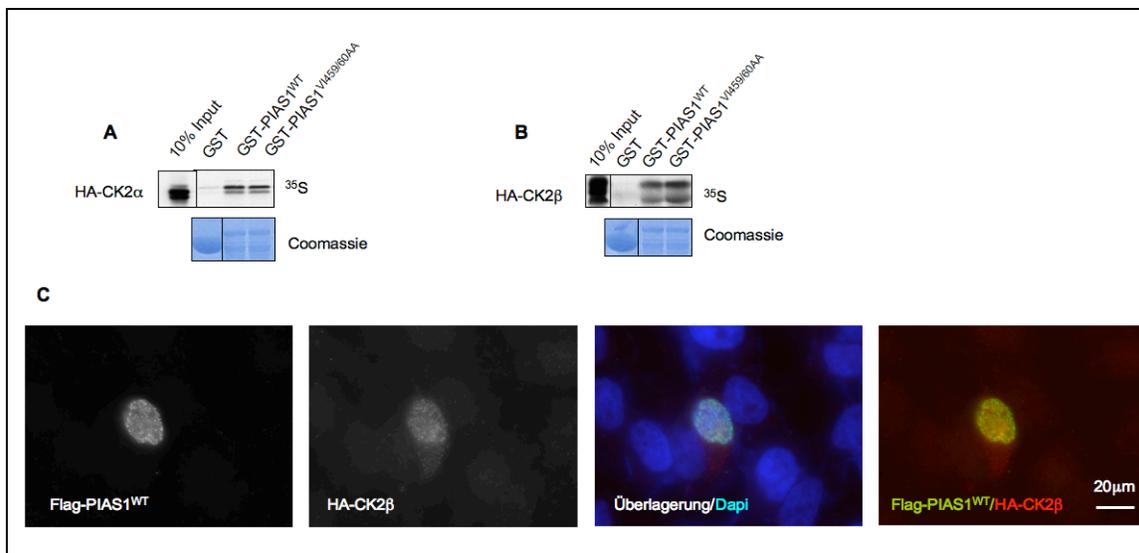
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für die nicht-kovalente Interaktion zwischen PIAS Proteinen und SUMO *in vitro* und *in vivo* der hydrophobe Bereich des SIMs essentiell ist.

### 3.2 PIAS1 wird durch CK2 in einem regulierbaren Prozess in unmittelbarer Nähe zum SIM phosphoryliert

Ein Sequenzvergleich des SIMs aus PIAS Proteinen zeigt C-terminal zu den hydrophoben Aminosäuren eine konservierte Sequenz von drei oder mehr Serinresten, denen saure Aminosäuren folgen (Abb. 9A). Interessanterweise stellen diese Serinreste eine potentielle Phosphorylierungsstelle für die Kinase CK2 dar, da CK2 bevorzugt Serine und Threonine in einer sauren Umgebung mit einer minimalen Konsensussequenz von [S/T]-x-x-[D/E] phosphoryliert. Daher sollte eine CK2-abhängige Phosphorylierung von PIAS Proteinen zunächst exemplarisch an PIAS1 getestet werden.

In einem ersten Bindungsexperiment konnte eine Interaktion zwischen gereinigtem, rekombinant exprimiertem GST-PIAS1 und den durch *in vitro* Transkription/Translation generierten Kinaseuntereinheiten CK2 $\alpha$  und CK2 $\beta$  nachgewiesen werden (Abb. 10A und B). Diese Interaktion ist unabhängig von der Integrität des SIMs, da eine GST-PIAS1<sup>VI459/60AA</sup> Mutante ebenfalls die CK2-Untereinheiten bindet.

## Ergebnisse



**Abb. 10: PIAS1 interagiert mit CK2 und beide Proteine sind im Kern lokalisiert**

(A)  $^{35}\text{S}$ -markiertes HA-CK2 $\alpha$  wurde in seiner Bindung zu an Glutathionsepharose-gekoppeltes GST-PIAS1<sup>WT</sup> bzw. GST-PIAS1<sup>V459/60AA</sup> überprüft. Die Coomassie Färbung veranschaulicht die Mengen der eingesetzten GST-Proteine. (B) Wie in (A) mit radioaktiv markiertem HA-CK2 $\beta$ . (C) HeLa Zellen wurden mit Flag-PIAS1<sup>WT</sup> und HA-CK2 $\beta$  transfiziert. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden anschließend mit DAPI gefärbt, um den Zellkern zu markieren. Flag-PIAS1<sup>WT</sup> wurde durch einen monoklonalen Maus anti-Flag Antikörper und durch an FITC-gekoppelten anti-Maus Antikörper detektiert. HA-CK2 $\beta$  wurde durch einen polyklonalen Kaninchen anti-Flag Antikörper und anti-Kaninchen Cy3-gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht. Maßstab: 20 $\mu\text{m}$ .

Ein Hinweis für eine *in vivo* Interaktion zweier Proteine ist eine zumindest partiell übereinstimmende Lokalisierung. Um ihre Lokalisierung zu überprüfen, wurden Flag-PIAS1 und HA-markiertes CK2 $\beta$  in der humanen Zervix-Adenokarzinomzelllinie HeLa ektopisch exprimiert und mit Immunofluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei lokalisiert Flag-PIAS1 in subnukleären Strukturen, während HA-CK2 $\beta$  eine leichte zytoplasmatische Lokalisierung zeigt, sich hauptsächlich aber ebenfalls in nukleären Foci befindet (Abb. 10C). Zum Teil sind die nukleären Foci beider Proteine überdeckend, was den Verdacht einer möglichen Interaktion zwischen PIAS1 und CK2 unterstreicht.

Zum direkten Beweis einer CK2-abhängigen PIAS1 Phosphorylierung wurden *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit in *E. coli* exprimiertem GST-PIAS1 und CK2 $\alpha/\beta$  in Anwesenheit von radioaktiv markiertem  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt. Abbildung 11A zeigt, dass in einem solchen Experiment sowohl

## Ergebnisse

GST-PIAS1<sup>WT</sup> als auch GST-PIAS1<sup>V1459/60AA</sup> ein ebenso effizientes CK2-Substrat darstellen wie das Kontrollprotein Casein. Wurde unter diesen Versuchsbedingungen in PIAS1 das an das SIM angrenzende Serin mutiert (GST-PIAS1<sup>S466A</sup>), konnte eine deutlich abgeschwächte Phosphorylierung beobachtet werden. Ein kompletter Verlust der Phosphorylierung ergab sich bei der Verwendung des GST-PIAS1<sup>S466-468A</sup> Proteins, in dem alle drei den hydrophoben Aminosäuren benachbarten Serine mutiert sind. Diese Versuche zeigen, dass diese drei Serinreste von CK2 phosphoryliert werden.

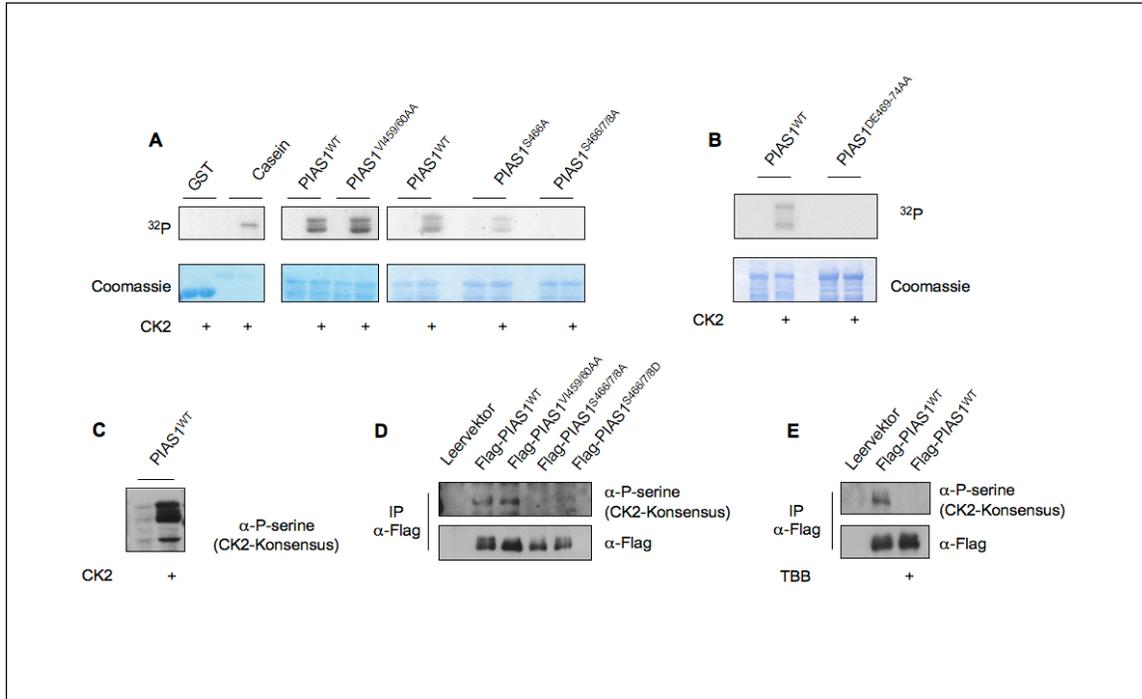
Die Bedeutung der sauren, den Serinen folgenden, Aminosäuren bei der CK2-abhängigen Phosphorylierung von PIAS1 konnte ebenfalls anhand von *in vitro* Experimenten gezeigt werden. GST-PIAS1<sup>DE469-474AA</sup>, eine Mutante bei der sechs Aspartat- bzw. Glutamatreste gegen Alanine ausgetauscht wurden, wird im Gegensatz zu GST-PIAS1<sup>WT</sup> nicht mehr phosphoryliert (Abb. 11B).

Im Weiteren sollte die CK2-abhängige Phosphorylierung von PIAS1 *in vivo* untersucht werden. Hierzu sollte ein anti-Phosphoserin Antikörper benutzt werden, der spezifisch phosphorylierte Serine im Kontext von CK2-Konsensussequenzen erkennt. Die Eignung dieses Antikörpers zur Detektion von phosphoryliertem PIAS1 wurde zuvor an *in vitro* phosphoryliertem PIAS1 demonstriert (Abb. 11C). Zur *in vivo* Analyse wurden HEK293T Zellen mit verschiedenen Flag-markierten PIAS1 Konstrukten transfiziert, mit einer anti-Flag Matrix immunpräzipitiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Analyse durch Immunoblotten mit einem anti-Flag Antikörper bzw. dem oben beschriebenen anti-Phosphoserin-spezifischen Antikörper. Die Immunoblot Analyse zeigte eine ausgeprägte Phosphorylierung für Flag-PIAS1<sup>WT</sup> und Flag-PIAS1<sup>V1459/60AA</sup>, während eine solche Phosphorylierung nach Austausch der Serinreste gegen Alanin oder Aspartat (Flag-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> bzw. Flag-PIAS1<sup>S466/7/8D</sup>) nicht detektierbar war (Abb. 11D). Dies unterstützt die *in vitro* Daten und zeigt eine signifikante *in vivo* Phosphorylierung der Serine 466-468.

Um die Beteiligung von CK2 an dieser Phosphorylierung zu prüfen, wurde der CK2-spezifische Inhibitor 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) verwendet. Die Analyse von Zellextrakten erfolgte wie oben beschrieben. Nach der

## Ergebnisse

Behandlung der Zellen mit TBB war ein kompletter Verlust der Phosphorylierung zu erkennen (Abb. 11E). Dies spricht auch *in vivo* für eine eindeutige CK2-Abhängigkeit bei der Phosphorylierung der PIAS1 Serine 466-468.



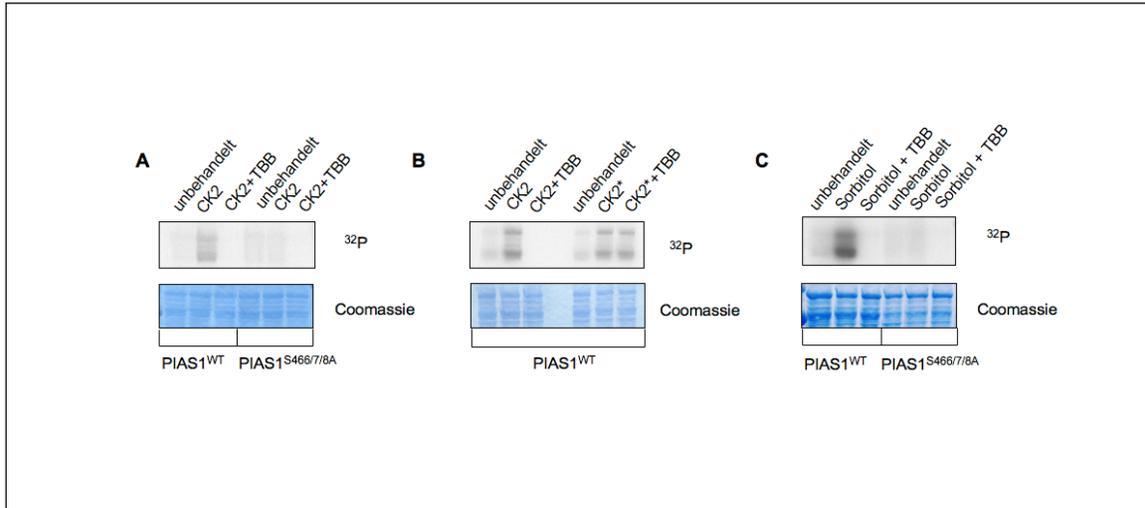
**Abb. 11: CK2 phosphoryliert PIAS1 *in vitro* und *in vivo***

(A) PIAS1 wird von CK2 an den Serinen 466, 467 und 468 phosphoryliert. Aus *E. coli* rekombinant aufgereinigte Proteine wurden mit rekombinantem CK2 in der Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. (B) Rekombinantes GST-PIAS1<sup>WT</sup> oder GST-PIAS1<sup>DE469-74AA</sup> wurden mit rekombinantem CK2 in Gegenwart von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert und aufgearbeitet wie in (A). (C) CK2-phosphoryliertes PIAS1 wird von einem anti-Phosphoserin-spezifischen Antikörper erkannt. Rekombinant exprimiertes GST-PIAS1 wurde in einer *in vitro* Kinase-Reaktion von CK2 in der Gegenwart von ATP phosphoryliert. Der Ansatz wurde mittels Immunoblot analysiert und durch einen Antikörper, der spezifisch phosphorylierte Serine im Kontext einer CK2-Konsensussequenz erkennt, detektiert (Maus Mab, 9F4, Calbiochem). (D) Flag-PIAS1<sup>WT</sup> und die entsprechenden Mutanten wurden in HEK293T Zellen exprimiert, an eine anti-Flag Matrix gebunden und mittels Immunoblot durch einen anti-Flag Antikörper und einen Antikörper, der spezifisch phosphorylierte Serine im Kontext von CK2-Konsensussequenzen erkennt, analysiert. (E) Wildtyp PIAS1 wurde in HEK293T Zellen exprimiert, die Zellen wurden entweder zur Kontrolle ausschließlich mit Lösungsmittel oder für 4h mit dem CK2-Inhibitor TBB (50 $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die Phosphorylierung von PIAS wurde wie in (C) beschrieben untersucht.

Auch in einem weiteren experimentellen System konnte eine CK2-abhängige PIAS1 Phosphorylierung gezeigt werden. Dazu wurde CK2 ektopisch in HEK293T Zellen exprimiert, die Zellen nach zwei Tagen lysiert und mit GST-PIAS1<sup>WT</sup> in Anwesenheit von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. In diesem System führt die

## Ergebnisse

ektopische Expression der beiden CK2-Untereinheiten zu einer starken Zunahme der GST-PIAS1<sup>WT</sup> Phosphorylierung (Abb. 12A). Bei einer Vorbehandlung der Zellen mit TBB sind keine Phosphorylierungssignale zu beobachten. Auch die GST-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> Mutante zeigte keine Phosphorylierung.



**Abb. 12: Die CK2-abhängige Phosphorylierung von PIAS1 ist ein regulierter Prozess**

**(A)** Rekombinantes Wildtyp GST-PIAS1 oder GST-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> wurden mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP in einem Kontroll-transfizierten oder mit CK2 $\alpha/\beta$ -transfizierten Extrakt aus HEK293T Zellen inkubiert. Zusätzlich wurden die CK2-exprimierenden Zellen entweder zur Kontrolle mit Lösungsmittel oder mit TBB behandelt. Die Proteine wurden über SDS-PAGE separiert und durch Coomassie Blau Färbung oder Autoradiographie detektiert. **(B)** Wie in (A), nur wurden die Zellen entweder mit Wildtyp CK2 $\alpha/\beta$  oder der Wildtyp- $\beta$ -Untereinheit und einer TBB-resistenten CK2 $\alpha$ <sup>V66A,I174A</sup> Mutante (CK2\*) transfiziert. **(C)** Rekombinantes GST-PIAS1<sup>WT</sup> oder GST-PIAS1<sup>DE469-74AA</sup> wurden mit rekombinantem CK2 in Gegenwart von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP inkubiert und aufgearbeitet wie in (A). **(D)** Wie in (A), nur wurden GST-PIAS1<sup>WT</sup> oder GST-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP in einem Kontroll-behandelten Zellextrakt oder einen Extrakt aus Zellen, die für 1h mit 400mM Sorbitol und gegebenenfalls zusätzlich auch mit TBB behandelt wurden, inkubiert.

Um Nebeneffekte des CK2-Inhibitors auf andere Kinasen auszuschließen, wurde zur Kontrolle ein Experiment mit einer TBB-resistenten Punktmutante von CK2 $\alpha$  (V66A, I174A) durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Konstrukt dieser Mutante transfiziert und wie oben beschrieben weiter analysiert. Im Gegensatz zu CK2<sup>WT</sup> zeigte die CK2-Mutante (CK2\*) keine Sensitivität gegenüber TBB (Abb. 12B), was die Beteiligung anderer Kinasen an der Phosphorylierung von PIAS1 weitgehend ausschließt.

## Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob eine Phosphorylierung von PIAS1 auch durch endogenes CK2 katalysiert werden kann, wurden HEK293T Zellen einer 0,5M Sorbitol-Konzentration ausgesetzt. Diese Behandlung erzeugt einen osmotischen Stress, der über die Aktivierung von MAP-Kinasen CK2 stimuliert. Die stressbehandelten Zellen wurden lysiert und mit GST-PIAS1<sup>WT</sup> und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP inkubiert. Wie in Abbildung 12C zu sehen ist, stimuliert eine Behandlung mit Sorbitol die PIAS1 Phosphorylierung stark. Die gleichzeitige Zugabe von TBB verhindert dies. Eine Kontrolle mit GST-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> zeigt wie zu erwarten keine Phosphorylierung.

Insgesamt zeigen diese Experimente, dass CK2 befähigt ist PIAS1 *in vitro* und *in vivo* an den an das SIM angrenzenden Serinen zu phosphorylieren. Weiter konnte durch Verwendung von Sorbitol gezeigt werden, dass es sich dabei um einen regulierten Prozess handelt, der von der CK2-Aktivität abhängt.

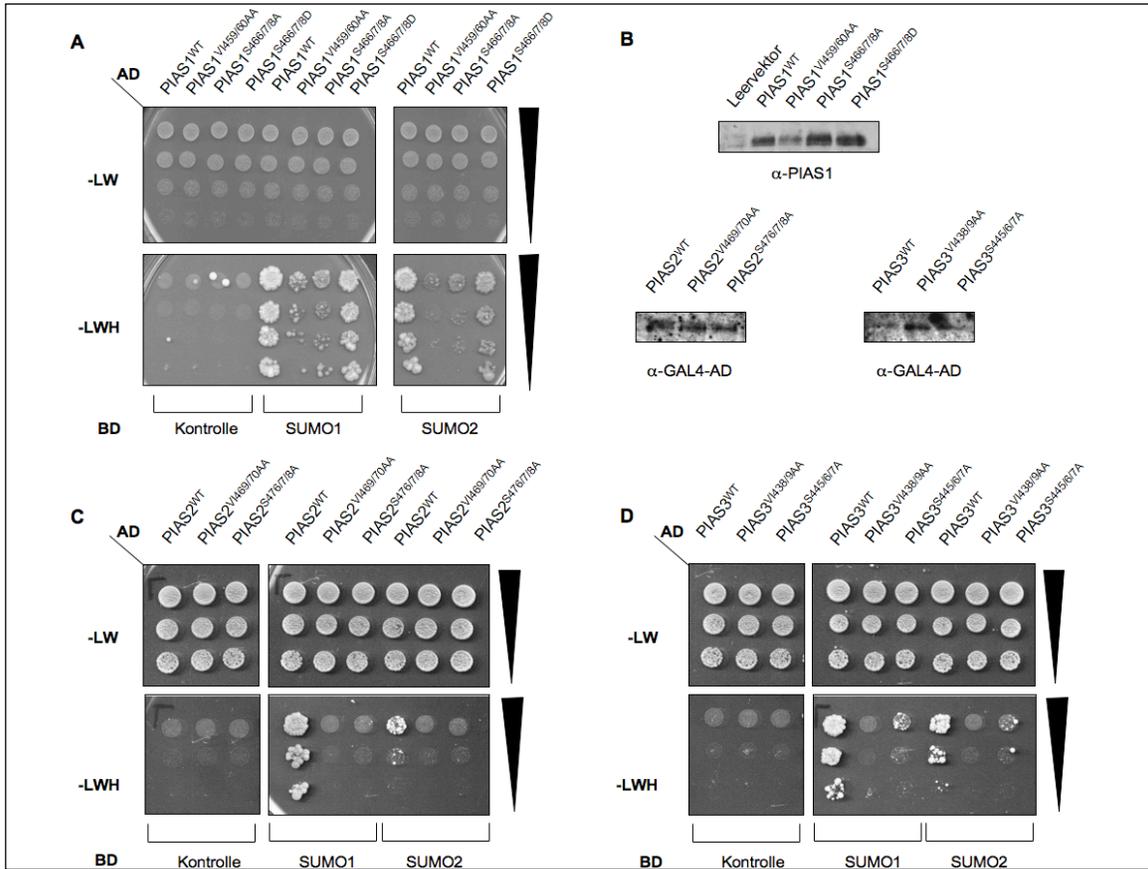
### 3.3 Zur nicht-kovalenten Interaktion mit SUMO wird eine Phosphorylierung von PIAS Proteinen benötigt

Da durch die vorhergehenden Experimente eine *in vivo* Phosphorylierung von PIAS1 durch CK2 bewiesen werden konnte, sollte durch weitere Untersuchungen der potentielle Einfluss der Phosphorylierung auf die SUMO/SIM-Interaktion überprüft werden.

Wie zuvor gezeigt wurde, sind PIAS1 und SUMO1 bzw. SUMO2 im Hefe *two-hybrid*-System in der Lage, nicht-kovalent zu interagieren (Abb. 9C). Wurde in diesem System eine nicht mehr phosphorylierbare PIAS1 Mutante (PIAS1<sup>S466/7/8A</sup>) verwendet, wies diese eine ebenso beeinträchtigte Bindung zu beiden SUMO-Isoformen auf wie eine im hydrophoben Bereich mutierte PIAS1 Mutante (PIAS1<sup>V1459/60AA</sup>) (Abb. 13A). Interessanterweise kann im Gegensatz dazu eine PIAS1 Form, in der die drei Serinreste gegen Aspartatreste ausgetauscht wurden (PIAS1<sup>S466/7/8D</sup>) ebenso stark mit SUMO interagieren wie PIAS1<sup>WT</sup>. Im Folgenden wird diese Mutante deshalb als Phosphorylierungsmimikry-Mutante bezeichnet. Das unterschiedliche

## Ergebnisse

Bindungsverhalten aller PIAS Formen beruht hierbei nicht auf unterschiedlichen Expressionsniveaus, da in einem Kontrollexperiment per Immunoblot vergleichbare Niveaus der verschiedenen PIAS1 Varianten detektiert wurden (Abb. 13B).



**Abb. 13: Die nicht-kovalente Interaktion mit SUMO erfordert eine Phosphorylierung von PIAS Proteinen**

(A) PIAS1<sup>WT</sup> und die genannten Mutanten wurden auf eine Interaktion mit SUMO1 und SUMO2 im gerichteten Hefe *two-hybrid*-System untersucht. Alle Proben wurden sukzessive 1:5 verdünnt. Parallel wurden die Proben für eine Proteinbestimmung mittels Immunoblot aufgearbeitet. (B) Die Expressionsmengen der in (A),(C) und (D) verwendeten PIAS Proteine wurden durch eine Immunoblot Analyse mit anti-PIAS1 Antikörper oder anti-GAL4-AD Antikörper untersucht. (C) PIAS2 und PIAS3 binden SUMO-Proteine über ihr phosphoSIM. Wildtyp PIAS2 $\beta$  und die entsprechenden Mutanten wurden auf eine Interaktion zu SUMO1 und SUMO2 im Hefe *two-hybrid*-System überprüft. Alle Proben wurden sukzessive 1:5 verdünnt. (D) Wie in (A), nur wurden PIAS2 und die entsprechenden Mutanten durch PIAS3 und die angegebenen Mutanten substituiert.

Auch für zwei weitere Mitglieder der PIAS Proteinfamilie, PIAS2 und PIAS3, konnte eine phosphorylierungsabhängige SUMO-Bindung gezeigt

## Ergebnisse

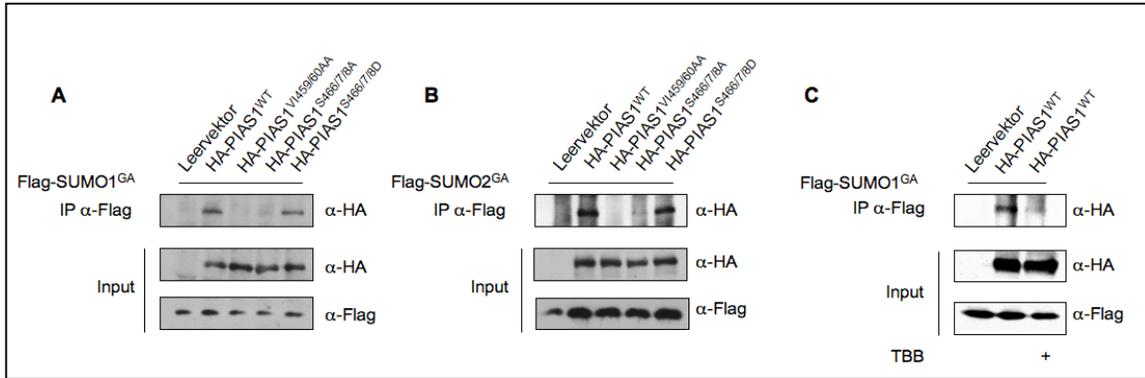
werden. Dazu wurden der Wildtyp (PIAS2<sup>WT</sup> bzw. PIAS3<sup>WT</sup>), eine in den hydrophoben Aminosäuren veränderte Mutante (PIAS2<sup>V1469/70AA</sup> bzw. PIAS3<sup>V1438/9AA</sup>) und eine in den angrenzenden Serinen veränderte Mutante (PIAS2<sup>S476/7/8A</sup> bzw. PIAS3<sup>S445/6/7A</sup>) von PIAS2 und PIAS3 im Hefe *two-hybrid*-System auf eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO1 bzw. SUMO2 überprüft. Beide PIAS Proteine zeigten ein ähnliches Verhalten wie PIAS1, wobei der jeweilige Wildtyp beide SUMO-Isoformen bindet, während sowohl der Austausch zentraler hydrophober Aminosäuren als auch der Austausch der Serinreste zum Verlust der Interaktion mit SUMO führt (Abb. 13C und D). Auch hier konnten vergleichbare Expressionsmengen der verschiedenen PIAS Varianten per Immunoblot dokumentiert werden (Abb. 13B).

Um einen Einfluss der PIAS1 Phosphorylierung auf die nicht-kovalente Bindung an SUMO in Säugetierzellen zu testen, wurden nicht-konjugierbares Flag-SUMO1<sup>GA</sup> und Flag-SUMO2<sup>GA</sup> mit HA-PIAS1<sup>WT</sup>, HA-PIAS1<sup>V1459/60AA</sup>, HA-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> und HA-PIAS1<sup>S466/7/8D</sup> in HEK293T Zellen koexprimiert, mit anti-Flag Agarose immunopräzipitiert und nachfolgend mit einem Immunoblot mit anti-Flag Antikörper bzw. anti-HA Antikörper analysiert. In Übereinstimmung mit den aus dem Hefe *two-hybrid* gewonnenen Daten zeigten sowohl HA-PIAS1<sup>WT</sup> als auch die Mimikry-Mutante (HA-PIAS1<sup>S466/7/8D</sup>) eine nicht-kovalente Bindung an Flag-SUMO1<sup>GA</sup> und Flag-SUMO2<sup>GA</sup> (Abb. 14A und B). Die im hydrophoben Sequenzbereich veränderte Mutante (HA-PIAS1<sup>V1459/60AA</sup>) war zu keiner Kopräzipitation mit einer der beiden SUMO-Isoformen befähigt. Wichtiger, auch mit einer nicht-phosphorylierbaren PIAS1 Mutante (HA-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup>) konnte ein starker Bindungsverlust sowohl an SUMO1 als auch an SUMO2 beobachtet werden. Diese Versuche beweisen somit, dass die Phosphorylierung der Serinreste 466-468 für die Bindung zwischen PIAS1 und SUMO notwendig ist.

Im Einklang mit diesen Ergebnis steht ein Experiment, bei dem der Einfluss des CK2-Inhibitors TBB auf die Interaktion zwischen PIAS1 und SUMO in HEK293T Zellen untersucht wurde. So führte die Behandlung mit TBB zu einer fast vollständigen Unterdrückung der Koimmunopräzipitation von HA-PIAS1<sup>WT</sup> mit Flag-SUMO1<sup>GA</sup> (Abb. 14C). Insgesamt erweist sich die Phosphorylierung

## Ergebnisse

durch CK2 damit als wichtiger Regulator für die PIAS1/SUMO-Interaktion und es lässt sich anhand dieser Daten ein erweitertes phosphoSIM-Modul für PIAS1 definieren.

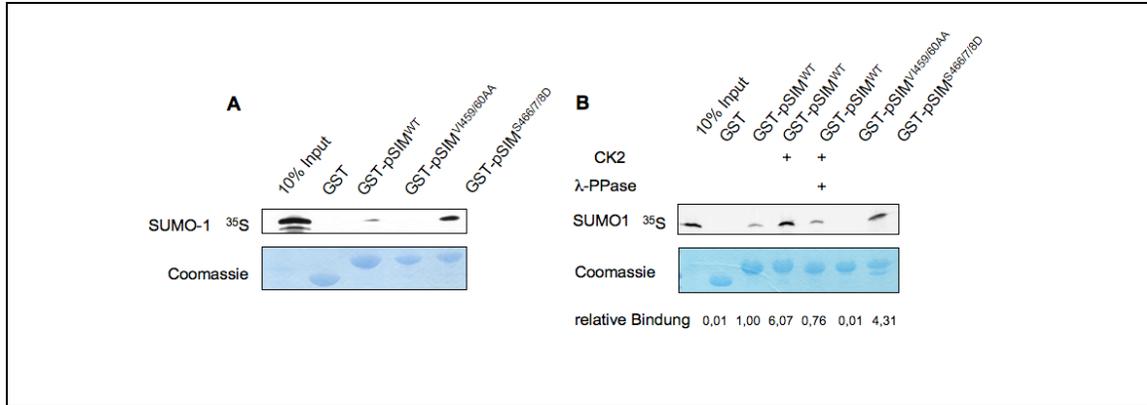


**Abb. 14: Die nicht-kovalente Interaktion mit SUMO erfordert eine Phosphorylierung von PIAS1**

(A/B) Nicht-konjugierbare Flag-SUMO1 oder Flag-SUMO2 Mutanten wurden mit HA-Epitop markiertem PIAS1 Wildtyp oder den genannten Mutanten koexprimiert, an einer anti-Flag Matrix immunopräzipitiert und mit anti-HA oder anti-Flag Antikörper analysiert. (C) Wie in (A), nur wurden die Zellen entweder mit dem CK2-Inhibitor TBB oder einer Kontrolle behandelt.

Um die direkte Konsequenz der Phosphorylierung des phosphoSIM-Moduls auf die Interaktion zu SUMO zu testen, wurde ein *in vitro* Bindungsversuch mit einem rekombinanten GST-phosphoSIM-Modul, das die Sequenz der Reste 444 bis 493 aus PIAS1 umfasst durchgeführt. Die Wildtyp-Form dieses Peptides sowie verschiedene mutierte Formen wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, an GST-Sepharose gebunden und als Affinitätsmatrix für die Bindung von *in vitro* transkribiertem/translatiertem und radioaktiv markiertem SUMO1 benutzt. Sowohl eine GST-Kontrolle als auch die im hydrophoben Sequenzabschnitt veränderte Mutante (GST-pSIM<sup>V1459/60AA</sup>) binden nicht an SUMO1 (Abb. 15A). Eine schwache Bindung an SUMO1 zeigte GST-pSIM<sup>WT</sup>. Bemerkenswerterweise konnte jedoch für die Phosphomimikry-Variante (GST-pSIM<sup>S466/7/8D</sup>) eine, gegenüber dem Wildtyp, deutlich verstärkte Bindung an SUMO1 gezeigt werden. Somit scheinen negative Ladungen an Position 466-468, wie im Fall der Phosphomimikry-Mutante, die direkte Bindung an SUMO zu unterstützen. Für phosphorylierte Serine wäre eine vergleichbare Unterstützung vorstellbar.

## Ergebnisse



**Abb. 15: Die direkte Interaktion eines SIM-Peptides und SUMO1 wird durch eine Phosphorylierung verstärkt**

(A) GST oder die entsprechenden GST-phosphoSIM-Varianten wurden auf einer Glutathionsepharose-Matrix immobilisiert und mit <sup>35</sup>S markiertem *in vitro* transkribiertem/translatiertem SUMO1 inkubiert. Nach intensivem Waschen, wurden die gebundenen Proteine durch SDS-PAGE separiert und durch Coomassie Blau Färbung und Autoradiographie visualisiert. (B) Wie in (A), nur wurden die immobilisierten GST-phosphoSIM<sup>WT</sup>-Peptide wie angegeben mit CK2 und λ-Phosphatase vorbehandelt.

Um diese Frage zu klären, sollten die Bindungseigenschaften von phosphorylierten GST-pSIM-Peptiden untersucht werden. Wurde GST-pSIM<sup>WT</sup> durch CK2 präphosphoryliert, zeigte sich eine ebenso intensive Bindung an SUMO1 wie es bei der Phosphomimikry-Mutante der Fall war (6,07-fach bzw. 4,31-fach stärkere Bindung verglichen mit unbehandeltem GST-pSIM<sup>WT</sup>) (Abb. 15B). Darüber hinaus konnte dieser Effekt durch eine Präinkubation mit CK2 und zusätzlich λ-Phosphatase, die universell Phosphorylierungen hydrolisiert, verhindert werden (0,76-fache Bindung verglichen mit unbehandeltem GST-pSIM<sup>WT</sup>).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein phosphoSIM-Modul in einer phosphorylierungsabhängigen Weise an freies SUMO bindet. Dabei kann CK2 den Bindungsprozess regulieren.

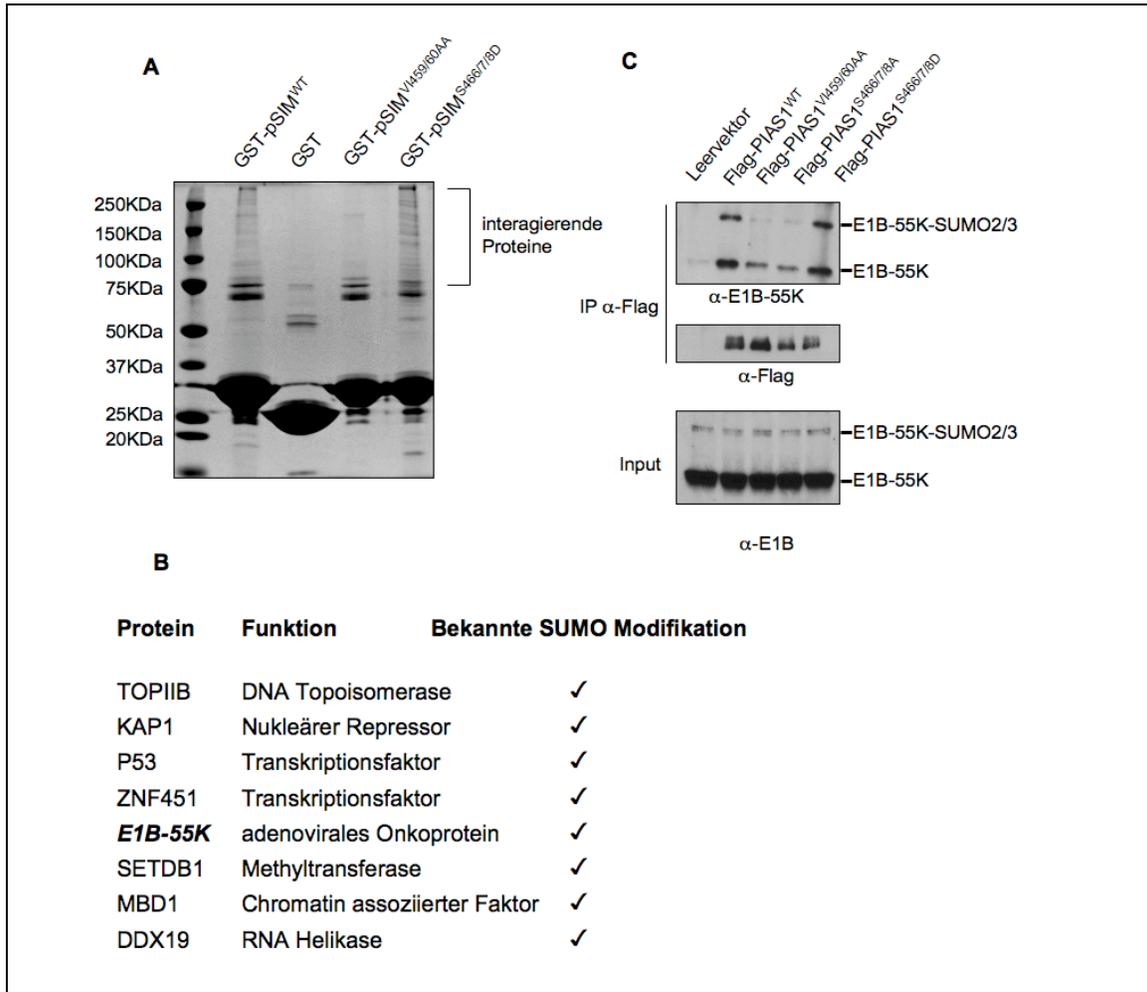
## Ergebnisse

### 3.4 Identifizierung von phosphoSIM-abhängigen PIAS Bindungspartnern

Im vorhergehenden Kapitel konnte eine phosphorylierungsabhängige Bindung von phosphoSIM-Modulen an freies SUMO gezeigt werden. Eine daraus resultierende Frage ist, ob SUMO-Konjugate ein vergleichbares Verhalten zeigen. Um diese Frage zu beantworten, sollten zunächst putative Bindungspartner identifiziert werden, deren Bindung von der Integrität des phosphoSIM-Moduls abhängt. Dafür wurden die oben bereits erwähnten, an GST-Sepharose gebundenen, GST-pSIM-Proteine als Affinitätsmatrix benutzt. Die Matrix-gebundenen GST-Fusionsproteine wurden mit einem Extrakt aus HEK293T Zellen inkubiert, intensiv gewaschen, zusammen mit gebundenen Interaktoren in Laemmli-Puffer aufgenommen und nachfolgend per SDS-PAGE aufgetrennt. Um eine SUMO-Dekonjugation von Substraten während des laufenden Versuches zu verhindern, wurde dem Zellextrakt N-Ethylmaleimid (NEM) zugesetzt. Eine derartige Behandlung führt zu einer unspezifischen Alkylierung von Cysteinresten, was eine gleichzeitige Inaktivierung der Cystein-SUMO-Proteasen bedeutet und so für eine Stabilisierung der Sumoylierung sorgt. Abbildung 16A zeigt ein Coomassie gefärbtes Gradientengel der verschiedenen Proben. Im Größenbereich zwischen 25-30KDa erscheinen die jeweils eingesetzten GST-Fusionsproteine. Die Menge der eingesetzten Proteine war hierbei in allen Proben vergleichbar. Eine Bindung von Interaktoren ist für die Peptide GST-pSIM<sup>WT</sup> und GST-pSIM<sup>S466/7/8D</sup> zu erkennen, wobei die Phosphomimikry-Mutation eine leicht verstärkte Interaktion zu vermitteln scheint. Die spezifischen Bindungspartner erscheinen ab einem Molekulargewicht von ca. 75KDa. Derartige Banden sind in einer GST-Kontrolle und dem GST-pSIM<sup>VI459/60AA</sup> Peptid nicht vorhanden. Gelstücke aus allen Proben wurden ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau mittels Massenspektrometrie analysiert. Eine Liste aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang (Kapitel 7.1.). Diese Liste ist durch den Abzug von unspezifisch gebundenen Proteinen korrigiert. Anzumerken ist, dass viele der Proteine im SDS-PAGE Gel ein Laufverhalten zeigten, das zum Teil erheblich über ihrem zu erwartenden

## Ergebnisse

theoretischen Molekulargewicht lag. Dies legt eine Modifikation, höchstwahrscheinlich durch SUMO, nahe. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnten in den jeweiligen Gelstücken massenspektrometrisch Peptide sowohl aus SUMO1 wie auch aus SUMO2 identifiziert werden.



### Abb. 16: Detektion und Verifikation von SIM-abhängigen PIAS Interaktoren

(A) GST und die verschiedenen GST-phosphoSIM-Varianten wurden zusammen mit NEM behandelten HEK293T Zellextrakten inkubiert und nach intensivem Waschen wurden die gebundenen Proteine über SDS-PAGE separiert und durch Coomassie Blau Färbung visualisiert. Anschließend wurden mittels Massenspektrometrie putative Bindungspartner identifiziert. (B) Eine Liste der interessantesten Bindungspartner aus (A). Eine vollständige, um unspezifisch interagierende Partner korrigierte, Liste befindet sich im Anhang. (C) Flag-PIAS1<sup>WT</sup> und die angegebenen Mutanten wurden in HEK293T Zellen exprimiert, an eine anti-Flag Matrix gebunden und durch Immunoblot mit anti-E1B-55K Antikörper analysiert.

Eine verkürzte Liste zeigt eine Auswahl der Interaktoren (Abb. 16B). Alle hier aufgelisteten Proteine sind bekannte SUMO-Substrate. Neben der in der

## Ergebnisse

Rekombination wirkenden Topoisomerase-II $\beta$  finden sich hauptsächlich an der Transkriptionskontrolle beteiligte Proteine (z.B. KAP1, SETB1, MBD1) in dieser Liste. Unter ihnen ist mit E1B-55K auch ein adenovirales Onkoprotein, welches das Transaktivierungspotential von p53 inaktiviert und so zusammen mit E1A für die Transformation von HEK293 Zellen verantwortlich ist.

Da E1B-55K ein bekanntes Zielprotein für die SUMO-Modifikation darstellt (Endter et al., 2001), sollte exemplarisch eine mögliche SUMO-abhängige Bindung von E1B-55K an das phosphoSIM-Modul von PIAS1 untersucht werden. Dazu wurden HEK293T Zellen mit Flag-PIAS1<sup>WT</sup>, Flag-PIAS1<sup>V1459/60AA</sup>, Flag-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> und Flag-PIAS1<sup>S466/7/8D</sup> transfiziert. Die verschiedenen Flag-PIAS1 Varianten wurden mittels einer anti-Flag Matrix immunpräzipitiert und gebundenes E1B-55K im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper detektiert.

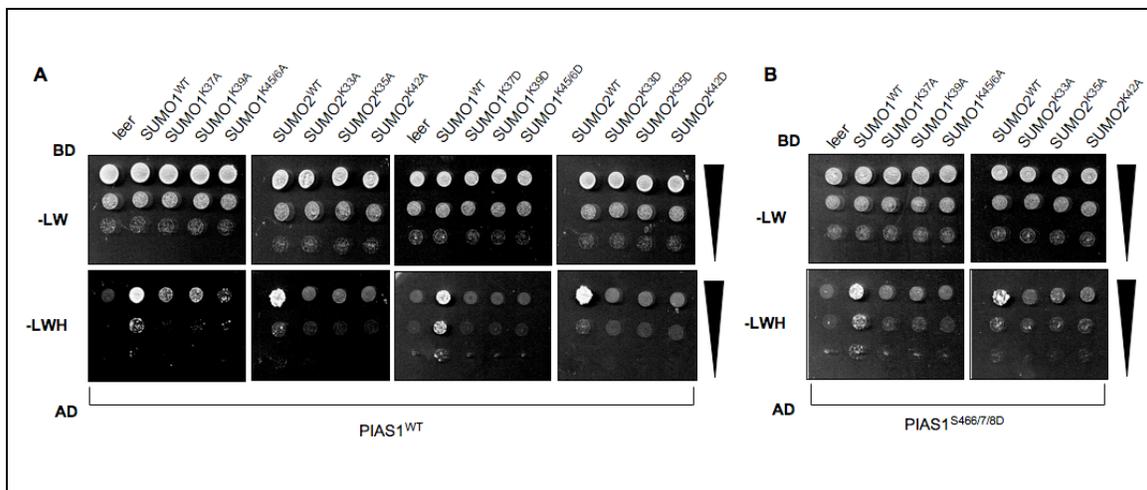
Wurde der Input für diese Versuche analysiert, zeigten sich zwei anti-E1B-55K reaktive Banden auf einer Höhe von 55KDa bzw. 70KDa, die einem unmodifizierten und einem SUMO2/3-konjugierten E1B-55K entsprechen (Abb. 16C) (Muller und Dobner, 2008). Immunpräzipitate von Flag-PIAS1<sup>WT</sup> und Flag-PIAS1<sup>S466/7/8D</sup> weisen im Vergleich zum Input stark angereicherte E1B-55K-SUMO2/3-Konjugate auf. Dies spricht für eine bevorzugte Interaktion dieser PIAS1 Varianten mit E1B-55K-SUMO2/3. Im Gegensatz dazu ist eine E1B-55K-SUMO2/3-Bindung zu Flag-PIAS1<sup>V1459/60AA</sup> und zu Flag-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> stark reduziert.

Dies zeigt, dass die Integrität der Phosphorylierungsstellen im phosphoSIM-Modul nicht nur für Bindung an freies SUMO, sondern auch die Interaktion mit SUMO-Konjugaten erforderlich ist. Weiter konnte eine große Anzahl putativer phosphoSIM-Interaktoren gefunden werden, wobei hier viele in der Transkription beteiligte Proteine identifiziert wurden.

## Ergebnisse

### 3.5 Spezielle Lysine in SUMO dienen als Rezeptoren für negative Ladungen in der SUMO/phosphoSIM-Interaktion

In diversen Publikationen konnte eine Beteiligung spezifischer Lysinreste von SUMO an der SIM-vermittelten Interaktion zu unterschiedlichen Bindungspartnern beschrieben werden (Hecker et al., 2006; Sekiyama et al., 2008). Gleichzeitig scheinen diese Lysine in die transkriptionelle Regulatorfunktion von SUMO involviert zu sein. Interessanterweise befinden sich diese Lysinreste in örtlicher Nähe zur  $\alpha_1$ -Helix und zum  $\beta_2$ -Faltblatt, die die Bindung zum SIM vermitteln (Song et al., 2005). Diese Argumente unterstützen die Hypothese, dass neben einer hydrophoben Wechselwirkung in der SUMO/SIM-Interaktion zusätzlich auch eine elektrostatische Wechselwirkung benötigt wird.



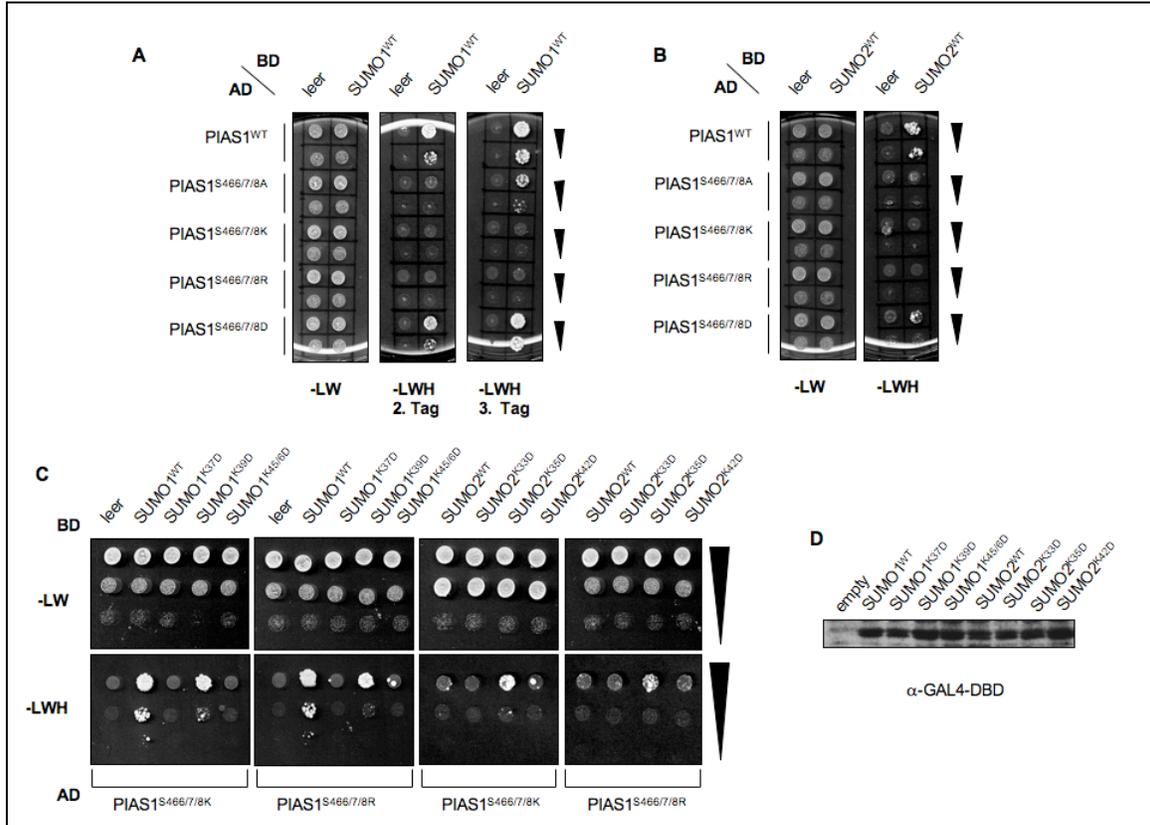
**Abb. 17: Vier respektive drei Lysine in SUMO1 bzw. SUMO2 sind für die nicht-kovalente Bindung an das SIM-Modul essentiell**

(A) Wildtyp PIAS1 wurde auf die Interaktion mit SUMO1<sup>WT</sup> und SUMO2<sup>WT</sup> und den genannten Mutanten in einem gerichteten Hefe *two-hybrid*-System untersucht. Alle Proben wurden sukzessive 1:5 verdünnt. (B) Die Phosphomimikry-Mutante PIAS1<sup>S466/7/8D</sup> wurde auf die Interaktion mit SUMO1 und SUMO2 Wildtyp und den entsprechenden Mutanten wie in (A) untersucht.

Um dies zu überprüfen, wurden in SUMO1 die Lysine 37, 39 und 45/6 und in SUMO2 die Lysine 33, 35 und 42 zu Alanin oder Aspartat mutiert und die Proteine nachfolgend im Hefe *two-hybrid*-System auf ihre Bindungsaffinität zu

## Ergebnisse

PIAS1 untersucht. Hierbei zeigten alle Mutanten eine geschwächte Interaktion mit PIAS1<sup>WT</sup> und PIAS1<sup>S466/7/8D</sup> (Abb. 17A und B). Diese Daten dokumentieren, dass alle der genannten Lysine an der nicht-kovalenten Interaktion zwischen SUMO und SIM beteiligt sind.



**Abb. 18: Eine Ladungsumkehr zwischen SUMO und SIM zeigt eine besondere Rolle für das Lysin 39 respektive 35 in SUMO1 bzw. SUMO2 bei der Detektion der Phosphorylierung (A/B)** PIAS1<sup>S466/7/8K</sup> und PIAS1<sup>S466/7/8R</sup> binden stark geschwächt an SUMO1 und SUMO2 im gerichteten Hefe *two-hybrid*-System. Alle Proben wurden sukzessive 1:5 verdünnt. **(C)** PIAS1<sup>S466/7/8K</sup> und PIAS1<sup>S466/7/8R</sup> wurden auf eine Interaktion zu SUMO1 und SUMO2-Wildtyp und den genannten Mutanten im Hefe *two-hybrid*-System analysiert. **(D)** Gleiche Extraktmengen der verschiedenen SUMO-Varianten wurden über einen Western-Blot mit einem Antikörper gegen GAL4-DBD verifiziert.

Um direkt zu bestimmen, ob tatsächlich einer der positiv geladenen Lysinreste eine ionische Interaktion zu den negativ geladenen, phosphorylierten Serinen des phosphoSIMs vermittelt, wurden die jeweiligen Ladungen zwischen SUMO und PIAS1 umgekehrt. Die zugrunde liegende Idee war, dass artifizielle basische Reste in Form von Lysin oder Arginin an der Position 466-468 in PIAS1

## Ergebnisse

mit einem der neu eingeführten sauren Reste an der Position 37, 39 und 45/6 in SUMO1 bzw. an der Position 33, 35 und 42 in SUMO2, die natürliche Situation mit umgekehrten Ladungsverhältnissen imitieren. Zu diesem Zweck wurde die Interaktion von SUMO1<sup>K37D</sup>, SUMO1<sup>K39D</sup> und SUMO1<sup>K45/6D</sup> bzw. SUMO2<sup>K33D</sup>, SUMO2<sup>K35D</sup> und SUMO2<sup>K42D</sup> mit PIAS1<sup>S466/7/8K</sup> oder PIAS1<sup>S466/7/8R</sup> im Hefe *two-hybrid*-System untersucht. Zuvor konnte für beide PIAS1 Mutanten eine stark abgeschwächte Bindung an SUMO1<sup>WT</sup> und SUMO2<sup>WT</sup> demonstriert werden (Abb. 18A und B).

Interessanterweise war es möglich, durch eine Mutation von Lysin 39 in SUMO1 bzw. eine Mutation von Lysin 35 in SUMO2 jeweils zu einem Aspartat eine Interaktion sowohl mit PIAS1<sup>S466/7/8K</sup> als auch mit PIAS1<sup>S466/7/8R</sup> zu rekonstituieren (Abb. 18C). Da sich in diesem Experiment die Expressionslevel der verschiedenen Mutanten von SUMO1/2 bzw. PIAS1 nicht unterscheiden (Abb. 18D), legen diese Daten nahe, dass in einem natürlichen Kontext das Lysin 39 in SUMO1 bzw. das Lysin 35 in SUMO2 in direktem Kontakt zu den phosphorylierten Serinen 466-468 in PIAS1 steht.

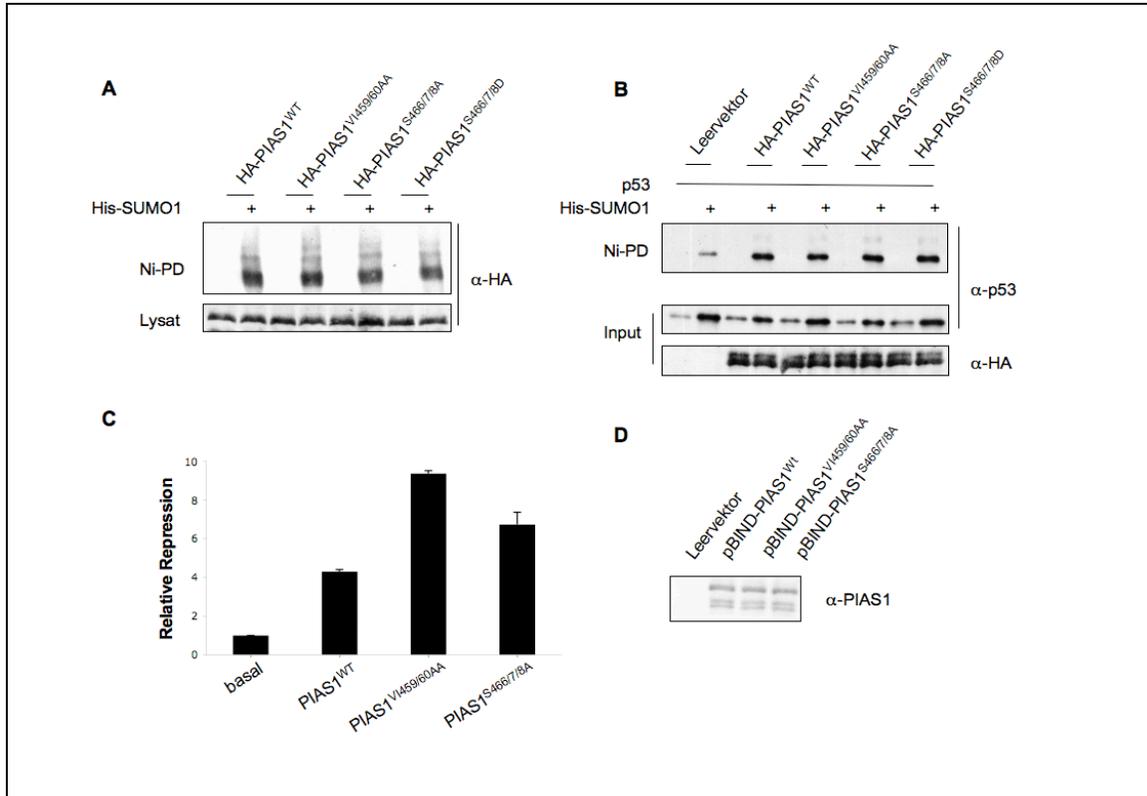
### 3.6 PhosphoSIM-Module regulieren die transkriptionelle Koregulator-Funktion von PIAS Proteinen

Im Weiteren sollte untersucht werden, welchen funktionellen Einfluss die phosphorylierungsabhängige SUMO-Interaktion auf PIAS1 hat.

Für einige SUMO-Substrate, die ein SUMO-Interaktions-Motiv besitzen, wurde beschrieben, dass eine Sumoylierung die Integrität des SIMs benötigt (Lin et al., 2006; Meulmeester et al., 2008). Da auch PIAS1 ein SUMO-Substrat ist, sollte untersucht werden, ob eine Kopplung zwischen der SIM-Integrität und der Sumoylierung von PIAS1 besteht. Dazu wurden HA-PIAS1<sup>WT</sup>, HA-PIAS1<sup>VI459/60AA</sup>, HA-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup> und HA-PIAS1<sup>S466/7/8D</sup> jeweils mit His-SUMO1 in HEK293T Zellen koexprimiert. Mittels einer Nickel-NTA Matrix wurden alle His-SUMO1 konjugierten Proteine gebunden und angereichert. Mit einem anti-HA Antikörper konnten anschließend spezifisch die sumoylierten HA-PIAS1 Proteine detektiert

## Ergebnisse

werden. Das Ergebnis veranschaulicht, dass sich der Sumoylierungsgrad keiner SIM-Mutante verändert (Abb.19A) und damit keine funktionelle Kopplung zwischen phosphoSIM und der Autosumoylierung von PIAS1 existiert.



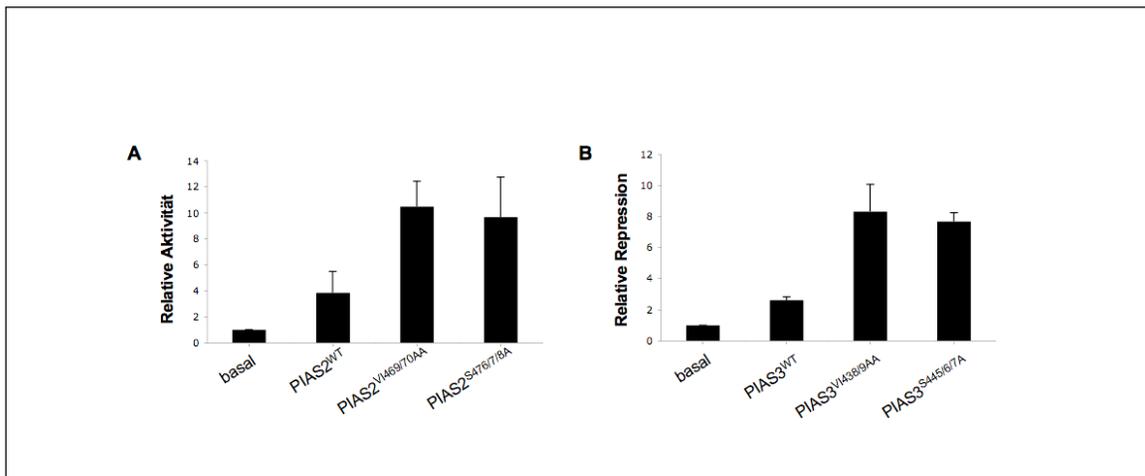
### Abb. 19: Funktionelle Bedeutung des phosphoSIMs in PIAS1

(A) Die SUMO-Modifikation von PIAS1 ist phosphoSIM unabhängig. His-SUMO1 wurde mit HA-Epitop markierten Versionen von PIAS1<sup>WT</sup> und den angegebenen Mutanten in HeLa Zellen koexprimiert. His-SUMO1-Konjugate wurden an eine Ni-NTA Matrix gebunden und über Western Blot mit anti-HA Antikörper visualisiert. Die Expression der betreffenden Proteine wurde durch Immunoblot der Zelllysate analysiert. (B) HA-PIAS1<sup>WT</sup> und die entsprechenden Mutanten wurden zusammen mit p53 und einer Leervektor-Kontrolle oder His-Epitop markiertem SUMO1 in HeLa Zellen exprimiert. His-SUMO1-Konjugate wurden an eine Ni-NTA Matrix gebunden und durch Immunoblot mittels anti-p53 Antikörper untersucht. Die Expression der betreffenden Proteine wurde durch Immunoblot der Zelllysate analysiert. (C) C33a Zellen wurden transient mit dem GAL4/TK-Luciferase-Reporter-Plasmid zusammen mit Plasmiden, die für GAL4-PIAS1 Fusionsproteine kodieren, transfiziert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die Standardabweichung errechnete sich nach der Normalisierung durch die interne Renilla-Luciferase-Kontrolle. Die basale Reporteraktivität wurde gleich eins gesetzt. (D) Expression von GAL4-PIAS1 Wildtyp und den entsprechenden Mutanten wurden in C33a Zellen durch Immunoblot-Analyse mit einem anti-PIAS1 Antikörper untersucht.

Anschließend sollte ein möglicher Einfluss des phosphoSIM-Moduls auf die SUMO-Ligase-Aktivität von PIAS1 untersucht werden. Für dieses Experiment

## Ergebnisse

wurde als Zielsubstrat p53 gewählt, da es als PIAS1-Substrat bekannt ist (Kahyo et al., 2001; Kahyo T, 2001; Schmidt und Muller, 2002). Hierzu wurden die verschiedenen HA-PIAS1 Konstrukte mit p53 und einem His-SUMO1 Konstrukt in HeLa Zellen kotransfiziert und eine anschließende Aufreinigung und Anreicherung von His-SUMO1-Konjugaten erfolgte wie oben beschrieben. Im Vergleich von Leervektor und den verschiedenen HA-PIAS1 exprimierenden Proben war eine Ligase-Aktivität der PIAS Proteine zu erkennen (Abb. 19B), was sich in einer ca. 2-3-fach verstärkten p53 Sumoylierung darstellte. Die verschiedenen PIAS1 Varianten zeigten hierbei keine Unterschiede, so dass die katalytische Wirkung von PIAS1 auf die Sumoylierung von p53 nicht von der Integrität der phosphorylierungsabhängigen SUMO-Bindung beeinflusst wird.



**Abb. 20: Die Integrität des phosphoSIMS beeinflusst die transkriptionelle Funktion von PIAS2 und PIAS3**

**(A)** HeLa Zellen wurden transient mit dem GAL4/SV40-Luciferase-Reporter-Plasmid zusammen mit Plasmiden, die für GAL4-PIAS2 $\beta$  Fusionsproteine kodieren, transfiziert. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden. Die Standardabweichung errechnete sich nach der Normalisierung durch die interne Renilla-Luciferase-Kontrolle. Die basale Reporteraktivität wurde gleich eins gesetzt. **(B)** Wie in (A), nur wurden HeLa Zellen mit dem GAL4/SV40-Luciferase-Reporter-Plasmid zusammen mit Plasmiden, die für GAL4-PIAS3 Fusionsproteine kodieren, transfiziert.

Neben der Funktion als Ligase fungiert PIAS1 auch als ein transkriptioneller Koregulator, wobei beide Funktionen nicht zwangsläufig gekoppelt sein müssen. Verschiedene PIAS Proteine sind an verschiedenen Promotoren in der Lage, die transkriptionelle Aktivität zu reprimieren oder zu

## Ergebnisse

stimulieren. Dies kann durch eine Fusion der PIAS Proteine mit der GAL4-DNA-Bindedomäne und einem Luciferase-Reporter-Konstrukt mit einer GAL4-Bindesequenz sowie einem minimalen viralen Promotor gezeigt werden. So reprimiert GAL4-PIAS1<sup>WT</sup> einen GAL4-TK-Reporter in C33a Zellen etwa vierfach (Abb.19C). Eine in den hydrophoben Aminosäuren veränderte Mutante (GAL4-PIAS1<sup>V1459/60AA</sup>) weist eine zweifach stärkere Repression auf. Bemerkenswert ist, dass eine nicht mehr phosphorylierbare Mutante (GAL4-PIAS1<sup>S466/7/8A</sup>) vergleichbare Ergebnisse liefert. Dies deutet darauf hin, dass eine Phosphorylierung des SUMO-Interaktions-Motivs bei diesem Prozess von Bedeutung ist. Eine Analyse mittels Immunoblot zeigt übereinstimmende Proteinmengen aller PIAS Proteine (Abb. 19D).

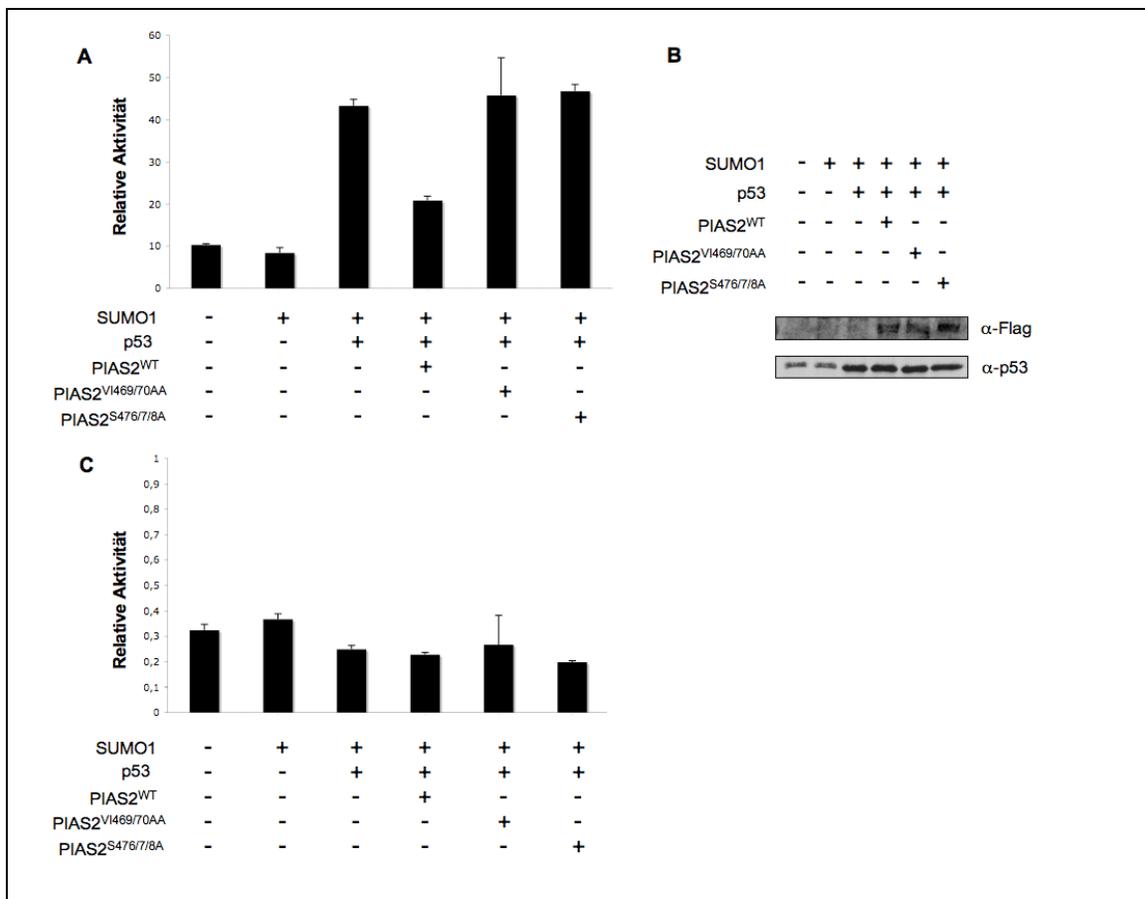
Auch andere Mitglieder der PIAS Proteinfamilie besitzen eine transkriptionelle Regulatorfunktion. Für PIAS2 und PIAS3 sollte deshalb ebenfalls untersucht werden, ob das phosphoSIM-Modul bei der Transkriptionskontrolle von Bedeutung ist. Vergleichbar mit GAL4-PIAS1<sup>WT</sup> ist GAL4-PIAS3<sup>WT</sup> ebenfalls in der Lage die Reporteraktivität um den Faktor drei zu reprimieren (Abb. 20B). Im Vergleich dazu weisen GAL4-PIAS3<sup>V1438/9AA</sup> und GAL4-PIAS3<sup>S445/5/6A</sup> eine doppelt bis dreifach erhöhte Repression auf. Das hier genutzte Reporter-System bestand aus einem GAL4-SV40-Luciferase-Reporter-Plasmid, das zusammen mit den anderen Konstrukten in HeLa Zellen transfiziert wurde. Im Gegensatz zu GAL4-PIAS3<sup>WT</sup> stimuliert GAL4-PIAS2<sup>WT</sup> in diesem Reporter-System die Expression um das vierfache (Abb. 20A). Ein Verlust der Integrität des phosphoSIM-Moduls sowohl durch Austausch der hydrophoben Reste als auch durch eine Mutation der Serine zu Alaninen führt zu einer acht- bis zehnfachen Aktivierung des Reportergens.

Diese Experimente zeigen, dass das phosphoSIM eine entscheidende Bedeutung für die transkriptionelle Koregulatorfunktion besitzt und dass dies nicht nur für PIAS1 gilt, sondern auch für PIAS2 und PIAS3.

Um die Bedeutung des phosphoSIM-Moduls von PIAS Proteinen bei der Regulation eines natürlichen Transkriptionsfaktors zu untersuchen, wurden weitere Experimente an einem p53-stimulierten Reporter-System durchgeführt.

## Ergebnisse

Bereits bekannt ist, dass PIAS2 die p53-abhängige Aktivierung eines Luciferase-Reportergens, das ein kanonisches *p53-response-element* in seinem Promoter trägt, inhibiert (Schmidt und Muller, 2002). Im Einklang mit diesen Daten kann PIAS2<sup>WT</sup> die durch p53-stimulierte Aktivität in diesem System um 50% reduzieren (Abb. 21A). PIAS2<sup>V1469/70AA</sup> und PIAS2<sup>S476/78A</sup> dagegen beeinflussen die Aktivität von p53 nicht, so dass sich auch in diesem System die reprimierende Kapazität von PIAS2 auf das phosphoSIM-Modul zurückführen lässt. Eine Kontrolle mit einem im kanonischen *p53-response-element* mutierten Reporter-Konstrukt schließt für alle PIAS2 Proteine p53-unspezifische Nebeneffekte aus (Abb. 21C).



**Abb. 21: SIM-abhängige Repression von PIAS2 an einem p53-gesteuerten Reporter**  
**(A)** HeLa Zellen wurden transient mit dem pRGC-Luciferase-Reporter-Plasmid, das eine p53-DNA-Bindesequenz in seinem Promotor besitzt, und den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Die Standardabweichung errechnete sich nach der Normalisierung auf eine interne Renilla-Luciferase-Kontrolle. **(B)** Durch Immunoblot-Analyse mit den angegebenen Antikörpern wurden die Proteinmengen der betroffenen Proteine aus dem Experiment (A) untersucht. **(C)** Wie (A), nur wurde in diesem Experiment ein in der p53-Bindesequenz mutiertes pRGC-Luciferase-Reporter-Plasmid als Kontrolle verwendet.

## Ergebnisse

Zusätzlich wurde verifiziert, dass die Expressionsniveaus von p53 und den verschiedenen PIAS2 Varianten sich nicht unterscheiden (Abb. 21B). Zusammengenommen veranschaulichen diese Daten, dass ein Verlust der SUMO-Bindung entweder durch Mutationen der hydrophoben Aminosäuren oder der phosphorylierten Serine in gleicher Weise die transkriptionelle Koregulatorfunktion von PIAS Proteinen beeinflusst. Dies legt nahe, dass die phosphorylierungsabhängige SUMO-Bindung ein erforderlicher Schritt in der Kontrolle PIAS-regulierter Transkriptionsprozesse ist.

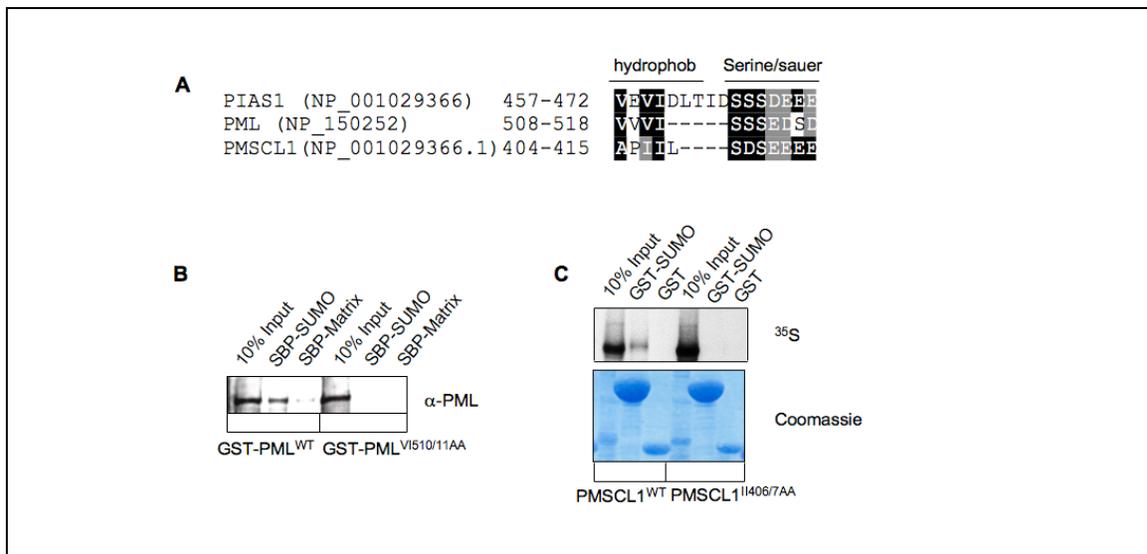
### 3.7 PML und PMSCL1 besitzen funktionelle phosphoSIM-Module

Um festzustellen, ob der CK2-regulierten SUMO-Bindung eine generelle Bedeutung zukommt, sollten neben den bereits analysierten PIAS Proteinen zwei weitere Proteine exemplarisch untersucht werden. Dabei handelt es sich mit PML um die strukturgebende Komponente der *nuclear bodies* und mit PMSCL1 um ein Protein aus dem Exosomkomplex. Für beide Proteine ist eine nicht-kovalente Interaktion mit SUMO bereits publiziert, wobei ergänzend die für diese Bindung wichtigen hydrophoben Aminosäuren kartographiert wurden. Der Sequenzvergleich dieser beiden Proteine mit dem phosphoSIM aus PIAS1 veranschaulicht, dass sich auch in PML und PMSCL1 neben den hydrophoben Aminosäuren eine Sequenz mit Serinen und aziden Aminosäuren anschließt (Abb. 22A). Hierbei liegen sowohl im Fall von PML als auch PMSCL1 diese Serinreste in einer CK2-Konsensussequenz ([S/T]-x-x-[D/E]). Bevor allerdings eine CK2-regulierte Phosphorylierung und SUMO-Bindung untersucht werden konnte, sollten zuerst die publizierten Ergebnisse der nicht-kovalenten Interaktion zu SUMO bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt. Hierbei wurde die Bindung von rekombinantem GST-PML an SBP-Epitop (*streptavidin binding protein*) markiertes SUMO getestet, das an einer SBP-Matrix immobilisiert wurde. Ein Immunoblot mit anti-PML Antikörper veranschaulicht eine Bindung von GST-PML<sup>WT</sup> an SBP-SUMO, nicht aber an die

## Ergebnisse

Matrixkontrolle. Im Gegensatz dazu zeigt eine in den hydrophoben Aminosäuren des SIM veränderte PML Mutante (GST-PML<sup>VI510/11AA</sup>) keine Interaktion (Abb. 22B). Auch ein durch *in vitro* Transkription/Translation hergestelltes und radioaktiv markiertes PMSCL1 Protein, dessen hydrophober analoger Aminosäurebereich ebenfalls verändert wurde (PMSCL1<sup>I1406/7AA</sup>), bindet im Unterschied zum Wildtyp (PMSCL1<sup>WT</sup>) nicht an GST-SUMO (Abb. 22C).

Diese Versuche zeigen, dass es sich bei den in der Sequenz zu PIAS1 analogen Aminosäuren in PML und in PMSCL1 zweifelsfrei um die für die SUMO-Bindung verantwortlichen Reste handelt.



### Abb. 22: Nachweis von SUMO-Interaktions-Motiven in PML und PMSCL1

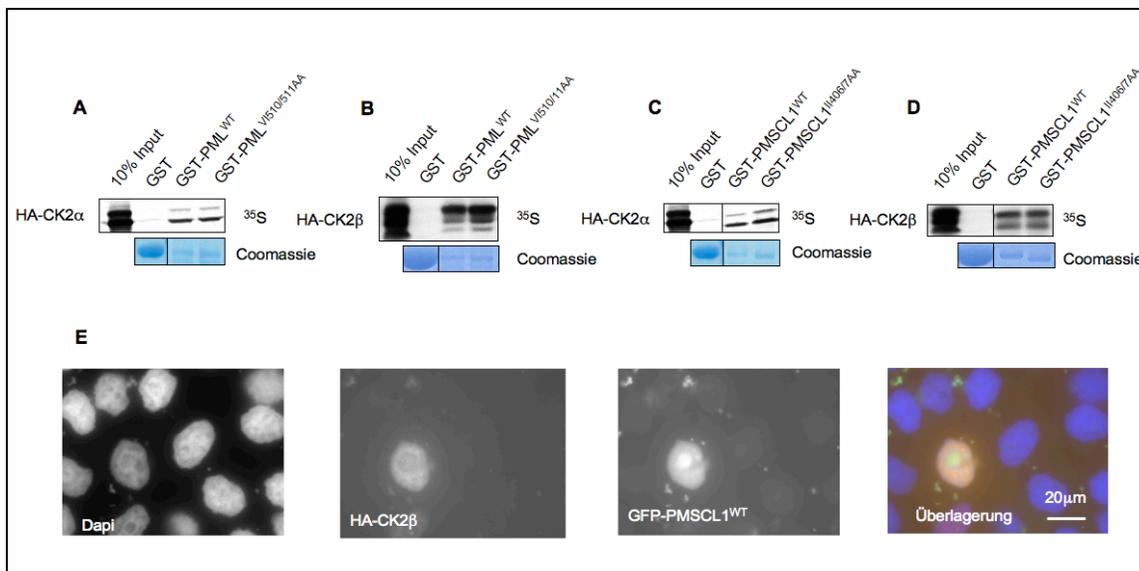
(A) Sequenzvergleich der phosphoSIM-Module von PIAS1, PML und PMSCL1. (B) Rekombinant synthetisiertes GST-PML<sup>WT</sup> oder GST-PML<sup>VI510/11AA</sup> wurden zusammen mit einer SBP-Matrix oder an einer Matrix immobilisierten SBP-SUMO inkubiert. Nach intensivem Waschen und einer Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde gebundenes PML über einen Immunoblot mit anti-PML Antikörper detektiert. (C) Bindungsstudie von an einer Matrix immobilisiertem GST-SUMO mit <sup>35</sup>S-markiertem PMSCL1<sup>WT</sup> bzw. PMSCL1<sup>I1406/7AA</sup>. Die Coomassie Kontrolle zeigt die Mengen der eingesetzten Proteine.

## 3.8 PML und PMSCL1 sind CK2-Substrate

Im nächsten Schritt sollte nachgewiesen werden, ob die dem SIM angrenzenden Serine in PML und PMSCL1 einer CK2-abhängigen Phosphorylierung unterliegen. Eine mögliche Kinase-Substrat-Beziehung sollte zunächst durch *in vitro* Bindungsstudien eruiert werden. Die durch *in vitro*

## Ergebnisse

Transkription/Translation generierten und radioaktiv markierten CK2-Untereinheiten wurden auf ihre Interaktion zu rekombinantem GST-PML<sup>WT</sup> bzw. GST-PML<sup>V1510/11AA</sup> oder GST-PMSC1<sup>WT</sup> bzw. GST-PMSC1<sup>I1406/7AA</sup> analysiert. Sowohl CK2 $\alpha$  als auch CK2 $\beta$  binden jeweils an die Wildtyp Proteine und die Mutanten von GST-PML und GST-PMSC1 mit gleicher Affinität (Abb. 23A-D). Entsprechende GST-Kontrollen zeigen keine Interaktion mit CK2.



**Abb. 23: Interaktion der CK2-Untereinheiten mit PML und PMSC1**

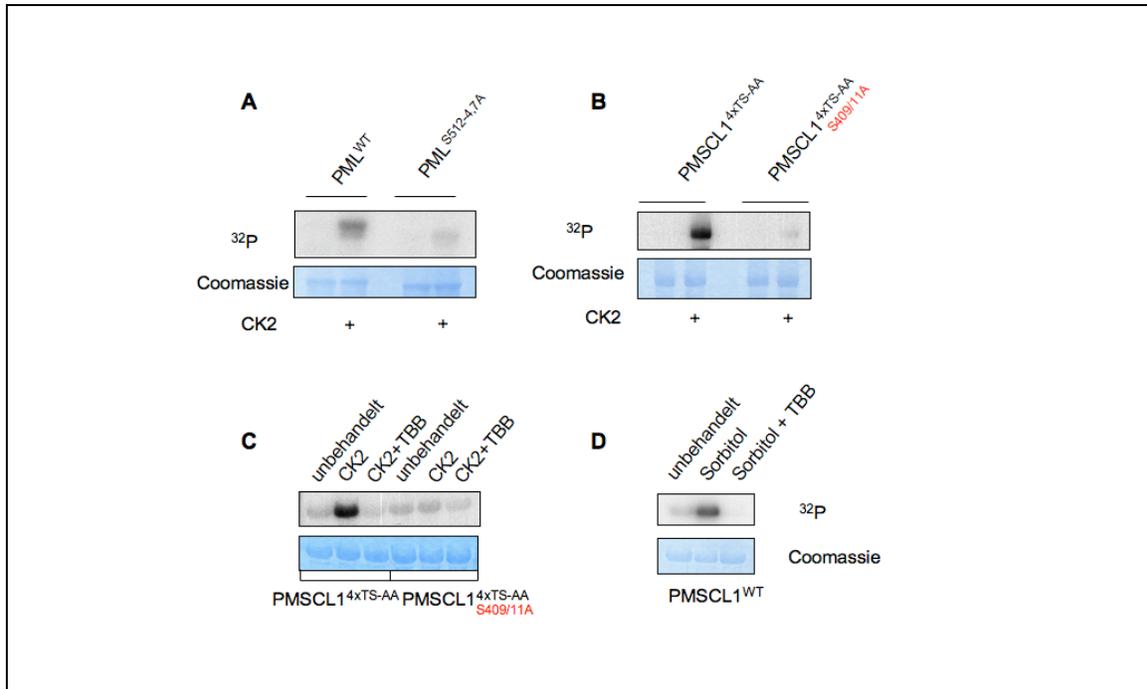
(A-D) <sup>35</sup>S-markiertes HA-CK2 $\alpha$  oder HA-CK2 $\beta$  wurden in ihrer Bindung zu an Glutathionsepharose-gekoppeltes GST-PML<sup>WT</sup> bzw. GST-PML<sup>V1510/11AA</sup> oder GST-PMSC1<sup>WT</sup> bzw. GST-PMSC1<sup>I1406/7AA</sup> überprüft. Die Coomassie Färbung veranschaulicht die Mengen der eingesetzten GST-Proteine. (E) HeLa Zellen wurden mit HA-CK2 $\beta$  und GFP-PMSC1<sup>WT</sup> transfiziert. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden anschließend mit DAPI gefärbt um den Zellkern zu markieren. HA-CK2 $\beta$  wurde durch einen monoklonalen Maus anti-HA Antikörper und anti-Maus Cy3-gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht. GFP-PMSC1<sup>WT</sup> wurde durch entsprechende Filtereinstellungen am Mikroskop detektiert. Maßstab: 20  $\mu$ m.

Wie oben beschrieben, ist eine wichtige Voraussetzung für eine *in vivo* Kinase-Substrat-Interaktion, eine zumindest partiell übereinstimmende Lokalisierung. Um ihre Lokalisierung zu überprüfen, wurden HA-CK2 $\beta$  und GFP-PMSC1 gemeinsam in HeLa Zellen exprimiert und ihre Lokalisierung per Immunofluoreszenzmikroskopie analysiert.

GFP-PMSC1<sup>WT</sup> lokalisiert, übereinstimmend mit publizierten Daten, präferentiell im Nukleolus (Abb. 23E). Zusätzlich lokalisiert es auch im gesamten

## Ergebnisse

Nukleoplasma. Da auch HA-CK2 $\beta$  diese Lokalisierung zeigt, unterstreicht dies eine mögliche Kinase-Substrat-Interaktion.



**Abb. 24: PML und PMSCL1 sind CK2-Substrate**

(A) PML wird an den Serinen 512, 513, 514 und 517 von CK2 phosphoryliert. Die rekombinanten Proteine wurden zusammen mit rekombinantem CK2 in Gegenwart von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP inkubiert. (B) Wie in (A), nur wurde als Substrat PMSCL1<sup>4xTS-AA</sup> bzw. PMSCL1<sup>4xTS-AA/S409/11A</sup> verwendet. In PMSCL1<sup>4xTS-AA</sup> sind die Serine 305 und 353 und die Threonine 176 und 306 zu Alaninen mutiert. (C) Rekombinantes GST-PMSCL1<sup>4xTS-AA</sup> oder GST-PMSCL1<sup>4xTS-AA/S409/11A</sup> wurden mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP in einem Kontroll-transfizierten oder mit CK2 $\alpha/\beta$ -transfizierten Extrakt aus HEK293T Zellen inkubiert. Zusätzlich wurden die CK2 exprimierenden Zellen entweder zur Kontrolle mit Lösungsmittel oder mit TBB behandelt. Die Proteine wurden über SDS-PAGE separiert und durch Coomassie Blau Färbung oder Autoradiographie detektiert. (D) Wie in (C), nur wurden GST-PMSCL1<sup>4xTS-AA</sup> mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP in einem Kontroll-behandeltem Zellextrakt oder einem Extrakt aus Zellen, die für 1h mit 400mM Sorbitol und gegebenenfalls zusätzlich auch mit TBB behandelt wurden, inkubiert.

Um den direkten Beweis zu erbringen, dass es sich bei PML und PMSCL1 um CK2-Substrate handelt, sollten diese Proteine in einer CK2-abhängigen *in vitro* Phosphorylierung untersucht werden. Dazu wurden in *E. coli* exprimiertes GST-PML und GST-PMSCL1 zusammen mit rekombinanten CK2-Untereinheiten und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP inkubiert und die mögliche Phosphorylierung beider Proteine nach Auftrennung in der SDS-PAGE mittels Autoradiographie analysiert. Dabei zeigte sich für PML eine deutliche CK2-induzierte Phosphorylierung, die nach

## Ergebnisse

Austausch der Serinreste 512-14 und 517 gegen Alanine verloren ging (Abb. 24A). Auch PMSCL1 wurde an diversen Serinen und Threoninen, inklusive der an das SIM angrenzenden Serine 409 und 411, durch CK2 phosphoryliert (Abb. 24B).

Darüberhinaus konnte ein Extrakt aus mit CK2-transfizierten HEK293T Zellen eine Phosphorylierung von PMSCL1<sup>4xTS-AA</sup> induzieren (Abb. 24C). In dieser Mutante sind vier in einer CK2-Konsensussequenz liegende Serine bzw. Threonine, die außerhalb des SIM-Moduls liegenden, gegen Alanine ausgetauscht wurden. Erfolgt eine Vorbehandlung der Zellextrakte mit dem CK2-Inhibitor TBB oder werden zu den vier Serinen bzw. Threoninen zusätzlich auch die an das SIM angrenzenden Serine 409 und 411 mutiert, lässt sich eine derartige Induktion der Phosphorylierung nicht beobachten. Auch bei einer Vorbehandlung der Zellen mit 0,5M Sorbitol, wodurch ein osmotischer Stress induziert wird, ergeben sich für PMSCL1 mit PIAS1 vergleichbare Ergebnisse. So führt die Vorbehandlung mit Sorbitol zu einer verstärkten Phosphorylierung durch endogenes CK2, während eine gleichzeitige Behandlung mit dem Inhibitor TBB diesen Effekt verhindert (Abb. 24D).

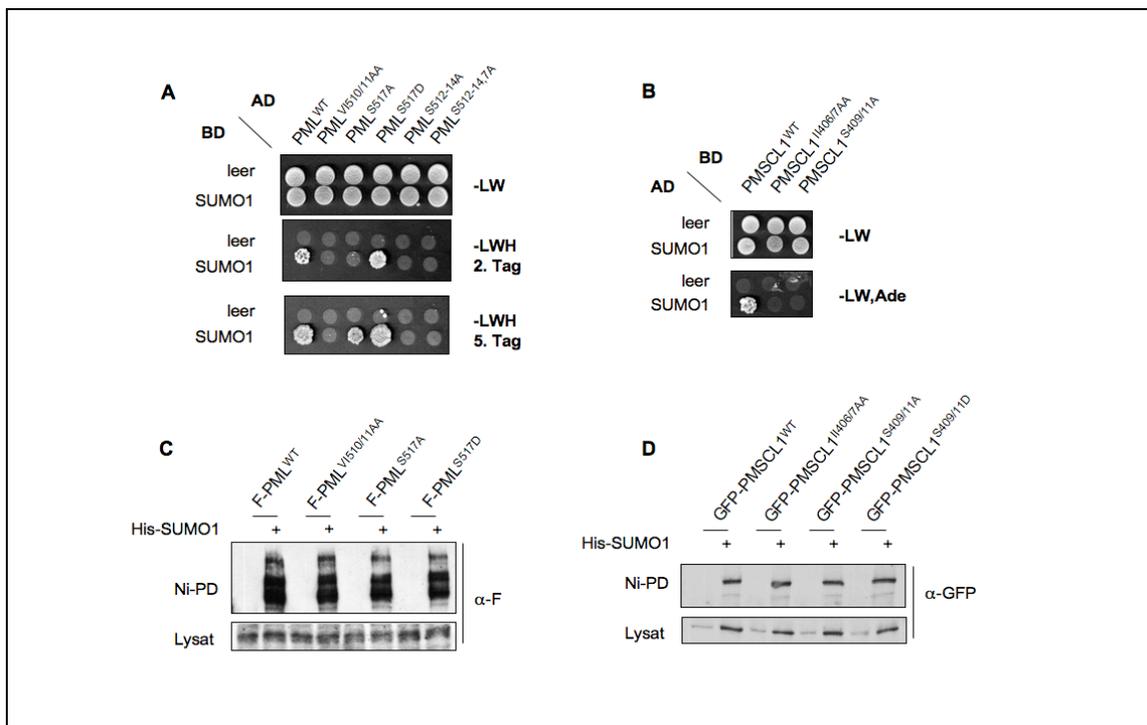
Diese Ergebnisse zeigen, dass PML und PMSCL1 analog zu PIAS1 an den dem SIM angrenzenden Serinen von CK2 phosphoryliert werden. Zusätzlich veranschaulichen Versuche mit Sorbitol, dass diese Phosphorylierungen einer ähnlichen Regulation unterliegen. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass sich eine CK2-abhängige SIM-Phosphorylierung nicht nur auf die PIAS Proteine beschränkt, sondern ein generelles Phänomen darstellt.

### 3.9 Die CK2-abhängige Phosphorylierung von PML und PMSCL1 unterstützt die nicht-kovalente Bindung an SUMO

Durch weitere Versuche sollte der Einfluss der Phosphorylierung des phosphoSIM-Moduls in PML und PMSCL1 auf die SUMO-Bindung untersucht werden. Im Hefe *two-hybrid*-System zeigt PML<sup>WT</sup> eine Interaktion zu SUMO, während die Mutation des hydrophoben SIM Bereichs (PML<sup>V1510/11AA</sup>) zum Verlust

## Ergebnisse

der Bindung führt (Abb. 25A). Interessanterweise führt eine Mutation in den Serinen 512-14 ( $PML^{S512-14A}$ ) und weniger stark eine Mutation im Serin 517 ( $PML^{S517A}$ ) ebenso zum Verlust der SUMO-Bindung. Dies veranschaulicht, dass, wie bei den PIAS Proteinen, eine Phosphorylierung für die SUMO/phosphoSIM-Interaktion obligat ist. Auch für PMSCL1 führt der Austausch der hydrophoben Aminosäuren in Alanine ( $PMSCL1^{I1406/7AA}$ ) zu einem Verlust der Bindung an SUMO, dasselbe gilt für den Austausch der Serine 409 und 411 in Alanine ( $PMSCL1^{S409/11A}$ ) (Abb. 25B).



**Abb. 25: Nachweis eines funktionellen phosphoSIMs in PML und PMSCL1**

(A)  $PML^{WT}$  und die angegebenen Mutanten wurden im gerichteten Hefe *two-hybrid*-System auf eine Interaktion mit SUMO1 überprüft. (B) Die SIM-beihaltende Region von  $PMSCL1^{WT}$  (Aminosäuren 342-444) und die genannten Mutanten wurden auf ihre Interaktion mit SUMO1 im Hefe *two-hybrid*-System untersucht. (C) His-SUMO1 wurde mit Flag-Epitop markierten Versionen von PML Wildtyp und den angegebenen Mutanten in HeLa Zellen koexprimiert. His-SUMO1-Konjugate wurden an eine Ni-NTA Matrix gebunden und über Western-Blot mit anti-Flag Antikörper visualisiert. Die Expression der betreffenden Proteine wurde durch Immunoblot der Zelllysate analysiert. (D) Wie (C), nur wurden GFP-fusionierte PMSCL1 Varianten mit His-SUMO1 koexprimiert. Die Detektion erfolgte über einen polyklonalen anti-GFP Antikörper.

## Ergebnisse

Zusammengenommen legen diese Daten nahe, dass die CK2-kontrollierte SUMO-Bindung über ein phosphoSIM-Modul ein genereller Signalweg zu sein scheint. In Einklang mit dieser Schlussfolgerung ergab eine zielgerichtete Datensuche in Phosphoproteomdatenbanken eine Vielzahl von putativen phosphoSIM-Modulen in diversen SIM-beinhaltenen Proteinen, wie z.B. Topors, Daxx oder Sp100 (Abb. 27).

Bei der Suche nach einer biologischen Konsequenz der CK2-abhängigen Phosphorylierung von PML und PMSCL1 sollte deren Sumoylierung untersucht werden. Dabei ist PML ein bereits bekanntes Substrat, während PMSCL1 als neues SUMO-Substrat identifiziert werden konnte. Wie zuvor beschrieben wurden die zu analysierenden Proteine mit His-SUMO1 koexprimiert und aufgereinigt. Vergleichbar zu PIAS1 hat die phosphoSIM-Integrität auch in PML und PMSCL1 keinen Einfluss auf die Sumoylierung (Abb. 25C und D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz vergleichbarer Regulation durch die Kinase CK2 über das phosphoSIM individuelle funktionelle Konsequenzen gesteuert werden, deren Entdeckung für PML und PMSCL1 weiterführende Studien benötigt.

### 4 Diskussion

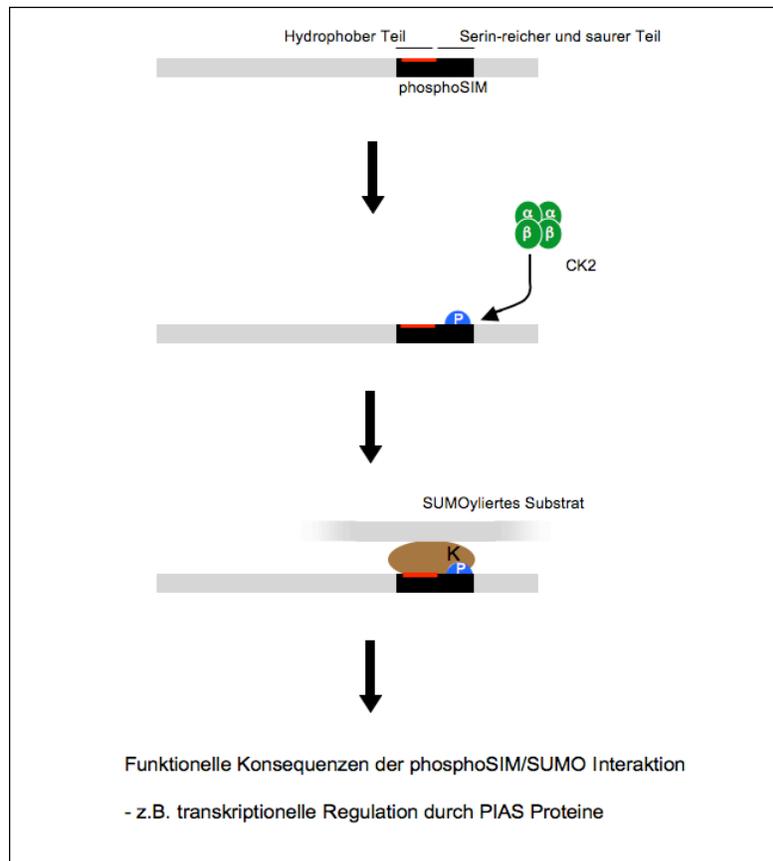
#### 4.1 Zusammenspiel zwischen dem CK2- und dem SUMO-Signalweg

Die kovalente Verknüpfung des Ubiquitin-ähnlichen Proteins SUMO an Substrate reguliert spezifische Protein/Protein-Interaktionen durch die nicht-kovalente Bindung von SUMO an spezialisierte SUMO-Interaktions-Motive (SIM). Dabei stellt ein Bereich von hydrophoben Aminosäuren ein zentrales Interaktionsmotiv bei der Bindung an SUMO dar (Song et al., 2004). In dieser Arbeit konnte ein erweitertes phosphorylierungsabhängiges SIM in PIAS Proteinen entdeckt werden, wobei CK2 die für die Phosphorylierung verantwortliche Kinase ist (Abb.26). In SUMO1 bzw. SUMO2 konnten die Lysine 39 bzw. 35 als die Bindestellen der phosphorylierten Serine identifiziert werden. Funktionell scheint der Phosphorylierung von phosphoSIM-Modulen in PIAS Proteinen eine kritische Aufgabe bei der Kontrolle PIAS-regulierter Transkriptionsprozesse zuzufallen. Durch weitere Studien konnte das Konzept eines phospho-regulierten SIMs auch in den Proteinen PML und PMSCL1 wieder gefunden und generalisiert werden. Das phosphoSIM repräsentiert somit eine Plattform, die den CK2- und SUMO-Signalweg integriert.

Für CK2-vermittelte Phosphorylierungen wurde bereits früher eine Kontrollfunktion bei Protein/Protein-Interaktionen beschrieben. So kann z.B. die Interaktion von Ankyrinen mit Na(v)-Kanälen durch eine CK2-abhängige Phosphorylierung gesteuert werden (Brechet et al., 2008). Damit ist es CK2 möglich die Organisation des Natrium-Kanals zu regulieren. Auch die Bindung des zum MRN-Komplex gehörigen NBS (*Nijmegen Breakage Syndrom*) Proteins an den DNA-Schadensmediator MDC1 kann durch eine CK2-katalysierte Phosphorylierung gesteuert werden (Chapman und Jackson, 2008). Durch eine Interaktion von NBS und MDC1 erfolgt eine Assoziation des MRN-Komplexes mit nicht reparierten DNA-Doppelstrangbrüchen. Zukünftige Experimente eröffnen

## Diskussion

nun die Möglichkeit zu untersuchen, ob in diesen oder anderen Fällen Sumoylierung der jeweiligen Interaktionspartner an der Bindung beteiligt ist.



### Abb. 26: Schematische Darstellung der Aktivierung eines phosphoSIM-Moduls

Das Charakteristikum eines phosphoSIMs sind die sich an die hydrophoben Aminosäuren anschließenden Serine, auf die azide Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat folgen. Durch eine Phosphorylierung mit der Kinase CK2 wird das Modul aktiviert, wobei für eine nicht-kovalente Bindung an SUMO oder sumoylierte Substrate sowohl der hydrophobe als auch der Serin-reiche/saure Teil unabhängig voneinander benötigt werden. Während der hydrophobe Kern mit einer hydrophoben Tasche aus einer  $\alpha$ -Helix und einem  $\beta$ -Faltblatt interagiert, ist für eine Bindung an die Phosphatgruppen das Lysin 39 (K39) respektive 35 (K35) aus SUMO1 bzw. SUMO2 verantwortlich. Die biologischen Konsequenzen einer phosphoSIM/SUMO-Interaktion scheinen für die jeweiligen Proteine individuell zu sein, wobei in PIAS Proteinen für das phosphoSIM eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle gezeigt werden konnte.

Die hier beschriebene Verknüpfung des SUMO-Systems mit dem CK2-Signalweg repräsentiert eine neue Facette der Verbindung des SUMO-Systems mit phosphorylierungsabhängigen Prozessen. Bisher wurden verschiedene Ebenen des Zusammenspiels dieser beiden Modifikationssysteme beschrieben. Zum einen ist SUMO1 selbst ein Phosphorylierungssubstrat. Als

## Diskussion

Phosphorylierungsstelle konnte der konservierte Serinrest an Position zwei im N-Terminus identifiziert werden (Matic et al., 2008a). Trotz eines Nachweises der Phosphorylierung in verschiedenen Organismen (Hefe, Fruchtfliege, Human-Zellen) blieb eine mögliche Funktion bisher offen.

Neben SUMO werden auch enzymatische Komponenten des SUMO-Systems, wie die SUMO-spezifische Isopeptidase SENP3 phosphoryliert (Kuo et al., 2008). Die funktionelle Konsequenz ist jedoch derzeit unklar. Besser beschrieben sind die funktionellen Konsequenzen einer SUMO-Modifikation von Kinasen und Phosphatasen. Die Phosphatase PTP1B wird in einer Insulin-stimulierten Reaktion durch PIAS1 sumoyliert (Dadke et al., 2007). Hierbei reduziert die Modifikation die enzymatische Aktivität der Phosphatase und inhibiert dementsprechend den negativen Effekt von PTP1B auf den Insulin-Rezeptor-Signalweg. Außerdem kann eine Phosphorylierung auch einen Einfluss auf den Sumoylierungsstatus von Substraten haben. Hier sind zwei gegensätzliche Effekte beschrieben. So wirkt sich eine Phosphorylierung von Jun negativ auf dessen Sumoylierung aus (Muller et al., 2000), während für die bereits erwähnten PDSMs die Phosphorylierung eine Voraussetzung für eine anschließende Sumoylierung ist (Hietakangas et al., 2006).

Neben Verknüpfungen zur Phosphorylierung sind auch Verbindungen des SUMO-Systems zu anderen posttranslationalen Modifikationen, wie zur Ubiquitylierung oder Acetylierung bekannt. Wie bereits erwähnt existiert ein SUMO-abhängiger Abbauweg bei dem SIM-beinhalten Ubiquitin-Ligasen wie z.B. RNF4 zu sumoylierten Protein rekrutiert werden und deren Ubiquitylierung induzieren. Daneben ist auch die direkte Konkurrenz von Ubiquitin und SUMO bei der Modifikation eines spezifischen Lysinrestes beschrieben. Ein ähnliches Szenario ist auch für das Wechselspiel von Sumoylierung und Acetylierung bekannt. So wurde für MEF2A, HIC1 oder Sp3 die alternative Modifikation mit SUMO oder Acetylresten am selben Lysin publiziert ( Sapetschnig et al., 2002; Shalizi et al., 2006; Stankovic-Valentin et al., 2007).

### 4.2 Strukturelle Charakteristika der phosphoSIM/SUMO-Interaktion

Die strukturelle Basis für eine SIM-vermittelte SUMO-Bindung wurde bisher durch NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie ermittelt (Hecker et al., 2006; Sekiyama et al., 2008; Song et al., 2005). So wurde die Struktur von SUMO1 im Komplex mit einem SIM umspannenden Peptid von PIAS2 (K-V-D-V-I-D-L-T-I-E-S-S-S-D-E-E-E-D-P-P-A-K-R) gelöst (Song et al., 2004). Hier konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren Val-2, Asp-3, Val-4, Ile-5, Leu-7 und Thr-8 aus diesem Peptid an SUMO1 binden, wobei dem hydrophoben Bereich (Val-4, Ile-5 und Leu-7) eine essentielle Bedeutung zukommt. Dabei formen die Aminosäuren 2-6 ein  $\beta$ -Faltblatt, das durch Kontakt zum  $\beta_2$ -Faltblatt und der  $\alpha$ -Helix an SUMO1 bindet. Eine vergleichbare SUMO/SIM-Bindung ist durch die Kristallstruktur eines Komplexes aus RanGAP1 mit konjugiertem SUMO und der E3 Ligase-Domäne von RanBP2, die ein den PIAS Proteinen vergleichbares hydrophobes SIM besitzt, zu erkennen (Reverter und Lima, 2005). Darüberhinaus bindet an die Thymidin-DNA-Glykosylase konjugiertes SUMO1 oder SUMO3 in ähnlicher Art und Weise an ein im gleichen Molekül gelegenes internes SIM (Baba et al., 2006; Baba et al., 2005). Zusammengefasst unterstreichen diese Resultate die Bedeutung der hydrophoben Aminosäuren bei der Interaktion von SIM und SUMO, wobei in dieser Arbeit übereinstimmend mit den angesprochenen Resultaten ebenfalls eine kritische Bedeutung dieser Aminosäuren in der Bindung von SUMO zu PIAS Proteinen, PML und PMSCL1 in humanen Zellen und im Hefe *two-hybrid*-System gezeigt werden konnte. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung der Serinreste, die an die hydrophoben Aminosäuren angrenzen, *in vitro* zu einer drastisch verstärkten Interaktion der SUMO/SIM-Bindung führt und *in vivo* eine notwendige Voraussetzung für die Interaktion darstellt. Hierbei scheinen die durch die Phosphorylierung eingeführten negativen Ladungen zusätzliche elektrostatische Interaktionen zu SUMO zu ermöglichen. In Übereinstimmung mit dieser Idee zeigen NMR-Studien einer monophosphorylierten Variante des oben

## Diskussion

erwähnten SIM-Peptides aus PIAS2, dass eine Phosphorylierung in räumlicher Nähe zu den Lysin 37 bzw. 35 in SUMO1 bzw. SUMO2 binden muss (Hecker et al., 2006). Die *in vivo* Experimente dieser Arbeit veranschaulichen, dass die Lysine 39 bzw. 35 in SUMO1 bzw. SUMO2 direkt an phosphorylierte Serine in PIAS1 binden und durch die elektrostatischen Interaktionen diese Lysine als Rezeptoren der Phosphorylierung gelten können. Interessanterweise ist der Lysinrest 35 essentiell in der Vermittlung der transkriptionellen inhibitorischen Eigenschaften von SUMO2 (Chupreta et al., 2005), was die Verbindung von CK2-vermittelter SUMO-Bindung und der Regulation von transkriptionellen Prozessen weiter verstärkt. In neueren NMR-Bindungsstudien eines SIM-Peptides aus MCAF1 mit SUMO3 wurden zusätzlich zu hydrophoben Wechselwirkungen elektrostatische Interaktionen von sauren Resten aus MCAF1 mit Lysin 35 aus SUMO3 detektiert (Sekiyama et al., 2008). Dabei handelt es sich um azide Reste, die zum Teil in ihrer Position den phosphorylierten Serinen in phosphoSIM-Modulen entsprechen. Zusätzlich kommt aber auch einem Aspartatrest, der zwischen den hydrophoben Aminosäuren lokalisiert und auch in PIAS Proteinen zu finden ist, eine wichtige Rolle bei der Bindung zu verschiedenen anderen Lysin 35 von SUMO3 zu. Dies könnte erklären warum alle Lysin Mutanten der beiden SUMO-Isoformen (Lysin 37, 39 und 45/6 in SUMO1 und Lysin 33, 35 und 42 in SUMO2) einen Defekt in der Interaktion zu PIAS1 zeigen und warum diese Aminosäuren in der transkriptionellen Regulation von SUMO von Bedeutung sind.

Basierend auf *in vitro* Studien postulieren Hecker *et al.*, dass phosphorylierte Serinreste oder angrenzende saure Aminosäuren vor allem bedeutsam für die Bindung an SUMO1, nicht aber SUMO2 sind. Die *in vivo* Experimente dieser Arbeit zeigen dagegen, dass die Phosphorylierung des SIM-Moduls sowohl für die Bindung an SUMO1 als auch an SUMO2 essentiell ist. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen dokumentieren neue Daten von Sekiyama *et al.*, dass die sauren Aminosäuren in MCAF1 Bindung an SUMO1 und SUMO2 in gleicher Weise beeinflussen.

## Diskussion

Die Proteine RanBP2, Pelp1 und Nucleolin besitzen eine reverse Variante des phosphoSIMs (Abb.27). Vom N-Terminus aus betrachtet finden wir hier zuerst die Serine, darauf folgen die aziden Aminosäuren, so dass die CK2-Konsensussequenz erhalten bleibt und C-terminal hierzu der hydrophobe Teil folgt. Interessanterweise sind der azide und der hydrophobe Teil auch im SIM der Thymidin-DNA-Glykosylase (TDG) revertiert. Dabei zeigt die entsprechende Struktur ebenso wie die für RanBP2 eine umgekehrte Orientierung in der Bindung zwischen SUMO und SIM. So scheint die Stellung der aziden Aminosäuren bzw. in phosphoSIM-Modulen die Lage der phosphorylierten Serine die Orientierung der SUMO-Bindung festzulegen.

### 4.3 Die Bedeutung des phosphoSIM-Moduls bei der Regulation transkriptioneller Prozesse

Die hier erzielten Ergebnisse zeigen ein Zusammenspiel von PIAS und CK2 bei der transkriptionellen Regulation von p53. Da für PIAS und CK2 auch eine Kontrolle weiterer gemeinsamer Signalwege beschrieben ist, könnte phosphoSIM-Modulen in PIAS generelle Bedeutung bei der Regulation kritischer Zellfunktionen zukommen. So sind PIAS Proteine, wie bereits oben beschrieben, in der Lage die transkriptionelle Aktivität von NF $\kappa$ B oder des  $\beta$ -Catenin/LEF-Komplexes im Wnt-Signalweg zu regulieren. Bemerkenswerterweise werden diese Signalwege auch durch CK2 beeinflusst. Darüberhinaus besitzen in der Tat Serinreste im phosphoSIM-Modul von PIAS4 eine kritische Rolle bei der PIAS4-vermittelten Repression von LEF1 (Sachdev et al., 2001). Eine mögliche mechanistische Grundlage dieser Repression könnte die SIM-abhängige Rekrutierung transkriptioneller Ko-Repressoren sein.

Interessanterweise besitzen sowohl PIAS2 $\alpha$  als auch CK2 eine Verbindung zum MAP-Signalweg (*mitogen-activated protein*). Dabei wird CK2 wahrscheinlich durch eine direkte Phosphorylierung der Kinase p38, die ein wichtiger Bestandteil des MAP-Signalweges ist, aktiviert (Sayed et al., 2000). PIAS2 $\alpha$  erzielt eine Wirkung auf den MAP-Signalweg über den Transkriptionsfaktor Elk1 (Yang und

## Diskussion

Sharrocks, 2005). Die PIAS2 $\alpha$ -vermittelte transkriptionelle Regulation ist dabei abhängig von der Integrität seines SIMs. Da in diesen Experimenten das gesamte phosphoSIM-Modul deletiert wurde, d.h. sowohl hydrophobe als auch saure Aminosäuren und Serine, bleibt unklar, ob in diesem speziellen Signalweg eine phosphorylierungsabhängige SUMO-Bindung relevant ist.

Eine zentrale Frage zukünftiger Experimente ist, welche Interaktionspartner durch die phosphorylierungsabhängige SUMO-Bindung an PIAS Proteine rekrutiert werden und damit transkriptionelle Prozesse kontrollieren. Als putative Interaktoren des phosphoSIM-Moduls von PIAS1 konnten unter anderem die transkriptionellen Repressoren KAP1, SETDB1 und MBD1 detektiert werden, die auch, meist durch eigene Sumoylierung, einen Bezug zum SUMO-System besitzen. Ob in diesen Fällen tatsächlich eine phosphorylierungsabhängige Bindung zu PIAS1 vorliegt müssen weitere Experimente beweisen.

Neben biochemischen Ansätzen zur Identifizierung neuer phosphorylierungsabhängiger Interaktoren von PIAS wäre auch denkbar durch genomweite RNA-Interferenz-Screens neue Komponenten der phosphoSIM-vermittelten Transkriptionskontrolle zu identifizieren. Als Vorlage kann hier eine Analyse von Stielow *et al.* dienen, in der ein RNA-Interferenz-Screen in *Drosophila melanogaster* Zellen genutzt wurde um SUMO-abhängige Repressoren von Sp3 zu finden (Stielow et al., 2008). Dazu wurde ein Luciferase-Reporter-System etabliert, in dem ein Wildtyp Sp3<sup>WT</sup> Protein repressorische Fähigkeiten besitzt, die durch die Mutation des SUMO-modifizierten Lysins verloren gehen. Positive Kandidaten des RNAi-Screens zeigen in diesem System einen Anstieg der Reporter-Aktivität in Anwesenheit von Sp3<sup>WT</sup>. Gleichzeitig verändert die sumoylierungs-defiziente Mutante die Aktivität bei der Behandlung mit der identischen Interferenz-RNA nicht. Mit diesem System konnte beispielsweise Mi-2, ein Protein des NuRD-Komplexes, als SUMO-abhängiger Sp3 Interaktor und SUMO-abhängiger Repressor entdeckt werden.

Interessanterweise besitzen Fruchtfliegen im Gegensatz zu Säugetieren nur ein Mitglied der PIAS Familie. Su(var)2-10 (*suppressor of variegation 2-*

## Diskussion

10/DPIAS) liegt allerdings in bis zu neun *Splice*-Varianten vor. Allen Varianten sind im C-Terminus die Sequenzen V-E-V-I-S-D-D-D-I-E und V-D-L-T-L-S-D-S-D-D-D-D gemeinsam, die ein Homolog zu den in den humanen PIAS Proteinen gefundenen phosphoSIM-Modulen sein könnten. Dies müsste in einem ersten Schritt, wie auch eine Phosphorylierung der Serine, durch experimentelle Daten eruiert werden. In einem zweiten Schritt müsste ein phosphoSIM-abhängiges Reporter-System etabliert werden, das anschließend für den RNA-Interferenz-Screen verwendet werden könnte. Dieser Screen könnte mit Su(var)2-10 Wildtyp und entsprechenden Phosphorylierungsmutanten durchgeführt werden. Das System bietet aufgrund der genetischen Zugänglichkeit von Insektenzellen und durch das Vorhandensein von lediglich einem Mitglied der PIAS Familie einige Vorteile und könnte so vielleicht neue phosphoSIM-abhängige Interaktoren aufzeigen.

Ein entscheidender Aspekt bei der Bearbeitung der phosphorylierungsabhängigen transkriptionellen Koregulatorfunktion von PIAS Proteinen ist die Suche nach differenziell über das phosphoSIM-regulierten Genen. Für eine universelle Suche nach neuen Zielgenen scheinen Microarrays die Methode der Wahl zu sein. Hierfür könnten mRNAs aus Zellen, die die verschiedenen phospho-Mutanten von PIAS1 oder anderen PIAS Proteinen stabil exprimieren, untersucht werden. Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang eine Kopplung mit einer RNAi-vermittelten Depletion von endogenen PIAS Proteinen. Über Microarrays oder eine RT-PCR-Analyse bereits bekannter PIAS-regulierter Gene könnten anschließend die Gene ermittelt werden, die einer phosphoSIM-Kontrolle unterliegen.

### **4.4 Genereller Einfluss auf die zelluläre Homöostase durch das phosphoSIM-Modul**

Die Auswirkungen, die ein SUMO-Interaktions-Motiv auf die Funktion eines Proteins haben kann, wurden bereits in der Einleitung ausführlicher besprochen. So gibt es Beispiele für Proteine, die eine SIM-abhängige Lokalisierung zeigen

## Diskussion

oder sich in ihrer katalytischen Aktivität verändern. Nach den PIAS Proteinen sollen hier für die anderen phosphoSIM Proteine mögliche Szenarien der Konsequenzen einer phosphorylierungsabhängigen SUMO-Bindung entworfen werden. Abbildung 27 zeigt eine Liste von Proteinen mit putativen phosphoSIM-Modulen. Die Liste ergab sich aus einer gezielten Datenbankrecherche nach Sequenzen mit phosphoSIM-Eigenschaften (aliphatisch/Serin-reich/azide). Für einige dieser Proteine konnte bereits experimentell eine Beteiligung der hydrophoben Aminosäuren an der nicht-kovalenten Bindung zu SUMO gezeigt werden. Alle Proteine wurden auf eine Phosphorylierung an der entsprechenden Position in der Datenbank Phosida überprüft.

Eine besondere Bedeutung besitzen SUMO/SIM-Interaktionen im Aufbau von PML *nuclear bodies*. Die strukturgebende Komponente dieser Proteinkomplexe ist der Tumorsuppressor PML. Beim Aufbau der *nuclear bodies* binden SUMO modifizierte PML Formen an die SIMs anderer PML Proteine, wobei ein PML Protein drei modifizierte Lysine besitzt und in der Lage ist an drei verschiedene andere PML Moleküle zu binden (Shen et al., 2006). So kann ein Komplex, der PML *nuclear body*, aufgebaut werden. Da PML *nuclear bodies* in Größe und Anzahl dynamisch veränderbar sind, fällt es nicht schwer sich vorzustellen, dass CK2 in diesem Prozess über die Phosphorylierung des phosphoSIMs eine regulatorische Funktion besitzen könnte. Dies betrifft auch die Rekrutierung anderer phosphoSIM Proteine in PML *nuclear bodies*. So gehören mit HIPK2, Daxx und Sp100 auffällig viele Proteine mit einem phosphoSIM-Modul zu den *nuclear body* lokalisierten Proteinen. Für diese sind danach ebenso CK2-abhängige Lokalisierungen vorstellbar.

Zu den phosphoSIM-Proteinen gehören auch die SUMO-spezifischen Isopeptidasen SENP6 und SENP7. Für diese Komponenten des SUMO-Signalweges ist es sehr gut vorstellbar, dass ein phosphoSIM zur Rekrutierung der Substrate dient, so dass die Phosphorylierung letztendlich einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Isopeptidasen nehmen kann.

Mit PMSCL1 und Nucleolin befinden sich zwei nukleoläre Komponenten in der Liste der phosphoSIM Proteine. Dabei ist PMSCL1 Bestandteil des Exosoms

## Diskussion

und könnte durch eine nicht-kovalente SUMO-Bindung den Aufbau dieses Proteinkomplexes bestimmen oder für die Rekrutierung anderer Interaktionspartner verantwortlich sein (Allmang et al., 1999). Leider sind für PMSCL1 nicht viele Bindungspartner außerhalb des Exosoms bekannt, so dass sich auch keine Aussage über deren Sumoylierung treffen lässt.

		In Phosida beschriebene Phosphorylierung		
PIAS1:				
[V]-[E]-[V]-[I]-[D]-[L]-[T]-[I]-[D]-	[S]-[S]-[S]-	[D]-[E]-[E]-[E]-	✓	
PIAS2:				
[V]-[D]-[V]-[I]-[D]-[L]-[T]-[I]-[E]-	[S]-[S]-[S]-	[D]-[E]-[E]-[E]-	✓	
PIAS3:				
[V]-[E]-[V]-[I]-[D]-[L]-[T]-[I]-[E]-	[S]-[S]-[S]-	[D]-[E]-[E]-[D]-	✓	
PIASy:				
[V]-[V]-[D]-[L]-[T]-[L]-[D]-	[S]-[S]-[S]-[S]-[S]-	[E]-[D]-[E]-[E]-	✓	
PML:				
[V]-[V]-[V]-[I]-	[S]-[S]-[S]-	[E]-[D]-[S]-[D]-	✓	
PMSCL1:				
[P]-[I]-[I]-[L]-	[S]-[D]-[S]-	[E]-[E]-[E]-[E]-	✓	
Senataxin:				
[V]-[I]-[I]-[I]-	[S]-[D]-[S]-	[D]-[D]-[D]-[D]-	✓	
Sp100:				
[I]-[I]-[V]-[I]-	[S]-[S]-	[E]-[D]-[S]-[E]-	✓	
Topors:				
[V]-[I]-[T]-[I]-	[D]-[S]-[D]-[S]-	[D]-[K]-[D]-[S]-[E]-	✓	
Daxx:				
[I]-[I]-[V]-[L]-	[S]-[D]-[S]-	[D]	✓	
HIPK2:				
[V]-[S]-[V]-[I]-[S]-[T]-[I]-	[S]-[S]-[D]-[T]-	[D]-[E]-[E]-[E]-	nein	
SAE2:				
[V]-[L]-[I]-[V]-	[D]-[S]-	[D]-[E]-[E]-[D]-	nein	
IE2 (human Cytomegalovirus):				
[C]-[I]-[V]-[I]-	[S]-[D]-[S]-	[E]-[E]-[E]-[E]-	nicht in der Datenbank vorhanden	
PELP1(1):				
[L]-[T]-[V]-[I]-[N]-[I]-[N]-	[S]-[S]-	[D]-[E]-[E]-[E]-[E]-	nein	
Pc2:				
[V]-[I]-[L]-[L]-	[D]-[S]-	[D]-[L]-[D]-[E]-	nein	
MCAF:				
[F]-[L]-[V]-[L]-	[S]-	[D]-[E]-[E]-[D]-	✓	
ZCCHC7:				
[I]-[I]-[E]-[V]-	[S]-[S]-[S]-	[E]-[E]-[E]-[E]-	nein	
ZNF451:				
[I]-[D]-[L]-[V]-	[S]-[S]-	[D]-[D]-[E]-[E]-	nein	
SENP6:				
[P]-[I]-[I]-[L]-	[S]-[S]-	[D]-[D]-[D]-[D]-[D]-	✓	
SENP7:				
[I]-[V]-[V]-	[S]-[S]-	[D]-[E]-[E]-	✓	
Revers:				
RanBP2:				
[S]-[D]-[S]-	[P]-[D]-[D]-[D]-	[V]-[L]-[I]-[V]-	[V]-	✓
PELP1(2):				
[S]-[D]-[S]-	[D]-[D]-[S]-	[V]-[V]-[I]-[V]-	[P]-	nein
Nucleolin:				
[D]-[S]-[S]-	[G]-[E]-[E]-	[V]-[V]-[V]-[I]-	[P]	✓

**Abb. 27: Liste von Proteinen mit putativen phosphoSIM-Modulen**

Die Liste zeigt Proteine mit potentiellen phosphoSIM-Modulen. Zur besseren Veranschaulichung der modulartigen Struktur wurden der hydrophobe, der Serin-reiche und der azide Teil voneinander abgegrenzt. Für einige der dargestellten Proteine, wie z.B. Daxx oder RanBP2, ist ein Einfluss des hydrophoben Teils auf die Bindung zu SUMO bereits bekannt, für andere Proteine, wie z.B. den SUMO-Isopeptidasen SENP6 und SENP7, wurde eine enge Verknüpfung zum SUMO-Signalweg beschrieben. Ein Großteil der dargestellten Proteine konnte in der Phosphoproteom Datenbank Phosida an den angesprochenen Serinen als phosphoryliert identifiziert werden. Interessanterweise konnte auch eine reverse Form des phosphoSIMs in den Proteinen RanBP2, PELP1 und Nucleolin entdeckt werden.

## Diskussion

Nucleolin dagegen ist besser charakterisiert. Unter den Interaktionspartnern befinden sich unter anderem Nucleophosmin und das La-Protein, beide sind als SUMO-Substrate beschrieben (Fouraux et al., 2002; Li et al., 1996; Tago et al., 2005; van Niekerk et al., 2007). Ob eine nicht-kovalente SUMO/phosphoSIM-Interaktion für die Bindung zu einem dieser Proteine von Bedeutung ist müssen allerdings zukünftige Studien erst noch bestätigen, bereits heute bekannt sind aber regulatorische Einflüsse von CK2 auf den Nukleolus (Louvet et al., 2006).

Eine wichtige Frage zukünftiger Experimente gilt auch der möglichen Bedeutung einer pathologischen Fehlregulation phosphoSIM-abhängiger zellulärer Prozesse. Die Überexpression von CK2 wurde in verschiedenen humanen Tumoren, wie Brust-, Nieren- und Lungentumoren nachgewiesen. Dabei unterstützt CK2 die Tumorbildung in Kooperation mit der Überexpression von Onkogenen oder dem Fehlen von Tumorsuppressoren. Auf molekularer Ebene erreicht CK2 diese Effekte in einigen Fällen durch eine veränderte Aktivität von Tumorsuppressoren. CK2 kann aber auch die Stabilität von Tumorsuppressoren wie PML und PTEN beeinflussen (Scaglioni et al., 2006; Torres und Pulido, 2001). In PML verläuft eine CK2-vermittelte Degradation über die Phosphorylierung des Serins 517. Dieser Rest ist Bestandteil des phosphoSIMs-Moduls, scheint aber im Gegensatz zu den Serinen 512-14 nur einen geringeren Einfluss auf die Bindung an SUMO zu haben. Inwiefern eine nicht-kovalente Interaktion zwischen SUMO und dem phosphoSIM-Modul von PML aber Bestandteil der CK2-vermittelten Degradation ist, muß in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Zusätzlich befinden sich mit Daxx, HIPK2 und Topors weitere Tumor-assoziierte Faktoren unter den bisher bekannten phosphoSIM-Proteinen (Abb. 27).

Insgesamt ist es reizvoll darüber zu spekulieren, wie der CK2-Signalweg und das phosphoSIM-Modul zusammen in Krebserkrankungen involviert sind.

# 5 Material und Methoden

## 5.1 Computeranalysen

Datenbanksuchen wurden mit Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Zur Recherche von Phosphorylierungen wurde die Datenbank Phosida (<http://www.phosida.com>) verwendet. Das Programmpaket DNA Star (DNA Star Inc.) wurde zum Erstellen von DNA-Restriktionskarten, zum Auswerten von DNA-Sequenzierungen und für Vergleiche von DNA- und Proteinsequenzen benutzt. Western Blots wurden entweder über die Digitalisierung von Filmen mit einem Scanner (AGFA Arcus II) oder direkt mit einer Kamera (LAS-3000, Fuji) digitalisiert und mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) bearbeitet. Die Detektion von mit  $^{32}\text{P}$ -Phosphat markierten Proteinen erfolgte mit einem Phosphoimager (BAS-2500, Fuji). Die Quantifizierung dieser Signale geschah durch die Quantifizierungssoftware ImageGauge 4.23 (Fuji). Texte, Tabellen und Abbildungen wurden mit dem Microsoft Office Paket (Microsoft Corp.) erstellt.

## 5.2 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 und PerkinElmer. In Insektenzellen rekombinant synthetisiertes CK2 $\alpha$  und  $\beta$  stammte von der Firma NEB.

## Material und Methoden

### 5.3 Mikrobiologische Methoden

#### 5.3.1 Methoden für *E. coli*

##### 5.3.1.1 Verwendete *E. coli* Stämme

SURE	e14 <sup>-</sup> (McrA <sup>-</sup> ) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan <sup>r</sup> ) uvrC [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )].
XL-10 Gold	Tet <sup>r</sup> Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZDM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ].
BL21pLys	<i>E. coli</i> B F- ompT hsdS(rB- mB-) dcm EndA Hte [argU ileY leuW Cam <sup>r</sup> ]
TG1	supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5 (rK- mK-) [F' traD36 proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15]

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

Flüssigkulturen der Bakterien wurden in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, sterilisiert durch Autoklavieren) bei 37°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. LB-Agarplatten (LB-Medium mit 1,5% Agar) wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert. Zur Selektion von transformierten Bakterien wurden den Medien entsprechende Antibiotika in einer Konzentration von 50µg/ml (Ampicillin), 30µg/ml (Kanamycin) bzw. 34µg/ml (Chloramphenicol) zugefügt. Eine Bestimmung der Kulturdichte erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600nm (OD<sub>600</sub>). Sowohl Flüssigkulturen als auch Agarplatten wurden kurzfristig bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt. Für eine langfristige Lagerung wurden stationäre Flüssigkulturen mit einer Endkonzentration von 17% Glycerin bei -80°C eingefroren.

## Material und Methoden

### 5.3.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Für Transformation und Amplifikation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurden chemisch-kompetente SURE Zellen verwendet. Dazu wurde eine Flüssigkultur mit einer frisch auf eine Agarplatte ausgestrichenen Einzelkolonie beimpft und über Nacht inkubiert (Dagert und Ehrlich, 1979). Mit 2ml dieser Übernachtskultur wurden 500ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Nach 10-minütigem Abkühlen der Kultur in Eiswasser wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Für alle weiteren Schritte wurden vorgekühlte Materialien und eiskalte sterile Lösungen verwendet. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 40ml 100mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 80ml 100mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Eine Resuspendierung der Zellen in 4ml 100mM CaCl<sub>2</sub> und 15% Glycerin erfolgte nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis und einer erneuten Zentrifugation (1000g, 5min). 100µl Aliquots dieser Suspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 5.3.1.4 Herstellung „ultra-kompetenter“ *E. coli* Zellen

Für die Transformation von Plasmiden aus einer zielgerichteten Punktmutagenese wurden nach dem *Inoue* Protokoll hergestellte XL10-Gold Zellen verwendet (Sambrook und Russel, 2001). Eine frisch ausgestrichene Einzelkolonie wurde in einer 25ml SOB-Medium Flüssigkultur (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl und 2,5mM KCl, sterilisiert durch Autoklavieren, kurz vor Gebrauch MgCl<sub>2</sub> auf 10mM zugegeben) angesetzt und 6-8h bei 37°C geschüttelt. Mit 2,5ml dieser Übernachtskultur wurden 250ml SOB-Medium angeimpft und bei 18°C erfolgte ein Wachstum bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,55. Nach Abkühlen der Kultur in Eiswasser für 10min wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10min bei 2500g und 4°C sedimentiert. Für alle weiteren Schritte wurden vorgekühlte Materialien und eiskalte sterile Lösungen verwendet. Nach dem vollständigen Entfernen des Mediums wurden die Zellen vorsichtig in 80ml *Inoue* Transformationspuffer (10mM PIPES [pH 6,7], 250mM KCl, 55mM MnCl<sub>2</sub> und 15mM CaCl<sub>2</sub>) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Die

## Material und Methoden

sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in 20ml *Inoue* Transformationspuffer resorbiert und nach Zugabe von 1,5ml DMSO 10min auf Eis inkubiert. 100µl Aliquots dieser Suspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 5.3.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in bakterielle Zellen

Kurz vor der Transformation wurden die kompetenten *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. Für die Transformation von chemisch-kompetenten oder ultra-kompetenten Zellen wurden ca. 100 bis 500ng Plasmid-DNA bzw. 2µl eines Ligationsansatzes mit 50µl der kompetenten Zellen vermischt und die Suspension in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 20min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60sec bei 42°C und einer anschließenden Inkubation für 5min auf Eis wurde 1ml LB-Medium zugegeben und 5min (bzw. 1h bei der Verwendung von Kanamycin und Chloramphenicol) bei 37°C geschüttelt. Transformierte Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C gelagert.

### 5.3.2 Methoden für *S. cerevisiae*

#### 5.3.2.1 Verwendeter *S. cerevisiae* Stamm

PJ69-7a (James et al., 1996)

#### 5.3.2.2 Verwendete *S. cerevisiae* Vektoren

pACT2 Clontech  
pGAD-C1 (James et al., 1996)  
pGBD-C1 (James et al., 1996)  
pFBT9 modifizierter pGBT9 Vektor, in der die Ampicillin- durch eine Kanamycinkassette ersetzt wurde (Bartel et al., 1993)

## Material und Methoden

### 5.3.2.3 Kultivierung und Lagerung von *S. cerevisiae* Zellen

Frisch auf Platten (SC-Medium, 2% Agarose) ausgestrichene Kolonien von *S. cerevisiae* wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet und bei 30°C für 16h in SC-Medium (2% Glukose, 0,67% Hefe-Stickstoffbasis, 0,2% *drop out* Mix) inkubiert. Die Platte ist für einen Zeitraum von bis zu zehn Wochen bei 4°C lagerbar. Zur Bestimmung der Zellzahl von Hefen wurde eine photometrische Messung genutzt, so dass über die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) die Zellzahl bestimmt werden konnte (OD<sub>600</sub> = 1 entspricht etwa 1,5x10<sup>7</sup> Zellen/ml).

### 5.3.2.4 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Aus einer Übernachtskultur wurden Hefezellen in 400ml SC-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt und anschließend bei 30°C zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 1,0 kultiviert. Durch Zentrifugation und Behandlung mit sterilem Wasser und SORB (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl [pH 8,0], 1mM EDTA [pH 8,0], 1M Sorbitol, steril filtriert) wurden die Zellen geerntet, gewaschen und dann in 3ml SORB resuspendiert. Nach Zugabe von denaturierter Lachssperma-DNA (1µg/µl Endkonzentration) wurden die Hefezellen in 100µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### 5.3.2.5 Transformation vektorieller DNA in *S. cerevisiae*

Zur Transformation von Hefezellen wurden 15µl kompetente Hefen und 0,3µg Plasmid-DNA vermischt. Die Suspension wurde in einem sechsfachen Volumen von PEG (100mM LiOAc, 10mM Tris-HCl [pH 8,0], 1mM EDTA [pH 8,0], 40% PEG-3350, steril filtriert) aufgenommen und bei RT für 30min inkubiert. DMSO wurde anschließend zu einer Endkonzentration von 10% zugegeben und der Ansatz für 15min bei 42°C inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen

## Material und Methoden

sedimentiert und dann in 100 $\mu$ l Wasser aufgenommen und auf Selektionsplatten (SC-Medium ohne Leu und Trp) ausgestrichen.

### 5.3.2.6 Analyse von Protein/Protein-Interaktionen mittels des Hefe *two-hybrid*-Systems

Einige der zu untersuchenden Protein/Protein-Interaktionen wurden mittels des gerichteten Hefe *two-hybrid*-Systems durchgeführt (Chien et al., 1991; Fields und Song, 1989 ). Dafür wurden die cDNAs der zu untersuchenden Proteine N-terminal mit der DNA-Binde- bzw. der Aktivierungsdomäne von GAL4 fusioniert und beide Fusionskonstrukte zusammen im *S. cerevisiae* Stamm PJ69-7a exprimiert. Bei einer Interaktion der beiden getesteten Proteine wird die Aktivität des GAL4-Transkriptionsfaktors rekonstituiert und das Reporterogen HIS3 aktiviert. Dadurch sind die entsprechenden Hefezellen in der Lage Histidin eigenständig zu synthetisieren und befähigt auf Platten mit einem Selektionsmedium ohne Histidin zu wachsen. Zu diesem Zweck wurden stationäre Hefekulturen in sterilem Wasser auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt, jeweils 5 $\mu$ l dieser Verdünnung auf Platten mit Selektionsmedium getüpfelt, und drei bis fünf Tage bei 30°C inkubiert. Eine Kontrolle für gleiche Zellzahlen erfolgte auf einer Platte ohne Selektionsmedium.

### 5.3.2.7 Proteinbestimmung aus *S. cerevisiae* Extrakten

Eine Übernachtskultur wurde zum Animpfen von 5ml Flüssigmedium benutzt. Zu Beginn lag die OD<sub>600</sub> bei 0,1. Die Zellen wurden für 7-8h kultiviert und dann die Menge von OD<sub>600</sub>=1 entnommen. Nach einer Zentrifugation wurden die Hefen in 150 $\mu$ l Wasser resuspendiert und ihnen 150 $\mu$ l 2M NaOH, 7,5% Methanol zugefügt. Der Ansatz wurde 15min auf Eis gekühlt und anschließend mit 150 $\mu$ l 55% TCA vermischt. Nach einer weiteren Kühlung von 10min auf Eis erfolgten zwei Zentrifugationschritte nach denen der Überstand verworfen wurde.

## Material und Methoden

Zum Schluss wurde das trockene Pellet in 50µl HU-Puffer (8M Harnstoff, 5% SDS, 1mM EDTA, Bromphenolblau, 1,5% DTT, 200mM Tris/HCl [pH 6,8]) aufgenommen und für 10min bei 65°C aufgeköcht.

### 5.4 Zellbiologische Methoden

#### 5.4.1 Verwendete Zelllinien

HEK293T	mit SV40 large T Antigen und adenoviralen Genen transformierte Nieren-Epithelzelllinie
HeLa	humane Zervix-Adenokarzinomzelllinie
C33a	humane Zervixkarzinomzelllinie

#### 5.4.2 Expressionsvektoren für Säugetierzellen

pCI	Promega
pcDNA3.1(-)	Invitrogen
pBind	Promega
pRC	Invitrogen
pSG5	Stratagene
pEGFP	Clontech
pGAL4	Promega

#### 5.4.3 Kultivierung von Säugetierzellen

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturschalen bei 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub> und 96% Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium, Gibco BRL) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (Biochrom), 100U/ml Penicillin und 100U/ml Streptomycin (PAA) ergänzt. Zum Lösen der Zellen von der Zellkulturschale wurde das Medium verworfen und die Zellen

## Material und Methoden

einmal mit sterilem PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, [pH7,4], sterilisiert durch Autoklavieren) gewaschen. Anschließend wurden 2,5ml Trypsin/EDTA Lösung (PAA) pro 150cm<sup>2</sup> Kulturschale zugegeben und für ca. 5min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 10ml Medium resuspendiert und für 3min bei 400g bei RT abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in frischem DMEM aufgenommen und je nach Bedarf zur weiteren Kultivierung 1:5 bis 1:10 verdünnt oder für Experimente mit definierter Zellzahl in Kulturschalen ausgesät. Die Analyse der Zellzahl erfolgte hierfür mittels eines Z2<sup>TM</sup> Coulter Counters (Beckman-Coulter).

### 5.4.4 Lagerung von Säugetierzellen

Zur Langzeitlagerung wurden Säugerzellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden wachsende Zellen bei ca. 80%iger Konfluenz wie oben beschrieben abgeerntet, in Einfriermedium (10% DMSO in FCS) resuspendiert und die Zellsuspension aliquotiert. Die Zellen wurden sofort in einem Isopropanol-gefüllten Einfriergefäß (Nalgene) bei -80°C langsam eingefroren. Nach ein bis zwei Tagen konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -180°C endgelagert werden.

### 5.4.5 Transfektion von vektorieller DNA in Säugetierzellen

C33a und HEK293T Zellen wurden mittels der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Hierfür wurden 5x10<sup>5</sup> Zellen pro 10cm<sup>2</sup> Kulturschalenfläche in einer 10cm-Schale oder einer 6-Loch Platte ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Für einen zehnfachen Transfektionsansatz wurden in einem 2ml Eppendorfgefäß 12µg Plasmid-DNA mit Wasser auf 450µl aufgefüllt und mit 50µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> Lösung gemischt. Dann wurden 500µl 2xHBS Lösung (16,012g NaCl, 0,744g KCl, 9,532g HEPES und 0,248g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pro Liter, auf pH 7,05 eingestellt) langsam tropfenweise zugegeben, kurz durch Schütteln gemischt und 20min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde nach kurzem Mischen

## Material und Methoden

tropfenweise gleichmäßig zum Medium der vorbereiteten Zellen gegeben und diese für 6h im Brutschrank inkubiert. Nach Wechseln des Mediums wurden die Zellen zur Expression der cDNAs für weitere 36-48h inkubiert.

HeLa Zellen wurden mit dem kommerziellen Transfektionsreagenz FuGENE HD (Roche) gemäß dem Herstellerprotokoll transfiziert. Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion  $3 \times 10^5$  Zellen pro  $10 \text{cm}^2$  Kulturschalenfläche in einer  $10 \text{cm}$ -Schale oder einer 6-Loch Platte ausgesät. Für die Transfektion von Zellen in einer 6-Loch Schale wurden  $2 \mu\text{g}$  DNA in  $100 \mu\text{l}$  Opti-MEM (Gibco BRL) verdünnt und mit  $5 \mu\text{l}$  FuGENE HD versetzt. Nach einer Inkubation von 15min wurde die Transfektionslösung tropfenweise zu ausgesäten Zellen gegeben und diese dann zur Expression des Plasmids 48 bis 72h inkubiert.

### 5.4.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden HeLa Zellen in 6-Loch Platten auf sterilen Deckgläschen ausgesät und wie im jeweiligen Experiment angegeben transfiziert. Nach 48h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen in PBS mit 3,7% Paraformaldehyd für 10min bei RT. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T (0,05% Tween-20 in PBS) wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5% Triton X-100 in PBS für 10min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS-T gewaschen bevor die Zugabe der primären Antikörper in PBS für 1h bei RT erfolgte. Dabei wurden monoklonale Antikörper in der Regel 1:500 und polyklonale Antikörper 1:200 verdünnt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Zugabe der sekundären Antikörper für 1h bei RT. Das anti-Maus-FITC-Konjugat (Vector Laboratories) bzw. das anti-Kaninchen-Cy3-Konjugat (Jackson) wurden zu diesem Zweck 1:200 in PBS verdünnt. Im Anschluss daran wurden Zellkerne durch eine Inkubation von 2min bei RT mit  $50 \mu\text{g/ml}$  4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI, Merck) in PBS angefärbt und fünfmal mit PBS-T gewaschen bevor die Deckgläschen auf Objektträger mit *mounting medium* (0,5% Paraphenyldiamin in 20mM Tris/HCl

## Material und Methoden

[pH 9,0], 90% Glycerin) gelegt und mit Nagellack versiegelt wurden. Die Präparate wurden anschließend anhand eines Zeiss AX10-Mikroskops (Zeiss), das mit einem 63xÖl-Immersionsobjektiv und einer CCD-Kamera ausgestattet ist, und über die Bildgebungssoftware Spot 4.5 (Diagnostic Instruments, Inc.) visualisiert.

### 5.5 Molekularbiologische Methoden

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

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach der Vorschrift der Firma Qiagen im Miniprep- und Maxiprep-Maßstab durchgeführt. Diese Präparation entspricht einer modifizierten Methode nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). Nach alkalischem Zellaufschluss wird durch Neutralisation ein Komplex aus chromosomaler DNA, Zelltrümmern und Proteinen gefällt und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA über eine Silicasäule mittels eines Salzgradienten gereinigt und anschließend eluiert.

#### 5.5.2 Restriktionsverdau von DNA

Zur Spaltung von DNA wurden Typ-II-Restriktionsendonukleasen verwendet. Zur Zusammensetzung des Restriktionsansatzes wurde davon ausgegangen, dass 1µg DNA von 1U Enzym in 3h vollständig gespalten wird (Sambrook et al., 1989). Je nach gewünschter DNA-Menge wurde die katalytische Aktivität angepasst. Analytische Ansätze hatten ein Endvolumen von 10µl, präparative ein Endvolumen von 50µl. Die Inkubationstemperatur richtete sich nach der vom Hersteller (NEB) für das jeweilige Enzym empfohlenen Temperatur, ebenso wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffersysteme benutzt.

## Material und Methoden

### 5.5.3 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung einer intramolekularen Religation des geschnittenen Vektors während der Ligationsreaktion wurden nach dem Restriktionsverdau die 5'-Phosphatgruppen des geschnittenen Vektors hydrolytisch abgespalten. Dadurch kann die Vektor-Insert-Ligation relativ zur intramolekularen Religation erhöht werden.

Dazu wurden entsprechend der eingesetzten DNA-Menge direkt nach dem Restriktionsverdau 1 bis 2U *calf intestinal phosphatase* (CIP) in den Restriktionsansatz gegeben und für weitere 30min bei 37°C inkubiert.

### 5.5.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA für analytische und präparative Isolierungen erfolgte in Gelen mit 1-2% (w/v) Agarose in 1xTAE-Puffer (40mM Tris-Cl, 0,1% Essigsäure, 1mM EDTA, pH 8,3). Die Agarose wurde in einem Mikrowellengerät aufgeköcht, mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Flachgelkammer mit Kamm für die Geltaschen gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/6Vol sechsfachen DNA-Probenpuffer (15% Glycerol, 0,25% OrangeG) versetzt und bei einer Spannung von 90V mit 1xTAE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 324nm auf einem UV-Illuminator (IDA) sichtbar gemacht und fotografiert bzw. ausgeschnitten. Durch das Auftragen eines Größenmarkers (1kb DNA-Ladder, Invitrogen) konnte die Größe der DNA-Fragmente ermittelt werden.

### 5.5.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Ligation von PCR-Produkten oder hydrolytisch gespaltenen Vektoren wurden diese mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN) aufgearbeitet. Die Reinigung erfolgte dabei durch Fällung der DNA unter chaotropen

## Material und Methoden

Hochsalzbedingungen am Silicagel. Dabei verändern die Salze die Struktur des Wassers und die DNA präzipitiert durch den Entzug der Wassermoleküle an der Geloberfläche. Die an die Matrix gebundene DNA wurde mit einer ethanolischen Lösung gewaschen und anschließend mit entionisiertem Wasser eluiert.

### 5.5.6 Ligation von DNA

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA wurde die T4-DNA-Ligase nach Herstellerprotokoll (NEB) verwendet. Dieses Enzym katalysiert die Verknüpfung von 3'-Hydroxylgruppen mit 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA, wobei unter ATP-Verbrauch eine neue Phosphodiesterbindung gebildet wird.

### 5.5.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion verwendet. Dabei wurde die DNA-Polymerase *Pfu-Turbo* (Stratagene) benutzt und das Herstellerprotokoll beachtet. Die Annealingtemperatur ( $T_M$ ) der Primer an die Template-DNA wurde nach folgender Formel berechnet, wobei nicht paarende Basen des Primers (Überhänge, eingefügte Restriktionsschnittstellen) nicht berücksichtigt wurden:

$$T_M \text{ (in } ^\circ\text{C)} = (\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl A} + \text{Anzahl T}) \times 2^\circ\text{C}$$

Die Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes war wie folgt:

10xcloned Pfu DNA-Polymerase Reaktionpuffer	5 $\mu$ l
dNTP-Mix (10mM).....	1 $\mu$ l
5'-Primer (10 $\mu$ M).....	2 $\mu$ l
3'-Primer (10 $\mu$ M).....	2 $\mu$ l
<i>Pfu-Turbo</i> DNA-Polymerase (2U/ $\mu$ l).....	1 $\mu$ l
Matrizen-DNA.....	50ng
ddH <sub>2</sub> O .....	ad 50 $\mu$ l

## Material und Methoden

Standardmäßig wurde folgendes Programm in einem Tpersonal Thermocycler (Biometra) verwendet:

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

### 5.5.8 Sequenzieren von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden mit einem ABI 3730 48-Kapillar Sequenzierer (Perkin Elmer) in der Core-Facility des Max-Planck-Institutes für Biochemie durchgeführt. Die Sequenzierreaktion sowie die nachfolgende Probenaufbereitung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem ABI BigDye Kit Version 3.1 (Applied Biosystems). Ein Sequenzieransatz enthielt 0,5µg Plasmid-DNA und 10pmol Primer.

### 5.5.9 Zielgerichtete Punktmutagenese vektorieller DNA

Für einzelne 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 jeweils im Zentrum eine Punktmutation gegenüber der Zielsequenz aufwiesen. Für die Reaktion wurden Ansätze von 50µl verwendet (5µl Pfu Puffer (Stratagene), je 125ng Primer, 1µl dNTPs (10mM), 1µl Pfu Turbo (Stratagene), 50ng Plasmid-DNA, 3µl Quick Solution), und im Thermocycler unter folgenden Bedingungen inkubiert:

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

## Material und Methoden

Bei der Reaktion wird das gesamte Plasmid amplifiziert. Um die Plasmid-DNA der Matrize zu entfernen wurde 1h mit Dpn I, einer Restriktionsendonuklease, die spezifisch die methylierte Matrize schneidet, bei 37°C verdaut. Anschließend wurden 2µl des Ansatzes direkt in *E. coli* XL10 Gold transformiert. Über Sequenzierung wurden die eingefügten Mutationen verifiziert.

### 5.5.10 Verwendete Plasmidkonstrukte

Plasmid	Herkunft
pGex-SUMO1	S. Müller, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany
pGex-SUMO2	diese Arbeit
pGex-PIAS1 <sup>WT</sup> -6xHis	A. Ledl, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany
pGex-PIAS1 <sup>VI459/60AA</sup> -6xHis	A. Ledl, siehe oben
pGex	GE Healthcare
pGex-PIAS1 <sup>S466A</sup> -6xHis	diese Arbeit
pGex-PIAS1 <sup>S466/778A</sup> -6xHis	diese Arbeit
pGex-pSIM <sup>WT</sup>	diese Arbeit
pGex-pSIM <sup>VI459/60AA</sup>	diese Arbeit
pGex-pSIM <sup>S466/778A</sup>	diese Arbeit
pGex-pSIM <sup>S466/778D</sup>	diese Arbeit
pT7-SBP2-SUMO2	diese Arbeit
pGex-PML <sup>WT</sup> -6xHis	A. Ledl, siehe oben
pGex-PML <sup>VI510/11AA</sup> -6xHis	A. Ledl, siehe oben
pGex-PMSC1 <sup>WT</sup>	diese Arbeit
pGex-PMSC1 <sup>111406/7AA</sup>	diese Arbeit
pGex-PML <sup>S512-4,7A</sup> -6xHis	diese Arbeit
pGex-PMSC1 <sup>4xTS-AA</sup>	diese Arbeit
pGex-PMSC1 <sup>4xTS-AA,S409/11A</sup>	diese Arbeit
pCI-Flag-PIAS1 <sup>WT</sup>	D. Schmidt, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany
pCI-Flag-PIAS1 <sup>VI459/60AA</sup>	diese Arbeit
pCI-Flag-PIAS1 <sup>S466/778A</sup>	diese Arbeit
pCI-Flag-PIAS1 <sup>S466/778D</sup>	diese Arbeit
pcDNA3-HA-CK2 $\alpha$	diese Arbeit
pcDNA3-HA-CK2 $\beta$	diese Arbeit
pCI-Flag-SUMO1 <sup>GA</sup>	diese Arbeit

## Material und Methoden

pCI-Flag-SUMO2 <sup>GA</sup>	diese Arbeit
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3-HA-PIAS1 <sup>WT</sup>	J. Rech, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany
pcDNA3-HA-PIAS1 <sup>VI459/60AA</sup>	diese Arbeit
pcDNA3-HA-PIAS1 <sup>S466/7/8A</sup>	diese Arbeit
pcDNA3-HA-PIAS1 <sup>S466/7/8D</sup>	diese Arbeit
pcDNA3-HA-SUMO1	S. Müller, siehe oben
pBind	Promega
pcDNA3-SUMO1-His	S. Müller, siehe oben
pRC-p53	Y. Haupt, Department of Immunology, Lautenberg Center, The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel
pBind-PIAS1 <sup>WT</sup>	D. Schmidt, siehe oben
pBind-PIAS1 <sup>VI459/60AA</sup>	A. Ledl, siehe oben
pBind-PIAS1 <sup>S466/7/8A</sup>	diese Arbeit
pBind-PIAS2 <sup>WT</sup>	D. Schmidt, siehe oben
pBind-PIAS2 <sup>VI469/70AA</sup>	A. Ledl, siehe oben
pBind-PIAS2 <sup>S476/7/8A</sup>	diese Arbeit
pBind-PIAS3 <sup>WT</sup>	A. Ledl, siehe oben
pBind-PIAS3 <sup>VI438/9AA</sup>	A. Ledl, siehe oben
pBind-PIAS3 <sup>S445/6/7A</sup>	diese Arbeit
pRGC-p53re-luciferase	M. Oren, Department of Molecular Cell Biology, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel
pRGC-p53re(mut)-luciferase	M. Oren, siehe oben
pCI-Flag-PIAS2 <sup>WT</sup>	D. Schmidt, siehe oben
pCI-Flag-PIAS2 <sup>VI469/70AA</sup>	A. Ledl, siehe oben
pCI-Flag-PIAS2 <sup>S476/7/8A</sup>	diese Arbeit
pSG5-PML <sup>WT</sup>	S. Müller, siehe oben
pSG5-PML <sup>VI510/11AA</sup>	A. Ledl, siehe oben
pSG5-PML <sup>S517A</sup>	diese Arbeit
pSG5-PML <sup>S517D</sup>	diese Arbeit
pEGFP-C1-PMSCL1 <sup>WT</sup>	GJM. Pruijn, Department of Biomolecular Chemistry, Radboud University Nijmegen, NL-6500 HB Nijmegen, The Netherlands
pEGFP-C1-PMSCL1 <sup>I1406/7AA</sup>	diese Arbeit
pEGFP-C1-PMSCL1 <sup>S409/11A</sup>	diese Arbeit
pEGFP-C1-PMSCL1 <sup>S409/11D</sup>	diese Arbeit
pGAL4-TK-luc	S. Souchelnytskyi, Department of Oncology-Pathology, Karolinska Biomics Center, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital, Solna, SE-17176, Stockholm, Sweden
pGAL4-SV40-luc	S. Souchelnytskyi, siehe oben

## Material und Methoden

pFBT9-SUMO1 <sup>WT</sup>	U. Klein, Department Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany
pFBT9-SUMO1 <sup>GA</sup>	M. Haindl, Department of Molecular Cell Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany
pFBT9-SUMO2 <sup>WT</sup>	U. Klein, siehe oben
pFBT9-SUMO2 <sup>GA</sup>	M. Haindl, siehe oben
pFBT9	Clontech
pGAD-PIAS1 <sup>WT</sup>	D. Schmidt, siehe oben
pGAD-PIAS1 <sup>VI459/60AA</sup>	A. Ledl, siehe oben
pGAD-PIAS2 <sup>WT</sup>	D. Schmidt, siehe oben
pGAD-PIAS2 <sup>VI469/70AA</sup>	A. Ledl, siehe oben
pGAD-PIAS1 <sup>S466/7/8A</sup>	diese Arbeit
pGAD-PIAS1 <sup>S466/7/8D</sup>	diese Arbeit
pGAD-PIAS1 <sup>S466/7/8K</sup>	diese Arbeit
pGAD-PIAS1 <sup>S466/7/8R</sup>	diese Arbeit
pGAD-PIAS2 <sup>S476/7/8A</sup>	diese Arbeit
pGAD-PML <sup>WT</sup>	A. Ledl, siehe oben
pGAD-PML <sup>VI510/11AA</sup>	A. Ledl, siehe oben
pGAD-PML <sup>S517A</sup>	diese Arbeit
pGAD-PML <sup>S512-4A</sup>	diese Arbeit
pGAD-PML <sup>S512-4,7A</sup>	diese Arbeit
pGBD-(s)PMSCL1 <sup>WT</sup>	diese Arbeit
pGBD-(s)PMSCL1 <sup>II406/7AA</sup>	diese Arbeit
pGBD-(s)PMSCL1 <sup>S409/11A</sup>	diese Arbeit
pACT2-SUMO1	U. Klein, siehe oben
pFBT9-SUMO1 <sup>K37A</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO1 <sup>K39A</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO1 <sup>K45/46A</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO1 <sup>K37D</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO1 <sup>K39D</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO1 <sup>K45/46D</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO2 <sup>K33A</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO2 <sup>K35A</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO2 <sup>K42A</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO2 <sup>K33D</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO2 <sup>K35D</sup>	diese Arbeit
pFBT9-SUMO2 <sup>K42D</sup>	diese Arbeit

### 5.6 Proteinbiochemische Methoden

#### 5.6.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese diente zur qualitativen Proteinanalyse und wurde nach der Vorschrift von Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Als Elektrophoresekammern wurden Gelapparaturen aus der technischen Werkstatt des Max-Planck-Instituts für Biochemie benutzt. Die Dimensionen der Gele betragen  $105 \times 93 \times 2 \text{ mm}^3$ . Die Lösungskomponenten für ein 10%iges Trenngel (10% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 390mM Tris [pH 8,8], 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,2% APS) wurden bis auf TEMED und APS zusammengegeben und durchmischt. Nach Zugabe des Radikalstarters APS und des Polymerisationskatalysators TEMED wurde zunächst das flüssige Trenngel in eine Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde der Alkohol gründlich getrocknet. Nach anschließender Überschichtung mit einem 5%igem Sammelgel (5% Acrylamid/Bisacrylamid [29:1], 125mM Tris [pH 6,8], 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,2% APS) wurden über einen Probenkamm die Probenfächer erzeugt. Das vollständig auspolymerisierte Gel wurde mit Laufpuffer (50mM Tris, 384mM Glycin, 0,1% SDS) überschichtet und die Probenfächer nach Entfernen des Kamms kurz ausgespült.

Anschließend konnten die mit SDS-Probenpuffer (62,5mM Tris [pH 6,8], 10% Glycerin, 2% SDS, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau) vorbereiteten Proben in die Fächer pipettiert werden. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25mA durchgeführt. Zur späteren Zuordnung der Banden zu einem bestimmten Molekulargewicht wurde stets ein Größenstandard (Precision Prestained Plus Protein Standard, Biorad) mit aufgetragen.

## Material und Methoden

### 5.6.2 Coomassie Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Proteine wurden nach erfolgter Elektrophorese mit PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) angefärbt. Das Gel wird dazu 2h bei RT in der Färbelösung geschwenkt und anschließend durch wiederholtes Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt (Bennet und Scott, 1971).

### 5.6.3 Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran

Proteine wurden unmittelbar nach der Elektrophorese in einer hausgefertigten Semidryblot-Apparatur auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C Extra, Amersham) überführt. Hierzu wurden drei Whatman-Papiere in Gelgröße in Transferpuffer (250mM Tris, 1,92M Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol) getränkt und mit der in Wasser äquilibrierten und anschließend ebenfalls in Transferpuffer getränkten Membran, dem in Transferpuffer getränkten Gel und wiederum drei getränkten Whatman-Papieren überschichtet. Zum Entfernen von Luftblasen wurde einige Male mit einer Glaspipette über den Aufbau gerollt. Der Transfer erfolgte 1,5h bei einer konstanten Stromstärke von 400mA.

### 5.6.4 Western Blot

Zur Besetzung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran mit den immobilisierten Proteinen über Nacht bei 4°C in Blocking-Puffer (Tropix) geschwenkt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte 1h bei RT in PBS 0,1% Tween (PBS-T). Die Membran wurde dreimal für 10min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit einem sekundären, alkalische Phosphatase (AP)-markiertem Antikörper in Blocking-Puffer für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T erfolgte ein zweimaliger Waschschrift von je 5min mit Assay-Puffer (20mM Tris/HCl [pH 9,8], 1mM MgCl<sub>2</sub>)

## Material und Methoden

und anschließend die Detektion mittels Chemolumineszenz (CDP-Star Western Kit, Tropix) nach Herstellerangaben auf einem ECL-Hyperfilm (Amersham).

### 5.6.5 Lyse und Präparation von Zelllysaten

Zelllysate aus Säugetierzellen, die direkt über SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden sollten, wurden nach einmaligem Waschen mit PBS durch direkte Zugabe von SDS-Probenpuffer (400µl/10cm<sup>2</sup>) lysiert. *E. coli* Zellen wurden für SDS-PAGE-Analysen zentrifugiert, der Überstand verworfen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Lysate wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 10min bei 95°C aufgeköcht.

### 5.6.6 Verwendete Antikörper

Monoklonale Antikörper:

anti-HA	(Klon 16B12, Covance)
anti-Flag	(Klon M2, Sigma-Aldrich)
anti-Phosphoserine	(Klon 16B4, Calbiochem)
anti-PIAS1	(Klon ZP008, Zymed)
anti-E1B	(Klon 2A6, zur Verfügung gestellt von Thomas Dobner)
anti-p53	(Klon DO-1, Santa Cruz)
anti-GAL4-DBD	(Klon RK5C1, Clontech)
anti-GAL4-AD	(Klon C-10, Clontech)
anti-F	(Klon ERF3, Euromedex)

Polyklonale Antikörper:

anti-PML	(Kaninchen, zur Verfügung gestellt von Anne Dejean)
anti-GFP	(Kaninchen, Invitrogen)

## Material und Methoden

### 5.6.7 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation wurden spezifisch Proteine aus einem Zellextrakt isoliert. Dafür wurden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen in Immunpräzipitationspuffer (10mM HEPES [pH 7,3], 150mM NaCl, 0,05% NP-40, 0,5mM DTT, 10mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 100 $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10mM NEM, *complete* [Roche]) lysiert und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (12min bei 4°C, 16000g) entfernt. Der Überstand wurde mit 20 $\mu$ l anti-Flag M2 Agarose-Matrix (Sigma) versehen. Die Bindung erfolgte 2h bei 4°C auf dem Rad. Anschließend wurden die Agarosekügelchen dreimal in IP-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde dann möglichst vollständig abgenommen. Zur Elution der Proteine wurden die Kügelchen mit 20 $\mu$ l zweifach SDS-Probenpuffer versehen und aufgekocht. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und die Immunpräzipitation bzw. Koimmunpräzipitation im Western Blot nachgewiesen.

### 5.6.8 Denaturierende Anreicherung von *in vivo* SUMO-Substraten

HeLa oder HEK293T Zellen wurden mit dem jeweiligen SUMO-Zielprotein und einer His-Epitop markierten SUMO-Version transfiziert und die modifizierten Proteine über Ni-NTA Agarose isoliert. Hierzu wurden die Zellen 48h nach Transfektion mit 1ml Nickel-Lysepuffer (6M Guanidiniumhydrochlorid, 100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM Tris/HCl [pH 8,0]) lysiert und davon 20 $\mu$ l als Input abgenommen und mit 5 $\mu$ l sechsfachen SDS-Probenpuffer aufgekocht. Die restlichen 980 $\mu$ l des Lysats wurden mit 20 $\mu$ l Ni-NTA Agarose *magnetic beads* (QIAGEN) versehen, zur Bindung des His-Epitops ÜN auf einem Rad bei RT inkubiert und anschließend die magnetischen Kügelchen je dreimal mit 800 $\mu$ l Waschpuffer A (8M Harnstoff, 100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM Tris/HCl [pH 8,0]) und B (8M Harnstoff, 100mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM Tris/HCl [pH 6,8]) sowie einmal mit PBS gewaschen und in 20 $\mu$ l zweifachen SDS-Probenpuffer aufgekocht.

## Material und Methoden

### 5.6.9 Anreicherung und Reinigung von GST- und SBP-Fusionsproteinen

GST-PIAS1, GST-PML, GST-PMSC1, GST-SUMO1, GST-SUMO2, GST-pSIM und SBP-SUMO2 wurden rekombinant in *E. coli* BL21 Zellen für 3h nach einer Induktion mit IPTG exprimiert. Nach einer Resuspension in Lysepuffer (für GST-markierte Proteine: PBS, 1% Triton, 1mM DTT, 100 $\mu$ M PMSF bzw. für SBP-markierte Proteine: 300mM KCl, 40mM tris[hydroxymethyl]aminomethan, 5mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2mM EDTA, 0,1% Triton X-100, pH 7,4) wurden die Zellen durch einen Homogenisator (Emulsi-Flex C5) lysiert. Anschließend wurde das Lysat für 3h mit Glutathion-Sepharose 4B (GE/Amersham) bzw. mit Streptavidin-Agarose (Novagen) inkubiert, die Matrix dreimal mit Lysepuffer gewaschen und bei -20°C verwahrt.

### 5.6.10 Bestimmung der Konzentration gelöster Proteine

Die Proteinkonzentration der gereinigten Proteinlösungen wurde mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten der Proteine für eine Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda = 280\text{nm}$  ( $A_{280}$ ) photometrisch bestimmt (Gill und von Hippel, 1989). Die Extinktionskoeffizienten wurden von dem Computerprogramm Protean nach Eingabe der Proteinsequenz berechnet.

### 5.6.11 Bindungsstudien Matrix gekoppelter Proteine

Für *in vitro* GST-Bindungsstudien wurden  $^{35}\text{S}$  markierte, durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellte (TNT quick coupled reticulocyte lysate system Kit, Promega) oder rekombinant exprimierte, gereinigte Proteine eingesetzt. Diese wurden in Bindungspuffer (50mM HEPES [pH 7,0], 120mM NaCl, 0,15% NP-40, 1mM PMSF, 1mM DTT) mit den entsprechenden an Glutathionsepharose gekoppelten GST-Fusionsproteinen für mindestens 3h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Bindungspuffer für 10min wurden

## Material und Methoden

alle Proteine durch Kochen für 10min bei 95°C in 1x SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie bzw. Western Blot analysiert.

### 5.6.12 Identifikation von GST-pSIM-Interaktoren

Bakteriell exprimierte, an eine GST-Matrix gebundene GST-pSIM-Fusionsproteine wurden zusammen mit HEK293T Zellextrakten (10mM HEPES [pH 7,3], 150mM NaCl, 0,05% NP-40, 0,5mM DTT, 10mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 100 $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM NEM, *complete* [Roche]) bei 4°C für 2h inkubiert und dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Nach Zugabe von SDS-Laemmli-Puffer wurden die Proteine über ein Acrylamidgel aufgetrennt und durch eine Coomassie Färbung markiert. Jede aufgetrennte Probe wurde in mehrere Fragmente zerschnitten und mit Trypsin verdaut. Anschließend wurden die aus dem Gel eluierten Peptide in einem Orbitrap LTQ Massenspektrometer (Thermo Electron) untersucht. Die Auswertung erfolgte unter Benutzung des Programmes Mascot.

### 5.6.13 CK2-katalysierte *in vitro* Phosphorylierungen

Bakteriell exprimierte Proteine, die an eine Gluthathion-Sepharose 4B Matrix (GE/Amersham) gebunden waren, wurden mit CK2-Reaktionspuffer (20mM Tris/HCl [pH 7,5], 50mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M ATP, 500 $\mu$ Ci/ $\mu$ mol [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP) gewaschen und anschließend mit 100U gereinigtem CK2 (NEB) in 40 $\mu$ l CK2-Reaktionspuffer oder mit 100 $\mu$ l Zellextrakt (im oben genannten Puffer), für 45min bei 30°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Waschen mit CK2-Reaktionspuffer und Aufkochen in SDS-Laemmli-Puffer gestoppt. Die Proteine wurden auf einem Acrylamidgel aufgetrennt, Coomassie gefärbt und getrocknete Gele wurden mittels Autoradiographie analysiert.

## Material und Methoden

### 5.6.14 *In vitro* Modifikationen mit SUMO

Als Substrate wurden <sup>35</sup>S-markierte, durch *in vitro* Transkription/Translation hergestellte Proteine verwendet. Die Detektion von SUMO-Konjugaten erfolgte über Autoradiographie. Die *in vitro* Modifikation erfolgte in einem 20µl Ansatz mit 1-2µl Translationsprodukt, 100ng E1, 10-100ng Ubc9, 3µg SUMO für 2h bei 30°C. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und entsprechend weiter analysiert.

### 5.6.15 Reporterexperimente

Das Potenzial eines gegebenen Proteins zur Transaktivierung wurde in Reporterexperimenten bestimmt. Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  Zellen mit Transkriptionsfaktor codierenden Plasmiden zusammen mit Reportergenen, die in ihren Promotoren entsprechende Bindungsstellen besitzen, transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde ein Luziferase-Kontrollvektor aus *Renilla reniformis* kotransfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen in 300µl passivem Lysepuffer lysiert, von denen 20µl mit dem Dual Luziferase Reporter Assay (Promega) nach Angaben des Herstellers auf einem Lumat LB 9507 (EG&G Berthold) Luminometer analysiert wurden.

### 6 Literaturverzeichnis

Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D. und Mitchell, P. (1999). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev* 13, 2148-2158.

Aravind, L. und Koonin, E. V. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* 25, 112-114.

Baba, D., Maita, N., Jee, J., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H. und Shirakawa, M. (2006). Crystal structure of SUMO-3-modified thymine-DNA glycosylase. *J Mol Biol* 359, 137-147.

Baba, D., Maita, N., Jee, J. G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H. und Shirakawa, M. (2005). Crystal structure of thymine DNA glycosylase conjugated to SUMO-1. *Nature* 435, 979-982.

Barry, M. und Fruh, K. (2006). Viral modulators of cullin RING ubiquitin ligases: culling the host defense. *Sci STKE* 2006, pe21.

Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. und Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-924.

Bennet, J. und Scott, K. J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem*, 173-182.

Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.

Bernardi, R. und Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 1006-1016.

Best, J. L., Ganiatsas, S., Agarwal, S., Changou, A., Salomoni, P., Shirihai, O., Meluh, P. B., Pandolfi, P. P. und Zon, L. I. (2002). SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. *Mol Cell* 10, 843-855.

Bhaumik, S. R., Smith, E. und Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1008-1016.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.

Brechet, A., Fache, M. P., Brachet, A., Ferracci, G., Baude, A., Irondelle, M., Pereira, S., Leterrier, C. und Dargent, B. (2008). Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *J Cell Biol* 183, 1101-1114.

Brouwer, R., Allmang, C., Raijmakers, R., van Aarssen, Y., Egberts, W. V., Petfalski, E., van Venrooij, W. J., Tollervey, D. und Pruijn, G. J. (2001a). Three novel components of the human exosome. *J Biol Chem* 276, 6177-6184.

Brouwer, R., Pruijn, G. J. und van Venrooij, W. J. (2001b). The human exosome: an autoantigenic complex of exoribonucleases in myositis and scleroderma. *Arthritis Res* 3, 102-106.

## Literaturverzeichnis

Chapman, J. R. und Jackson, S. P. (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep* 9, 795-801.

Cheng, C. H., Lo, Y. H., Liang, S. S., Ti, S. C., Lin, F. M., Yeh, C. H., Huang, H. Y. und Wang, T. F. (2006a). SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 2067-2081.

Cheng, J., Bawa, T., Lee, P., Gong, L. und Yeh, E. T. (2006b). Role of desumoylation in the development of prostate cancer. *Neoplasia* 8, 667-676.

Cheng, J., Kang, X., Zhang, S. und Yeh, E. T. (2007). SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 $\alpha$  during hypoxia. *Cell* 131, 584-595.

Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. und Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9578-9582.

Chiu, S. Y., Asai, N., Costantini, F. und Hsu, W. (2008). SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages. *PLoS Biol* 6, e310.

Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. und Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.

Chupreta, S., Holmstrom, S., Subramanian, L. und Iñiguez-Lluhí, J. (2005). A small conserved surface in SUMO is the critical structural determinant of its transcriptional inhibitory properties. *Mol Cell Biol* 25, 4272-4282.

Dadke, S., Cotteret, S., Yip, S. C., Jaffer, Z. M., Haj, F., Ivanov, A., Rauscher, F., 3rd, Shuai, K., Ng, T., Neel, B. G. und Chernoff, J. (2007). Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. *Nat Cell Biol* 9, 80-85.

Dagert, M. und Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6, 23-28.

Dahlback, B. und Villoutreix, B. O. (2005). The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 579, 3310-3316.

Dawlaty, M. M., Malureanu, L., Jegannathan, K. B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R. und van Deursen, J. M. (2008). Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase II $\alpha$ . *Cell* 133, 103-115.

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. und Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I $\kappa$ B $\alpha$  inhibits NF- $\kappa$ B activation. *Mol Cell* 2, 233-239.

Di Bacco, A., Ouyang, J., Lee, H. Y., Catic, A., Ploegh, H. und Gill, G. (2006). The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division. *Mol Cell Biol* 26, 4489-4498.

Dittmar, G. A., Wilkinson, C. R., Jedrzejewski, P. T. und Finley, D. (2002). Role of a ubiquitin-like modification in polarized morphogenesis. *Science* 295, 2442-2446.

Dobrev, G., Dambacher, J. und Grosschedl, R. (2003). SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes Dev* 17, 3048-3061.

## Literaturverzeichnis

Duncan, J. S. und Litchfield, D. W. (2008). Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim Biophys Acta* 1784, 33-47.

Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de The, H., Hay, R. T. und Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 3), 381-393.

Duval, D., Duval, G., Kedinger, C., Poch, O. und Boeuf, H. (2003). The 'PINIT' motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L. *FEBS Lett* 554, 111-118.

Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R. und Dobner, T. (2001). SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11312-11317.

Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.

Fouraux, M., Bouvet, P., Verkaart, S., van Venrooij, W. und Pruijn, G. (2002). Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* 320, 475-488.

Geiss-Friedlander, R. und Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.

Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 319-326.

Gong, L. und Yeh, E. T. (2006). Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem* 281, 15869-15877.

Groettrup M, Pelzer C, Schmidtke G und K, H. (2008). Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem Sci* 33, 230-237.

Haindl, M., Harasim, T., Eick, D. und Muller, S. (2008). The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO Rep* 9, 273-279.

Haines, N. und Irvine, K. D. (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 786-797.

Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. und Schar, P. (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J* 21, 1456-1464.

Hartmann-Petersen, R. und Gordon, C. (2004). Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol* 15, 247-259.

Hay, R. T. (2007). SUMO-specific proteases: a twist in the tail. *Trends Cell Biol* 17, 370-376.

Hecker, C. M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. und Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281, 16117-16127.

Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.

## Literaturverzeichnis

- Hicke, L., Schubert, H. L. und Hill, C. P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 610-621.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A. und Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 45-50.
- Hipp, M. S., Kalveram, B., Raasi, S., Groettrup, M. und Schmidtke, G. (2005). FAT10, a ubiquitin-independent signal for proteasomal degradation. *Mol Cell Biol* 25, 3483-3491.
- Hirota, M., Kuwata, K., Ohmuraya, M. und Ogawa, M. (2003). From acute to chronic pancreatitis: the role of mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibitor gene. *Jop* 4, 83-88.
- Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Hoeller, D., Hecker, C. M., Wagner, S., Rogov, V., Dotsch, V. und Dikic, I. (2007). E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. *Mol Cell* 26, 891-898.
- Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 30, 183-187.
- Huang, T. T., Wuerzberger-Davis, S. M., Wu, Z. H. und Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. *Cell* 115, 565-576.
- Hurley, J. H., Lee, S. und Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399, 361-372.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., *et al.* (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Jensen, K., Shiels, C. und Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.
- Jentsch, S. und Pyrowolakis, G. (2000). Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol* 10, 335-342.
- Kagey, M. H., Melhuish, T. A. und Wotton, D. (2003). The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113, 127-137.
- Kahyo, T., Nishida, T. und Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8, 713-718.
- Kato, T., Jr., Delhase, M., Hoffmann, A. und Karin, M. (2003). CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Mol Cell* 12, 829-839.
- Kerscher, O. (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* 8, 550-555.
- Kerscher, O., Felberbaum, R. und Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-180.

## Literaturverzeichnis

- Knipscheer, P., Flotho, A., Klug, H., Olsen, J. V., van Dijk, W. J., Fish, A., Johnson, E. S., Mann, M., Sixma, T. K. und Pichler, A. (2008). Ubc9 sumoylation regulates SUMO target discrimination. *Mol Cell* 31, 371-382.
- Knipscheer, P., van Dijk, W. J., Olsen, J. V., Mann, M. und Sixma, T. K. (2007). Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *Embo J* 26, 2797-2807.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A. und Palvimo, J. J. (2002). PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22, 5222-5234.
- Krehan, A., Ansuini, H., Bocher, O., Grein, S., Wirkner, U. und Pyerin, W. (2000). Transcription factors ets1, NF-kappa B, and Sp1 are major determinants of the promoter activity of the human protein kinase CK2alpha gene. *J Biol Chem* 275, 18327-18336.
- Kuo, M. L., den Besten, W., Thomas, M. C. und Sherr, C. J. (2008). Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3. *Cell Cycle* 7, 3378-3387.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B. und de The, H. (2008). Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol* 10, 547-555.
- Lee, H., Quinn, J. C., Prasanth, K. V., Swiss, V. A., Economides, K. D., Camacho, M. M., Spector, D. L. und Abate-Shen, C. (2006). PIAS1 confers DNA-binding specificity on the Msx1 homeoprotein. *Genes Dev* 20, 784-794.
- Leidel, S., Pedrioli, P., Bucher, T., Brost, R., Costanzo, M., Schmidt, A., Aebersold, R., Boone, C., Hofmann, K. und Peter, M. (2009). Ubiquitin-related modifier Urm1 acts as a sulphur carrier in thiolation of eukaryotic transfer RNA. *Nature* 458, 228-232.
- Li, Y., Busch, R., Valdez, B. und Busch, H. (1996). C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur J Biochem* 237, 153-158.
- Lin, D. Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., *et al.* (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 24, 341-354.
- Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y. Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunicardi, F. C., Melchior, F. und Feng, X. H. (2003). Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* 11, 1389-1396.
- Litchfield, D. W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 369, 1-15.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. und Shuai, K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10626-10631.
- Liu, B., Mink, S., Wong, K. A., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P. W., Wu, H. und Shuai, K. (2004). PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol* 5, 891-898.

## Literaturverzeichnis

Liu, B., Yang, Y., Chernishof, V., Loo, R. R., Jang, H., Tahk, S., Yang, R., Mink, S., Shultz, D., Bellone, C. J., *et al.* (2007). Proinflammatory stimuli induce IKK $\alpha$ -mediated phosphorylation of PIAS1 to restrict inflammation and immunity. *Cell* 129, 903-914.

Liu, Q., Greimann, J. C. und Lima, C. D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127, 1223-1237.

Louvet, E., Junéra, H., Berthuy, I. und Hernandez-Verdun, D. (2006). Compartmentation of the nucleolar processing proteins in the granular component is a CK2-driven process. *Mol Biol Cell* 17, 2537-2546.

Lu, K. P. und Zhou, X. Z. (2007). The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 904-916.

Luders, J., Pyrowolakis, G. und 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.

Mabb, A. M., Wuerzberger-Davis, S. M. und Miyamoto, S. (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF- $\kappa$ B activation in response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 8, 986-993.

Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. und Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.

Mahler, M. und Raijmakers, R. (2007). Novel aspects of autoantibodies to the PM/Scl complex: clinical, genetic and diagnostic insights. *Autoimmun Rev* 6, 432-437.

Malakhova, O. A. und Zhang, D. E. (2008). ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *J Biol Chem* 283, 8783-8787.

Matic, I., Macek, B., Hilger, M., Walther, T. C. und Mann, M. (2008a). Phosphorylation of SUMO-1 occurs in vivo and is conserved through evolution. *J Proteome Res* 7, 4050-4057.

Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S. C., Tatham, M. H., Hay, R. T., Lamond, A. I., Mann, M. und Vertegaal, A. C. (2008b). In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol Cell Proteomics* 7, 132-144.

Meggio, F. und Pinna, L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J* 17, 349-368.

Melnick, A. und Licht, J. D. (1999). Deconstructing a disease: RAR $\alpha$ , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215.

Meroni, G. und Diez-Roux, G. (2005). TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27, 1147-1157.

Meulmeester, E., Kunze, M., Hsiao, H. H., Urlaub, H. und Melchior, F. (2008). Mechanism and consequences for paralog-specific sumoylation of ubiquitin-specific protease 25. *Mol Cell* 30, 610-619.

Mikolajczyk, J., Drag, M., Bekes, M., Cao, J. T., Ronai, Z. und Salvesen, G. S. (2007). Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-specific proteases: profiling the specificities and activities of human SENPs. *J Biol Chem* 282, 26217-26224.

## Literaturverzeichnis

Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M. und 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.

Mizushima, N., Noda, T. und Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *Embo J* 18, 3888-3896.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M. und Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398.

Mukhopadhyay, D., Ayaydin, F., Kolli, N., Tan, S. H., Anan, T., Kametaka, A., Azuma, Y., Wilkinson, K. D. und Dasso, M. (2006). SUSP1 antagonizes formation of highly SUMO2/3-conjugated species. *J Cell Biol* 174, 939-949.

Mukhopadhyay, D. und Dasso, M. (2007). Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* 32, 286-295.

Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J., Haupt, Y. und Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275, 13321-13329.

Muller, S. und Dobner, T. (2008). The adenovirus E1B-55K oncoprotein induces SUMO modification of p53. *Cell Cycle* 7, 754-758.

Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-210.

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

Muller, S., Matunis, M. J. und Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17, 61-70.

Nakai, Y., Nakai, M. und Hayashi, H. (2008). Thio modification of yeast cytosolic tRNA requires a ubiquitin-related system that resembles bacterial sulfur transfer systems. *J Biol Chem*.

Okumura, F., Zou, W. und Zhang, D. E. (2007). ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes Dev* 21, 255-260.

Pagano, M. A., Bain, J., Kazimierczuk, Z., Sarno, S., Ruzzene, M., Di Maira, G., Elliott, M., Orzeszko, A., Cozza, G., Meggio, F. und Pinna, L. A. (2008). The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2. An update. *Biochem J*.

Palvimo, J. J. (2007). PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription. *Biochem Soc Trans* 35, 1405-1408.

Papouli, E., Chen, S., Davies, A. A., Huttner, D., Krejci, L., Sung, P. und Ulrich, H. D. (2005). Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* 19, 123-133.

Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G. und Glass, C. K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-763.

Paulick, M. G. und Bertozzi, C. R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* 47, 6991-7000.

## Literaturverzeichnis

- Perkins, N. D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49-62.
- Perry, J. J., Tainer, J. A. und Boddy, M. N. (2008). A SIM-ultaneous role for SUMO and ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 33, 201-208.
- Pfander, B., Moldovan, G. L., Sacher, M., Hoegel, C. und Jentsch, S. (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* 436, 428-433.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. und Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-120.
- Potts, P. R. und Yu, H. (2005). Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol* 25, 7021-7032.
- Potts, P. R. und Yu, H. (2007). The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* 14, 581-590.
- Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D. A., Perry, J. J., Tainer, J. A., McGowan, C. H. und Boddy, M. N. (2007). SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *Embo J* 26, 4089-4101.
- Quimby, B. B., Yong-Gonzalez, V., Anan, T., Strunnikov, A. V. und Dasso, M. (2006). The promyelocytic leukemia protein stimulates SUMO conjugation in yeast. *Oncogene* 25, 2999-3005.
- Resh, M. D. (2006). Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci STKE* 2006, re14.
- Reverter, D. und Lima, C. (2005). Insights into E3 ligase activity revealed by a SUMO-RanGAP1-Ubc9-Nup358 complex. *Nature* 435, 687-692.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I. und Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10, 831-842.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. und 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. und Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275, 6252-6258.
- Salomoni, P., Ferguson, B. J., Wyllie, A. H. und Rich, T. (2008). New insights into the role of PML in tumour suppression. *Cell Res* 18, 622-640.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3, Vol 3).
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F. und Suske, G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J* 21, 5206-5215.
- Sarno, S. und Pinna, L. A. (2008). Protein kinase CK2 as a druggable target. *Mol Biosyst* 4, 889-894.

## Literaturverzeichnis

Sayed, M., Kim, S., Salh, B., Issinger, O. und Pelech, S. (2000). Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275, 16569-16573.

Scaglioni, P. P., Yung, T. M., Cai, L. F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A. J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P. und Pandolfi, P. P. (2006). A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126, 269-283.

Scheffner, M. und Staub, O. (2007). HECT E3s and human disease. *BMC Biochem* 8 *Suppl* 1, S6.

Schmidt, D. und 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.

Schmidt, D. und Muller, S. (2003). PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci* 60, 2561-2574.

Schuberth, C. und Buchberger, A. (2008). UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci* 65, 2360-2371.

Seeler, J. S. und Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 690-699.

Seet, B. T., Dikic, I., Zhou, M. M. und Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 473-483.

Sekiyama, N., Ikegami, T., Yamane, T., M., I., Y., U., Bada, D., Ariyoshi, M., Tochio, H., Saitoh, H. und Shirakawa, M. (2008). Structure of the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)-interacting Motif of MBD1-containing Chromatin-associated Factor 1 Bound to SUMO-3. *J Biol Chem* 283, 35966-35975.

Seldin, D. C., Landesman-Bollag, E., Farago, M., Currier, N., Lou, D. und Dominguez, I. (2005). CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumourigenesis. *Mol Cell Biochem* 274, 63-67.

Shah, S. J., Blumen, S., Pitha-Rowe, I., Kitareewan, S., Freemantle, S. J., Feng, Q. und Dmitrovsky, E. (2008). UBE1L represses PML/RAR{alpha} by targeting the PML domain for ISG15ylation. *Mol Cancer Ther* 7, 905-914.

Shalizi, A., Gaudilliere, B., Yuan, Z., Stegmuller, J., Shirogane, T., Ge, Q., Tan, Y., Schulman, B., Harper, J. W. und Bonni, A. (2006). A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation. *Science* 311, 1012-1017.

Shen, T. H., Lin, H. K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M. und Pandolfi, P. P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell* 24, 331-339.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. und Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.

Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 19, 2638-2644.

Shuai, K. (2006). Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res* 16, 196-202.

## Literaturverzeichnis

- Smyth, D. J., Howson, J. M., Lowe, C. E., Walker, N. M., Lam, A. C., Nutland, S., Hutchings, J., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Guja, C., *et al.* (2005). Assessing the validity of the association between the SUMO4 M55V variant and risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 37, 110-111; author reply 112-113.
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G. und Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14373-14378.
- Song, J., Zhang, Z., Hu, W. und Chen, Y. (2005). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem* 280, 40122-40129.
- Stankovic-Valentin, N., Deltour, S., Seeler, J., Pinte, S., Vergoten, G., Guerardel, C., Dejean, A. und Leprince, D. (2007). An acetylation/deacetylation-SUMOylation switch through a phylogenetically conserved psiKXEP motif in the tumor suppressor HIC1 regulates transcriptional repression activity. *Mol Cell Biol* 27, 2661-2675.
- Steinacher, R. und Schar, P. (2005). Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation. *Curr Biol* 15, 616-623.
- Stielow, B., Sapetschnig, A., Krüger, I., Kunert, N., Brehm, A., Boutros, M. und Suske, G. (2008). Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Mol Cell* 29, 742-754.
- Stoecklin, G., Mayo, T. und Anderson, P. (2006). ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO Rep* 7, 72-77.
- Sullivan, M. und Morgan, D. O. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 894-903.
- Sun, H., Levenson, J. D. und Hunter, T. (2007). Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *Embo J* 26, 4102-4112.
- Tago, K., Chiocca, S. und Sherr, C. (2005). Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7689-7694.
- Takahashi, K., Uchida, C., Shin, R. W., Shimazaki, K. und Uchida, T. (2008). Prolyl isomerase, Pin1: new findings of post-translational modifications and physiological substrates in cancer, asthma and Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 65, 359-375.
- Tatham, M. H., Geoffroy, M. C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E. G., Palvimo, J. J. und Hay, R. T. (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol* 10, 538-546.
- Taylor, S. V., Kelleher, N. L., Kinsland, C., Chiu, H. J., Costello, C. A., Backstrom, A. D., McLafferty, F. W. und Begley, T. P. (1998). Thiamin biosynthesis in *Escherichia coli*. Identification of this thiocarboxylate as the immediate sulfur donor in the thiazole formation. *J Biol Chem* 273, 16555-16560.
- Terzic, J., Marinovic-Terzic, I., Ikeda, F. und Dikic, I. (2007). Ubiquitin signals in the NF-kappaB pathway. *Biochem Soc Trans* 35, 942-945.
- Torres, J. und Pulido, R. (2001). The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 276, 993-998.

## Literaturverzeichnis

Uzunova, K., Gottsche, K., Miteva, M., Weisshaar, S. R., Glanemann, C., Schnellhardt, M., Niessen, M., Scheel, H., Hofmann, K., Johnson, E. S., *et al.* (2007). Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates. *J Biol Chem* 282, 34167-34175.

van Attikum, H. und Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 757-765.

van Niekerk, E., Willis, D., Chang, J., Reumann, K., Heise, T. und Twiss, J. (2007). Sumoylation in axons triggers retrograde transport of the RNA-binding protein La. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12913-12918.

Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H. und Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res* 34, 6170-6182.

Weber, S., Maass, F., Schuemann, M., Krause, E., Suske, G. und Bauer, U. M. (2009). PRMT1-mediated arginine methylation of PIAS1 regulates STAT1 signaling. *Genes Dev* 23, 118-132.

Welcker, M. und Clurman, B. E. (2008). FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat Rev Cancer* 8, 83-93.

Wuebbens, M. M. und Rajagopalan, K. V. (2003). Mechanistic and mutational studies of Escherichia coli molybdopterin synthase clarify the final step of molybdopterin biosynthesis. *J Biol Chem* 278, 14523-14532.

Xu, J., Zhang, J., Wang, L., Zhou, J., Huang, H., Wu, J., Zhong, Y. und Shi, Y. (2006). Solution structure of Urm1 and its implications for the origin of protein modifiers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11625-11630.

Yang, H., Minamishima, Y. A., Yan, Q., Schlisio, S., Ebert, B. L., Zhang, X., Zhang, L., Kim, W. Y., Olumi, A. F. und Kaelin, W. G., Jr. (2007). pVHL acts as an adaptor to promote the inhibitory phosphorylation of the NF-kappaB agonist Card9 by CK2. *Mol Cell* 28, 15-27.

Yang, S. und Sharrocks, A. (2005). PIASx acts as an Elk-1 coactivator by facilitating derepression. *Embo J* 24, 2161-2171.

Yang, S. H., Galanis, A., Witty, J. und Sharrocks, A. D. (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *Embo J* 25, 5083-5093.

Zhang, X. D., Goeres, J., Zhang, H., Yen, T. J., Porter, A. C. und Matunis, M. J. (2008). SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Mol Cell* 29, 729-741.

Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M. und McBride, H. M. (2007). The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* 120, 1178-1188.

## 7 Anhang

### 7.1 Per Massenspektrometrie identifizierte GST-pSIM-Interaktoren

#### Kernpore

Name	Größe (kDa)	Anzahl der Peptide	SUMO-Modifikation
Nucleoporin (RanBP2)	362	72 , 68	
Nucleoporin 210	205	8	
Nucleoporin 160	160	5, 3	
Nucleoporin 155	150	2	
Nucleoporin 107	107	10	
Nucleoporin 196	196	6, 9	
Ran GTPase aktivierendes Protein 1 (RanGAP1)	64	13, 10	

#### Rekombination und Reparatur

Name	Größe (kDa)	Anzahl der Peptide	SUMO-Modifikation
DNA Topoisomerase II	183	10, 4, 5, 8	✓
Rad-54 ähnlich	151	10, 7	
Bakterielles MutS Homolog	154	3, 4	
Rad50 Homolog Isoform 2	139	2, 7	
PARP1	113	5, 7	✓
DNA Reparatur Endonuklease	104	3, 1	
ZMYM1	103	3, 2	
Protein-Kinase (DNA-PK)	473	8	
humanes MCM5	82	1	

#### Metabolismus

Name	Größe (kDa)	Anzahl der Peptide	SUMO-Modifikation
Fettsäure-Synthase	275	17, 28	
bifunktionale Aminoacyl-tRNA Synthetase	164	3, 5	
ATP Citrat (pro-S)-Lyase	122	6, 6	
Tetrahydrofolate-Synthase	102	6, 7	
Pyrraline 5-carboxylate-Synthetase	88	1	

## Anhang

3-Phosphoglycerat-DH	57	5, 4
S-Adenosylhomocystein-Hydrolase	48	3
D-Laktat-DH	52	4
Isoleucyl-tRNA-Synthetase	145	2
Guanin-Monophosphat-Synthetase	77	4
CTP-Synthase	67	2
Pyruvat-Kinase	58	16
Asperagin-Synthetase	64	2

### Transkription und Translation

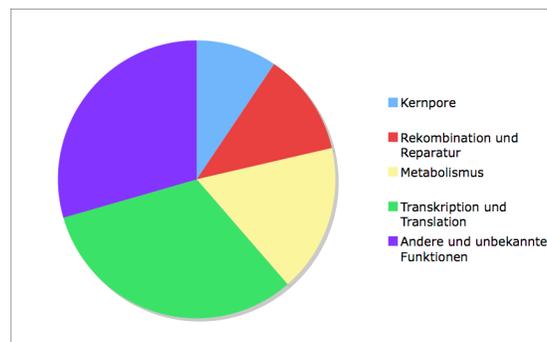
Name	Größe (kDa)	Anzahl der Peptide	SUMO-Modifikation
nucleärer Repressor KAP-1	90	5,10,10,5,8, 3,15,9,14,12	✓
Transkriptions vermittelnder Faktor 1	115	4, 7, 3	
BTB (POZ) Domänen enthaltend 12	201	3	
Chromatin-spezifischer Transkriptions-Elongations Faktor große Untereinheit	120	16, 14	
RNA Helikase A	143	8, 10	
WD repeat und HMG-box DNA bindendes Protein 1 Isoform 2	127	6, 7	
P53	44	3,2,4,4,2,4,4	✓
ZNF 451	109	3, 6	
E1B55K	56	2,1,2,2,2,2,3	✓
SETDB1 (H3-Lys9-spezifische Methyltransferase)	145	3, 2	✓
Zinkfinger und BTB Domänen enthaltend 2	58	5, 3	
Eukaryotischer Translations-Elongations Faktor 2	96	3	
RNA Helikase DDX 17	72	7,1,6	✓
Wachstums-regulierendes nukleäres Protein 68	68	5, 9	✓
IGF mRNA bindendes Protein 1	48	2, 2	
Transformations hoch-reguliertes nukleäres Protein	51	7, 1, 10	
Eukaryotischer Translations-Elongations Faktor 1	50	6	
Elongations Faktor Tu	49	3	
Translations-Initiations Faktor	47	3	
MBD1 enthaltender Chromatin assoziierter Faktor	137	3	✓
hn RNP U Protein	89	5	
78kDa Glucose-reguliertes Protein Vorläufer (GRP78)	78	17	
Zinkfinger 639	57	1, 2	
DEAD box DDX 19	51	4	✓

## Anhang

### Andere und unbekannte Funktionen

Name	Größe (kDa)	Anzahl der Peptide	SUMO-Modifikation
KIAA 0023	216	5, 10	
FIM Protein	158	20, 13	
Coatomer Protein	137	12, 4, 9	
Coatomer Protein beta	111	2	
KIAA 1122	120	3	
Leucine rich Protein	138	1, 2	
Cullin assoziiert und Neddylation-dissoziiert 1	138	6, 3	
Arsenate Resistenz-vermittelndes Protein ARS2	48	1, 1	
Mitochondriales äußeres Membran-Protein	107	1, 1	
Import Rezeptor			
KIAA 0095	95	3, 2	
KIAA 0002	60	5, 10	
Nucleäres Ribonukleoprotein H1	50	3	
Ribonukleoprotein L5	60	3	
erbB3 bindendes Protein EBP1	48	3	
PRP8	275	2	
KIAA 1352	140	3	
KIAA 0576	125	5	
Insulin-Rezeptor Substrat 4	134	1	
Splicing Faktor Homologes	54	2	
Nukleolin	76	6	
Copine III	60	5	
T-Komplex Polypeptide 1	60	5	

	Anzahl	Prozent
<b>Kernpore</b>	7	9,3
<b>Rekombination und Reparatur</b>	9	12,0
<b>Metabolismus</b>	13	17,3
<b>Transkription und Translation</b>	24	32,0
<b>Andere und unbekannte Funktionen</b>	22	29,3



## Anhang

### 7.2 Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BER	<i>base excision repair</i>
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CBP	<i>CREB binding protein</i>
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid (N=A,T,G,C)
E1	Aktivierungsenzym bei Ubiquitin/-ähnlichen Modifikationen
E2	Konjugationsenzym bei Ubiquitin/-ähnlichen Modifikationen
E3	Ligase bei Ubiquitin/Ubiquitin-ähnlichen Modifikationen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
g	1. Gramm, 2. Gravitationskoeffizient (9,81 m/sec <sup>2</sup> )
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HA	Hämagglutinin-Epitop
HBS	HEPES <i>buffered saline</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IkB	inhibitor of nuclear factor κB
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Luc	Luziferase
M	Mol/l, molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm

## Anhang

min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	normal
NBs	<i>nuclear bodies</i>
NCoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
NEDD8	<i>neuronal precursor cell-expressed developmentally downregulated 8</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NLS	Kern-Lokalisierungs-Sequenz
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
NPC	Kernporen-Komplex ( <i>nuclear pore complex</i> )
N-terminal	Amino-terminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600\text{nm}$
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PMSCL1	<i>polymyositis/scleroderma overlap syndrome 1</i>
PML	<i>promyelocytic leukaemia protein</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SBP	<i>streptavidin binding protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SENP	<i>sentrin-specific protease</i>
SIM	SUMO-Interaktionsmotiv
siRNA	small interfering RNA
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N', - Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl) - aminomethan
U	<i>unit</i>
UBA	<i>ubiquitin-associated domain</i>

## Anhang

UBC	<i>ubiquitin conjugating</i>
UBL	<i>ubiquitin-like protein</i>
Ulp	<i>ubiquitin-like protease</i>
UV	ultraviolett
WB	Westernblot/Immunblot
Wt	Wildtyp

## Danksagung

### 7.3 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Dr. Stefan Müller bedanken, der durch die interessante Aufgabenstellung und Diskussionsbereitschaft das Ergebnis dieser Arbeit sehr positiv beeinflusst hat. Zusätzlich bedanke ich mich für das Gewähren einer "schöpferischen" Selbstständigkeit.

Prof. Dr. Stefan Jentsch möchte ich für die Übernahme des Erstgutachtens danken. Außerdem verbreitet er in seiner Abteilung durch seine Persönlichkeit und Fachwissen eine produktive und professionelle Atmosphäre.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Prüfungskommission.

An dieser Stelle soll auch die gute massenspektrometrische Arbeit von Dr. Frank Siedler gewürdigt werden.

Bei den "Müller`s" Markus, Elisabeth, Rebecca, Darja und Andi will ich mich für die gute Stimmung im Labor, auf dem Fußballplatz und im Münchener Nachtleben bedanken. Meinem Praktikanten Nils danke ich für die praktische Unterstützung und ein kreatives Protokoll.

Allen vergangenen und aktuellen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Zellbiologie danke ich für eine positive Atmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft.

## Lebenslauf

### 7.4 Lebenslauf

**Name** Per Stehmeier  
**Adresse** Paul-Meisel-Weg 3  
81373 München  
**Geburtsdatum** 13. September 1977  
**Geburtsort** Bremen

---

#### Schulbildung

1984-1988 Grundschule Brinkum  
1988-1990 Orientierungsstufe Brinkum  
1990-1998 KGS Stuhr/Brinkum  
Abschluss mit Abitur im Juni 1998

#### Zivildienst

1998-1999 Kindergarten der Dietrich-Bonhoeffer-Gemeinde, Bremen

#### Studium

1999-2004 Philipps-Universität Marburg  
Studiengang: Biologie Diplom  
Diplomarbeit über "Die *in vitro* Synthese von potentiellen Thrombininhibitoren mittels nichtribosomaler Peptidsynthetasen" in der Biochemie am Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg (Arbeitsgruppe Stachelhaus)  
Abschluss mit Diplom im Februar 2004

#### Doktorarbeit

Seit April 2004 Arbeitsgruppe Dr. Stefan Müller, Abteilung für Molekulare Zellbiologie (Prof. Dr. Stefan Jentsch), Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried